



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.28

(51) Int. Cl. **C12N 15/864** (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)

(21) Номер заявки
202090260

(22) Дата подачи заявки
2018.07.10

(54) СРЕДСТВА И СПОСОБЫ ДЛЯ ГЕНОТЕРАПИИ AAV У ЧЕЛОВЕКА

(31) **17180601.1**

(32) **2017.07.10**

(33) **EP**

(43) **2020.05.08**

(86) **PCT/EP2018/068615**

(87) **WO 2019/011893 2019.01.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИКБЮРЕ АйПи Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Неймейер Барт Антониус, Феррейра
Валери (NL)**

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

(56) FRANK W.G. LEEBEEK ET AL.: "Interim Results from a Dose Escalating Study of AMT-060 (AAV5-hFIX) Gene Transfer in Adult Patients with Severe Hemophilia B", BLOOD, vol. 128, 2 December 2016 (2016-12-02), page 2314, XP055428470, the whole document -& Uniqure Biopharma: "Trial of AAV5-hFIX in Severe or Moderately Severe Hemophilia B (NCT02396342)", 3 February 2017 (2017-02-03), XP055428670, Retrieved from the Internet: URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02396342> [retrieved on 2017-11-24]

Biomarin: "A Phase 1/2, Dose-Escalation Safety, Tolerability and Efficacy Study of BMN 270, an Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer of Human Factor VIII in Patients With Severe Haemophilia A (NCT02576795)", 14 June 2017 (2017-06-14), XP055428656, US, ISBN: 978-1-118-00490-6 Retrieved from the Internet: URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02576795> [retrieved on 2017-11-24] the whole document

ELIE DOLGIN: "Early clinical data raise the bar for hemophilia gene therapies", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 34, no. 10, 1 October 2016 (2016-10-01), pages 999-1001, XP055428494, table 1
F. MINGOZZI ET AL.: "Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy", BLOOD, vol. 122, no. 1, 17 April 2013 (2013-04-17), pages 23-36, XP055175008, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2013-01-306647 table 1

SYLVIE BOUTIN ET AL.: "Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors", HUMAN GENE THERAPY, vol. 21, no. 6, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 704-712, XP055172076, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2009.182 cited in the application abstract

DWAIPAYAN SEN ET AL.: "Improved adeno-associated virus (AAV) serotype 1 and 5 vectors for gene therapy", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, 13 May 2013 (2013-05-13), XP055076741, DOI: 10.1038/srep01832 abstract

A. C. NATHWANI ET AL.: "Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates", BLOOD, vol. 109, no. 4, 15 February 2007 (2007-02-15), pages 1414-1421, XP055426703, US, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2006-03-010181 abstract

HILDINGER MARKUS ET AL.: "Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 13, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 6199-6203, XP002306404, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.75.13.6199-6203.2001, page 6201, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3

(57) Настоящее изобретение относится к средствам и способу для генотерапии на основе AAV у человека. В частности, настоящее изобретение относится к лечению пациентов-людей, у которых можно подозревать наличие антител, направленных против AAV, предназначенного для использования в указанном лечении.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к средствам и способам для генотерапии на основе AAV у человека. В частности, настоящее изобретение относится к лечению пациентов-людей, у которых можно подозревать наличие антител, направленных против AAV, предназначенного для применения в указанном лечении.

Уровень техники для изобретения

Аденоассоциированный вирус (AAV) рассматривают в качестве одного из наиболее многообещающих вирусных векторов для генотерапии у человека. AAV имеет способность эффективно инфицировать делящиеся, так же как не делящиеся клетки человека. Вирусный геном AAV дикого типа интегрирует в одиночный хромосомный участок в геноме клетки-хозяина, и наиболее важно, даже несмотря на то, что AAV присутствует у многих людей, он не ассоциирован с каким-либо заболеванием. Принимая во внимание эти преимущества, рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) оценивают в клинических исследованиях генотерапии против гемофилии В, злокачественной меланомы, кистозного фиброза и других заболеваний. Многочисленные клинические исследования и одобренные генотерапевтические лекарственные средства в Европе, такие как Alipogene tiparvovec (Glybera®, uniQure), дают надежду на то, что AAV станет основным стандартом клинической практики.

Одной из главных проблем для успешного введения вектора AAV является преодоление присутствия нейтрализующих антител (иммуноглобулинов) (NAb), возникающих после воздействия AAV дикого типа или векторов на основе AAV. В обоих случаях, нейтрализующие специфические для серотипа антитела, направленные против белков вирусного капсида, могут уменьшать эффективность переноса генов с использованием AAV такого же серотипа.

Относительно более низкие титры эндемичных NAb наблюдали для серотипа AAV5 у человека, по сравнению с другими серотипами (Boutin et al. Hum Gene Ther 2010, 21:704-712). Опубликовано, что при лечении людей с использованием AAV, уже такие низкие титры эндемичных NAb влияют на трансдукцию и приводят к сильно уменьшенной экспрессии трансгена (Manno et al., Nature Medicine, 2006, 12(3), 342-347). Таким образом, общим соглашением в этой области является избегание лечения пациентов, имеющих совокупность титров NAb. Таким образом, современная клиническая практика применительно к предсуществующему иммунитету включает скрининг пациентов-людей для целесообразного исключения пациентов, имеющих нейтрализующие антитела против капсида AAV (Brimble et al. Expert Opin Biol Ther 2016, 16(1):79-92 и Boutin et al. Hum Gene Ther 2010, 21:704-712). Иммуносупрессивные режимы пробовали для уменьшения образования NAb при первом введении, чтобы позволить второе введение (Corti et al., Mol Ther - Meth Clin Dev (2014) 1, 14033; Mingozzi et al. Mol Ther vol. 20 no. 7, 1410-1416; McIntosh et al. Gene Ther 2012, 19, 78-85)). Кроме того, для преодоления предсуществующих антител предложены способы, включающие плазмообмен и использование иммуносупрессивных режимов (например, Chicoine et al., Mol Ther 2014, vol. 22 no.2 338-347; Hurlbut et al. Mol Ther 2010, vol. 18 no. 11 1983-1984 и Mingozzi et al. Mol Ther vol. 20 no. 7, 1410-1416). Эти способы тестировали в моделях на животных, получая ограниченный успех.

Таким образом, в данной области существует необходимость обеспечения возможности введения генотерапевтических векторов rAAV пациентам-людям, которые имеют нейтрализующие AAV антитела, или у которых можно подозревать их наличие.

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения в настоящее время неожиданно обнаружили, что, в частности, для генотерапевтических векторов AAV5, и, в отличие от предположений на существующем уровне техники, пациентов-людей, имеющих эндемичные предсуществующие антитела против AAV5 (т.е. предсуществующие антитела против AAV5, возникающие в результате эндемичного воздействия), можно рассматривать как пригодных для лечения. Это отличается от мнения на предшествующем уровне техники, что присутствие нейтрализующих антител следует рассматривать как критерий исключения, например, для пациентов, участвующих в клинических исследованиях. Иными словами, мнение на предшествующем уровне техники представляет собой то, что пациентов, имеющих антитела против AAV5, более конкретно, эндемичные предсуществующие антитела против AAV5, не рассматривают как пригодных для лечения с использованием генотерапевтического вектора AAV5. Неожиданное обнаружение, описанное в настоящем описании, что пациентов-людей, имеющих эндемичные предсуществующие антитела против AAV5, можно рассматривать как пригодных для лечения, относится не только к субпопуляции пациентов-людей, например, как обнаружено, имеющих очень низкие уровни предсуществующих антител против AAV5, но вместо этого, обнаружено, что оно относится по существу к большинству, если не ко всем пациентам из популяции людей, которые оценены как положительные по предсуществующим антителам против AAV5 и которых ранее не подвергали никакой генотерапии AAV5.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору AAV5 для использования в медицинском лечении пациента-человека, где указанного пациента-человека не подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5 и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения. Иными словами, настоящее изобретение

относится к генотерапевтическому вектору AAV5 для использования в медицинском лечении человека, где статус антител против AAV5 неизвестен, и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения. В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение может сделать возможным лечение пациентов или включение в клинические исследования пациентов, которых не подвергали лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 ранее, без скрининга по присутствию антител против AAV5 до медицинского лечения.

В следующем аспекте, настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору AAV5 для использования в медицинском лечении человека, где указанного человека подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5 и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения, где указанный человек имеет уровень антитела против AAV5, соответствующий самое большее 100^{-му} перцентилю, предпочтительно, самое большее 95-му перцентилю уровней антитела против AAV5, как наблюдали в популяции людей. Предпочтительно, указанный пациент-человек тестирован как положительный по антителам против AAV5.

Описание фигур

Фиг. 1. Результаты анализа Nab для образцов после предварительного лечения. А: результаты нейтрализации десяти образцов после предварительного дозирования. Отметка пятидесяти процентов показана точечной линией. В: результаты подбора кривой для трех положительных образцов 3, 4, 5. Четырехпараметрическую кривую подбирали посредством нелинейной регрессии. Титры рассчитывали как теоретическое разведение, при котором подобранная кривая проходила отметку 50% (показанную выше горизонтальной оси).

Фиг. 2А. Нейтрализующие AAV5 антитела против суммарных антител против AAV5. Титр нейтрализующих антител (NAb) по сравнению с результатами ELISA суммарных антител (TAb), как опубликовано в исследовании скрининга популяции. Каждый незакрашенный символ представляет парные результаты NAb и TAb для одного здорового индивидуума. Результаты NAb и TAb для подвергнутых лечению пациентов показаны наложенными (▲, для субъектов исследования 3, 4 и 5, как указано).

Фиг. 2В. Титр NAb против AAV5 против уровней FIX. Процент активности FIX в когорте 1 после дозирования нанесен на график против титра NAb до дозирования.

Фиг. 3. Шкала титра Nab против AAV. Показаны перцентили популяции людей (50 субъектов) для титров Nab против AAV5. Следует отметить, что титры Nab, наблюдаемые в популяции людей, находятся далеко за пределами титров Nab, наблюдаемых у подвергнутых лечению AAV5 пациентов-людей.

Фиг. 4. Показана аминокислотная последовательность VP1 AAV5 дикого типа. Положения стартовой аминокислоты VP2 (Т, из-за участка инициации АСГ) и VP3 (М), подчеркнуты.

Фиг. 5. Показана аминокислотная последовательность VP1 гибридной последовательности VP1, состоящей из N-конца происходящей из AAV2 последовательности VP1 (подчеркнута), связанной с происходящей из AAV5 кодирующей последовательностью VP2 и VP3. Белок VP1, таким образом, представляет собой гибридный капсидный белок AAV2/AAV5. Экспрессирующие конструкции, использованные для капсидов AAV, кодирующих указанный гибридный VP1, могут кодировать также последовательности VP2 и VP3, которые могут представлять собой не гибридные капсидные белки VP2 и VP3, а последовательность белков VP2 и VP3 AAV5 дикого типа.

Фиг. 6. Показана аминокислотная последовательность VP1 AAV5 дикого типа, имеющая вставку Ala между положениями 1 и 2 последовательности AAV5 дикого типа. Таким образом, капсид VP1 состоит из последовательности AAV5 дикого типа с вставленной аминокислотой, и кодированные белки VP2 и VP3 представляют собой белки VP2 и VP3 AAV5 дикого типа без модификаций.

Определения

"Вектор AAV" относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусному (AAV) вектору, полученному из AAV дикого типа с использованием молекулярных способов. Вектор AAV отличается от вектора AAV дикого типа (wt), поскольку по меньшей мере часть вирусного генома заменена на трансген, который является неприродной нуклеиновой кислотой по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты AAV дикого типа.

Вектор AAV, включающий комбинации капсида AAV и ITR генома AAV, можно получать с использованием способов, известных в данной области, как описано в Pan et al. (J. of Virology (1999) 73: 3410-3417), Clark et al. (Human Gene Therapy (1999) 10: 1031-1039), Wang et al. (Methods Mol. Biol. (2011) 807: 361-404) и Grimm (Methods (2002) 28(2): 146-157), содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Альтернативно, векторы AAV можно получать в клетках насекомых с использованием бакуловирусной системы экспрессии (BEVS). Исходная бакуловирусная система для получения гAAV описана в Urabe et al (Urabe et al. [2002] Human Gene Therapy 13(16): 1935-1943) и состоит из трех бакуловирусов, а именно, Vac-Rep, Vac-cap и Vac-vec, совместная инфекция которых в клетки насекомых, например, SF9 привела к получению гAAV. Свойства полученного таким образом гAAV, т.е., физические и молекулярные характеристики, включая активность, значительно не отличались от гAAV, полученного в клетках млекопитающих (Urabe [2002], выше). Исходную бакуловирусную систему из

Urabe (2002, выше) развивали далее (см., например, Kohlbrenner et al. (2005) *Molecular Therapy* 12 (6): 1217-1225; Urabe et al. (2006) *Journal of Virology* 80(4): 1874-1885; WO 2007/046703; WO 2007/148971; WO 2009/014445 и WO 2009/104964).

Термин "трансен" используют для обозначения неприродной нуклеиновой кислоты, применительно к последовательности нуклеиновой кислоты AAV. Его используют для обозначения полинуклеотида, который можно вводить в клетку или организм. Трансены включают любой полинуклеотид, такой как ген, который кодирует полипептид или белок, полинуклеотид, который транскрибируется в ингибирующий полинуклеотид, или полинуклеотид, который не транскрибируется (например, лишен элемента контроля экспрессии, такого как промотор, управляющий транскрипцией). Трансен, предпочтительно, вставляют между последовательностями инвертированного концевой повтора (ITR). Трансен может также представлять собой экспрессирующую конструкцию, содержащую регулирующий экспрессию элемент, такой как промотор или регулирующая транскрипцию последовательность, функционально связанный с кодирующей последовательностью и 3'-терминирующей последовательностью.

"Трансдукция" относится к переносу трансгена в реципиентную клетку-хозяина посредством вирусного вектора. Трансдукция клетки-мишени вектором гAAV по изобретению приводит к переносу трансгена, содержащегося в этом векторе, в трансдуцированную клетку. "Клетка-хозяин" или "клетка-мишень" относится к клетке, в которую происходит доставка ДНК, например, такой как синовиоциты или синовиальные клетки индивидуума. Векторы AAV являются способными трансдуцировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки.

"Ген" или "кодирующая последовательность" относится к области ДНК или РНК, которая "кодирует" конкретный белок. Кодированная последовательность транскрибируется (ДНК) и транслируется (РНК) в полипептид, когда помещена под контроль подходящей регуляторной области, такой как промотор. Ген может содержать несколько функционально связанных фрагментов, таких как промотор, 5'-лидерная последовательность, интрон, кодирующая последовательность и 3'-нетранслируемая последовательность, содержащая участок полиаденилирования или сигнальную последовательность. Химерный или рекомбинантный ген представляет собой ген, в норме не обнаруживаемый в природе, такой как ген, в котором, например, промотор не является ассоциированным в природе с частью или всей транскрибируемой областью ДНК. "Экспрессия гена" относится к процессу, в котором ген транскрибируется в РНК и/или транслируется в активный белок.

"Идентичность последовательностей" и "сходство последовательностей" можно определять посредством выравнивания двух пептидов или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания, в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности сходной длины предпочтительно выравнивают с использованием алгоритма глобального выравнивания (например, Нидлмана-Вунша), который выравнивает последовательности оптимально на протяжении всей длины, в то время как последовательности существенно разной длины предпочтительно выравнивают с использованием алгоритма локального выравнивания (например, Смита-Уотермана). Последовательности можно затем обозначать как "в основном идентичные" или "в основном сходные", когда они (при оптимальном выравнивании, например, посредством программ GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию) разделяют по меньшей мере определенный минимальный процент идентичности последовательностей (как определено ниже). В GAP используют алгоритм глобального выравнивания Нидлмана и Вунша для выравнивания двух последовательностей на протяжении всех их длины (полной длины), максимизирующий количество совпадений и минимизирующий количество пропусков. Глобальное выравнивание подходящим образом используют для определения идентичности последовательности, когда две последовательности имеют сходную длину. Как правило, используют параметры GAP по умолчанию, со штрафом за открытие пропуска=50 (нуклеотиды)/8 (белки) и штраф за продолжение пропуска=3 (нуклеотиды)/2 (белки). Для нуклеотидов используемой по умолчанию матрицей баллов является *pwsgapdna*, и для белков используемой по умолчанию матрицей баллов является *Blosum62* (Henikoff & Henikoff, 1992, *PNAS* 89, 915-919). Выравнивания последовательностей и показатели процента идентичности последовательностей можно определять с использованием компьютерных программ, таких как пакет GCG Wisconsin, версии 10.3, доступный из Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA, или с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом, такого как программа "needle" (с использованием глобального алгоритма Нидлмана-Вунша) или "water" (с использованием локального алгоритма Смита-Уотермана) в Emboss-WIN версии 2.10.0, с использованием таких же параметров, как для GAP выше, или с использованием установок по умолчанию (как для "needle", так и для "water", и для выравниваний как белка, так и ДНК, штраф за внесение пропуска по умолчанию составляет 10,0, и штраф за продолжение пропуска по умолчанию составляет 0,5; матрицы баллов по умолчанию представляют собой *Blosum62* для белков и *DNA-Full* для ДНК). Когда последовательности имеют существенно различную общую длину, локальные выравнивания, например, с использованием алгоритма Смита-Уотермана, являются предпочтительными. Альтернативно, процент сходства или идентичности можно определять посредством поиска в публичных базах данных, с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т.д.

В рамках изобретения, "генотерапия" представляет собой вставку последовательностей нуклеино-

вой кислоты (например, трансгена, как определено в настоящем описании) в клетки и/или ткани индивидуума для лечения заболевания. Трансген может представлять собой функциональный мутантный аллель, который заменяет или дополняет дефектный аллель. Генотерапия включает также вставку трансгена, который является ингибирующим по характеру, т.е., который ингибирует, уменьшает или снижает экспрессию, активность или функцию эндогенного гена или белка, такого как нежелательный или аберрантный (например, патогенный) ген или белок. Такие трансгены могут являться экзогенными. Под экзогенной молекулой или последовательностью понимают молекулу или последовательность, в норме не встречающиеся в клетке, в ткани и/или у индивидуума, подлежащих лечению. Как приобретенные, так и наследственные заболевания являются поддающимися генотерапии. Генотерапевтический вектор AAV5, таким образом, относится к вектору AAV5 для генотерапии.

В этом описании и в формуле изобретения, слово "содержать" и его спряжения используют в их неограничивающем смысле для обозначения того, что пункты, следующие за словом, включены, но пункты, не упомянутые конкретно, не исключены.

Кроме того, ссылка на неконкретизированный элемент единственного числа не исключает возможности того, что присутствует более одного из элементов, если контекст явно не требует того, чтобы присутствовал один и только один из элементов. Неконкретизированный элемент единственного числа, таким образом, обычно означает "по меньшей мере один".

Слово "приблизительно" или "около", при использовании в ассоциации с числовым значением (приблизительно 10, около 10), предпочтительно, означает, что значение может представлять собой данное значение 10, и большее или меньшее на 10% от этого значения.

Подробное описание изобретения

Как указано, неожиданно обнаружено, что в частности, для генотерапевтических векторов AAV5, пациентов-людей, имеющих эндемичные предрасполагающие антитела против AAV5, можно считать пригодными для лечения. Это отличается от общего мнения о том, что предрасполагающие антитела против AAV против конкретного серотипа исключают генотерапевтическое лечение с использованием указанного серотипа. Без связи с теорией, AAV5 может представлять собой серотип, для которого титры эндемичного предрасполагающего антитела против AAV5, как они обнаружены в популяции людей, являются относительно низкими, по сравнению с другими серотипами. Это может происходить из-за пути инфекции, который может отличаться между серотипами, и/или может происходить в присутствии или в отсутствие совместной инфекции вирусом-помощником. Кроме того, AAV5 является наиболее отличающимся от других серотипов AAV приматов и филогенетически отдельным от них, что также может вносить в это вклад. Независимо от того, что лежит в основе настоящего изобретения, оно позволяет большинству, если не всей популяции людей являться пригодной для лечения с использованием видов генотерапии на основе серотипа AAV5 или т.п. Это включает подгруппу популяции людей, которая является отрицательной применительно к антителам против AAV5, а также подгруппу популяции людей, как обнаружено, положительных применительно к антителам против AAV5, не включающую (в настоящее время) очень незначительную подгруппу популяции людей, которую подвергали генотерапевтическому лечению AAV5 или т.п. В популяции людей, которую подвергали генотерапевтическому лечению AAV5, наблюдают такие высокие титры антител против AAV5 (приблизительно 10^4 или более, по сравнению с эндемично инфицированными AAV5 людьми), что их считают непригодными для лечения с использованием генотерапевтических векторов AAV5 или т.п.

Таким образом, в первом аспекте, настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору AAV5 для использования в медицинском лечении человека, где указанного человека не подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5 и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения.

Полный геном AAV5 и других серотипов AAV секвенирован (Chiorini et al. 1999, J. of Virology Vol. 73, No.2, p1309-1319), и нуклеотидная последовательность является доступной в GenBank (No. доступа AF085716; 23 февраля 2015 г.). Понятно, что генотерапевтические векторы на основе AAV5 дикого типа содержат по меньшей мере капсидные белки AAV5, содержащие капсидные белки VP1, VP2 и VP3, соответствующие указанным аминокислотным последовательностям или по меньшей мере в основном идентичные им. В основном идентичные им включают имеющие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность аминокислотной последовательности с ними. Белковая последовательность VP1 капсида AAV5, по сравнению с которой можно определять идентичность последовательности, показана на фиг. 4. Такие последовательности могут представлять собой природные последовательности вирусов AAV, попадающие, в филогенетическом плане, в кладу AAV5 (например, как показано на фиг. 4).

"Серотип" традиционно определяют на основании отсутствия перекрестной реакционной способности между антителами против одного вируса по сравнению с другим вирусом. Такие различия перекрестной реакционной способности обычно обусловлены различиями последовательностей/антигенных детерминант капсидного белка (например, из-за различий последовательности VP1, VP2, и/или VP3 серотипов AAV). По традиционному определению, серотип означает, что представляющий интерес вирус

тестировали против сыворотки, специфической для всех существующих и охарактеризованных серотипов, по нейтрализующей активности и по обнаруженным антителам, нейтрализующим представляющий интерес вирус. По мере открытия большего количества природных изолятов вируса и получения мутантов капсида, могут присутствовать или могут не присутствовать серологические отличия от любого из существующих в настоящее время серотипов. Для удобства, серотипы AAV5 включают AAV с модификациями последовательности капсида, которые не охарактеризованы как являющиеся отдельным серотипом, которые также могут составлять подгруппу или вариант серотипа AAV5. Такие варианты, как правило, имеют существенную идентичность последовательностей.

Неприродные последовательности капсида также могут быть предусмотрены в соответствии с изобретением, например, аминокислотные последовательности, экспонированные к сыворотке (экспонированные к внешнему пространству), могут происходить из одного серотипа, в то время как неэкспонированные аминокислотные последовательности внутри капсида могут происходить из других серотипов и/или позволять большее разнообразие. Поскольку кристаллическая структура AAV5 (например, Govindasamy et al. J. Virol. Oct. 2013, vol. 87 no. 20; 11187-11199) известна, последовательности, которые не являются экспонированными и, например, находятся во внутренней части капсида AAV5, могут быть заменены на последовательности из других серотипов и/или позволяют более сильную изменчивость последовательности. Например, аминокислотную последовательность VP1, не содержащуюся в VP2 и VP3, располагают во внутренней части. Эта последовательность может происходить, например, из серотипа 2, в то время как аминокислотные последовательности VP2 и VP3 могут быть полностью основаны на AAV5 (см., например, фиг. 5). Такой капсид генотерапевтического вектора AAV5 является, в плане серотипа, и, в плане нейтрализующего антитела, неотличимым от капсида полностью дикого типа (см., среди прочего, WO2000028004 и Urabe et al. J Virol, Feb. 2006, Vol. 80, No. 4 p. 1874-1885). Такие неприродные последовательности капсида представляют собой гибридные последовательности, и понятно, что такие гибридные векторы также являются генотерапевтическими векторами AAV5 по изобретению. Кроме того, последовательности капсида AAV5 могут также иметь одну или несколько аминокислот, вставленных или замененных для улучшения получения и/или активности вектора, таких как, среди прочего, описанные в WO2015137802, и как показано, например, на фиг. 6. Такие капсиды AAV5 с незначительными модификациями можно также рассматривать как серотип AAV5.

Понятно, что векторы AAV5 или генотерапевтические векторы AAV5, по изобретению относятся к капсиду вектора AAV5, включающему геном вектора, имеющий представляющий интерес ген, содержащийся между инвертированными повторами AAV, которые могут представлять собой ITR AAV5, но не обязательно. Таким образом, векторы AAV5 по изобретению представляют собой носители для доставки, предназначенные для доставки их нагрузки, генома вектора, имеющего трансген, например, трансген, предназначенный для обеспечения преимущества для человека, для его клеток-мишеней, например, клеток печени или клеток сердечной мышцы. Таким образом, векторы AAV5 можно рассматривать как применимые в медицинском лечении человека, например, пациента-человека, страдающего от заболевания, которое можно облегчать посредством доставки трансгена. Как показано в примерах, трансген может представлять собой FIX, или его варианты, такие как мутант Padua, но трансген не является ограниченным никаким образом, и дополнительные трансгены могут быть предусмотрены по изобретению, как описано в настоящем описании. Также, в одном дополнительном варианте осуществления, пациент-человек может представлять собой пациента-человека мужского пола.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору AAV5 для использования в медицинском лечении человека, где статус антител против AAV5 неизвестен (например, не был определен), и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения. Как указано, может не являться необходимым тестирование такого пациента на существование антител против AAV5. Как показано в разделе примеры, показано, что около 30% популяции людей является положительными применительно к присутствию TAb или NAb в сыворотке. Поскольку может не являться необходимым тестирование TAb или NAb в сыворотке, размер популяции, пригодной для лечения, значительно увеличивается, более того, это делает лечение и отбор пригодных пациентов более удобными, поскольку нет необходимости проводить анализ NAb или TAb до того, как можно начать лечение. Все, что может являться необходимым - это знать, подвергали или нет пациента-человека генотерапии AAV5 ранее. Можно предусматривать, что предшествующее лечение с использованием генотерапевтического лечения AAV, может не являться ограниченным единственно AAV5, но может включать лечение с использованием также других серотипов, например, серотипа 8. Для таких субъектов может быть предусмотрено проведение анализа NAb или TAb, или тестирования, как описано в разделе примеры, чтобы подтвердить, что титр NAb или TAb в сыворотке остается в пределах диапазона, какой наблюдали у наивных не подвергнутых лечению пациентов-людей.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору AAV5 для использования в медицинском лечении человека, где указанного человека подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5 и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического век-

тора AAV5 до указанного медицинского лечения, где указанный человек имеет уровень антитела против AAV5, соответствующий самое большее, 95-му перцентилю уровней антитела против AAV5, как наблюдали в популяции людей. В этом варианте осуществления, пациента-человека, который может получать преимущество от генотерапевтического лечения, подвергают предварительному скринингу с использованием анализа антитела против AAV5. Как показано в разделе пример, диапазон уровней антител против AAV5, наблюдаемый в популяции людей, т.е., наблюдаемый диапазон уровней антитела против AAV5 составляет от приблизительно 0 или приблизительно 1, до приблизительно 10000.

n-й перцентиль в настоящем описании, как правило, определяют как долю популяции людей, n%, лежащую в пределах распределения от 0% до n%, имеющих уровень антитела против AAV5, как определено с использованием анализа NAb или анализа Tab, например, такого как описано в примерах. Например, когда пациент-человек в популяции (ранее не подвергнутый лечению с использованием вектора AAV5) имеет уровень антитела против AAV5, как определено с использованием анализа Nab, как описано в примерах, уровень антитела против AAV5, детектированный в полной популяции, должен составлять самое большее 10000, поскольку это определяет, что вплоть до приблизительно 100% популяции людей могут быть включены. Может являться предпочтительным лечить пациента-человека при наличии уровня антитела против AAV5 вплоть до 95-го перцентиля, что соответствует уровню Nab, как определено с использованием анализа, как описано в примерах, самое большее 4500. Может являться предпочтительным лечить пациента-человека при наличии уровня антитела против AAV5 вплоть до 93-го перцентиля или 90-го перцентиля, что соответствует уровню Nab, как определено с использованием анализа, как описано в примерах, самое большее 3000 или 1000, соответственно (см. фиг. 3). В соответствии с другим вариантом осуществления, может являться предпочтительным лечить пациента-человека при наличии уровня антитела против AAV5 вплоть до 99-го, 98-го, 97-го, 96-го, 95-го, 94-го, 93-го, 92-го, 91-го, 90-го, 80-го или 70-го перцентиля. Тем не менее, можно предполагать, что большая часть популяции, если не вся, является пригодной для лечения, независимо от титра антитела против AAV5. Как показано в разделе примеры, любой анализ антитела против AAV5 является достаточным, т.е., либо анализ NAb, либо анализ TAb или т.п., можно использовать для определения титров антитела в популяции людей для определения 95-го перцентиля, 93-го перцентиля или 90-го перцентиля. Отобранная популяция людей остается той же, в то время как фактические значения титров могут меняться (вплоть до 10000 для анализа NAb из примеров или вплоть до 5 для анализа TAb). Это происходит потому, что наблюдаемые значения титров представляют собой просто числа, имеющие значение только при рассмотрении в плане титров в популяции. Понятно, что в любом случае уровни титров антитела против AAV5, как определено в популяции, относятся к популяции людей по меньшей мере из 50 человек, как описано в разделе примеры.

Таким образом, в следующем варианте осуществления, настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору AAV5 для использования в медицинском лечении человека, где указанного человека подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5 и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения, где указанный человек имеет уровень антитела против AAV5, как определено в анализе ELISA Nab, как описано в примерах, соответствующий самое большее, 95-му перцентилю уровней антитела против AAV5, как наблюдали в популяции людей. В соответствии с другим вариантом осуществления, может являться предпочтительным лечить пациента-человека при наличии уровня антитела против AAV5 вплоть до 99-го, 98-го, 97-го, 96-го, 95-го, 94-го, 93-го, 92-го, 91-го, 90-го, 80-го или 70-го перцентиля.

Понятно, что по изобретению, в настоящее время субпопуляцию из популяции людей, которую ранее не считали пригодной для лечения с использованием AAV5, в настоящее время могут считать пригодной для лечения с использованием генотерапевтического вектора AAV5, вместо тестирования как положительной в анализе антитела против AAV5. Таким образом, в следующем варианте осуществления, настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору AAV5 для использования в медицинском лечении человека, где указанный человек тестирован как положительный по антителам против AAV5, и где указанного человека ранее не подвергали лечению с использованием AAV5 или т.п.

В различных вариантах осуществления, поскольку в настоящем варианте осуществления показано, что уровни антитела против AAV5 в эндемичной, не подвергнутой лечению популяции людей, позволяют эффективное генотерапевтическое лечение с использованием AAV5, настоящее изобретение может также позволять лечение пациентов-людей, которых подвергали генотерапевтическому лечению с использованием AAV, т.е. AAV5. Например, в данной области известны средства и способы, которые могут уменьшать уровни антител в крови и, таким образом, уменьшать также уровни антител против AAV5. Такие экстракорпоральные обработки крови, где антитела удаляют из крови, можно использовать для уменьшения титров антитела против AAV5 в крови для достижения таких же уровней, какие наблюдали в результате эндемичного воздействия, т.е., в эндемичной, не подвергнутой лечению популяции людей. Такие способы известны в данной области и могут включать например, плазмаферез (Chicoine et al., Mol Ther 2014, vol. 22 no.2 338-347). Таким образом, любой способ, который можно использовать для уменьшения уровней антител в крови, включая антитела против AAV5, можно использовать по изобретению для уменьшения титра антитела против AAV5 до такой степени, чтобы для пациентов-людей, ко-

торые ранее не являлись пригодными для лечения, поскольку их ранее подвергали генотерапевтическому лечению на основе AAV5, получать титры антитела против AAV5, как наблюдали в эндемичной популяции людей и получать возможность подвергания их генотерапии на основе AAV5.

В другом аспекте изобретения, указанный генотерапевтический вектор AAV5, как описано выше, вводят в дозе, соответствующей по меньшей мере 10^{11} капсидов/кг массы тела. Понятно, что наблюдение, сделанное авторами настоящего изобретения применительно к присутствию антител против AAV5, может являться зависимым от дозы. Иными словами, при использованных дозах, концентрация и/или количество антител против AAV5 не нарушает трансдукцию. Количество генотерапевтического вектора AAV5, вводимое пациенту-человеку при лечении для получения, например, значительного уровня экспрессии трансгена, значительно превышает уровни антител против AAV5, присутствующие в крови. В этом плане, можно не рассматривать верхнего предела. Тем не менее, верхний предел, который можно рассматривать, представляет собой дозу, соответствующую самое большее 10^{16} капсидов/кг массы тела. Понятно, что дозы можно устанавливать как дозу на пациента или дозу на объем крови. Дозу по меньшей мере 10^{12} капсидов/кг массы тела переводят в приблизительно 10^{14} капсидов на пациента или приблизительно 10^{13} капсидов/л объема крови пациента, на основании средней массы тела приблизительно 85 кг и среднего объема крови 5 л. Таким образом, какой диапазон дозирования не был бы предусмотрен, его можно легко пересчитать на основании этих параметров. Предпочтительно, доза соответствует по меньшей мере 1×10^{12} капсидов/кг массы тела, по меньшей мере 5×10^{12} капсидов/кг массы тела или по меньшей мере 1×10^{13} капсидов/кг массы тела. Доза, использованная в разделе примеры, составляет приблизительно 5×10^{13} капсидов/кг массы тела и приблизительно 2×10^{14} капсидов/кг массы тела. Количественная оценка AAV для титров частиц капсида AAV легко определима и хорошо известна в данной области (среди прочего, Kohlbrenner et al., Hum Gene Ther Meth. June 2012, Vol. 23, No. 3: 198-203; Grimm et al., Gene Ther., Vol. 6, Nr. 7, p, 1322-1330, 1999).

Выбранная доза может быть также основана на геномных копиях. Геномные копии обозначают количество геномов вектора, содержащееся в препарате AAV5. Титр гк для препарата вектора AAV5 можно легко определять с использованием qПЦР количественно оценивающей геномную последовательность вектора. Предпочтительно, указанный генотерапевтический вектор AAV5 используют в дозе, соответствующей по меньшей мере 5×10^{11} гк/кг массы тела. Дозу по меньшей мере 5×10^{11} капсидов/кг массы тела переводят в приблизительно 5×10^{12} гк на пациента или приблизительно 10^{12} гк/л объема крови пациента, на основании средней массы тела приблизительно 85 кг и среднего объема крови 5 л. Таким образом, какой диапазон дозирования не был бы предусмотрен, его можно легко пересчитать на основании этих параметров. Выбранная доза может составлять по меньшей мере 1×10^{12} гк/кг массы тела, по меньшей мере 2×10^{12} гк/кг массы тела, или 4×10^{12} гк/кг массы тела. Доза, использованная в разделе примеры, составляет приблизительно 5×10^{12} гк/кг массы тела и приблизительно 2×10^{13} гк/кг массы тела. Хотя может не присутствовать верхнего предела, его можно устанавливать для соответствия дозе, соответствующей самое большее 10^{15} гк/кг массы тела.

Как указано, генотерапевтический вектор AAV5 по изобретению предназначен для использования в медицинском лечении. Трансген, содержащийся в вирусном векторе AAV по изобретению, может не являться ограничением этого изобретения. Тем не менее, предпочтительно, и в соответствии с примерами, терапевтический ген кодирует фактор IX человека, как описано в Nathwani et al. N Engl J Med 2011; 365(25): 2357-65 и Nathwani et al. B. NEngl J Med 2014; 371(21): 1994-200, и может включать его варианты, такие, как описано в WO 2010029178, WO 1999003496, WO 2015086406 и WO 2010012451, полное содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В частности, в разделе примеры показано, что терапевтически значимые количества белка можно получать с использованием кодирующих FIX векторов AAV5 у пациентов-людей. Их можно использовать, например, в лечении гемофилии А или гемофилии В.

Таким образом, соответственно, для генотерапевтического вектора AAV5 для использования в медицинском лечении человека по изобретению, где указанный генотерапевтический вектор AAV5 используют для лечения гемофилии В, количество трансгенного белка FIX, полученного в плазме, может лежать в диапазоне между приблизительно 0,02 мкг/мл и вплоть до приблизительно 5 мкг/мл. Альтернативно, когда указанный генотерапевтический вектор AAV5 использовали в лечении пациентов с гемофилией В, имеющих тяжелый фенотип, после лечения получали умеренный или мягкий фенотип, или даже фенотип, какой наблюдали у здоровых индивидуумов. Гемофилию В можно классифицировать на три класса, каждый из которых характеризуется присутствием различных концентраций FIX в плазме. При тяжелой гемофилии В уровни активности FIX в плазме составляют ниже 1% от нормы; при умеренной форме, уровни составляют между 1% и 5%; при мягкой форме, между 5 и 25% от нормальных уровней. Существуют здоровые индивидуумы-носители, имеющие средние уровни активности FIX, между 25% и 50% от нормы, но многие носители могут иметь уровни, даже превышающие 50%.

Подобным образом, можно ожидать, что терапевтически эффективные количества других представляющих интерес генов являются вполне достижимыми для специалиста в данной области. Таким образом, предполагают, что изобретение можно использовать с любым трансгеном. Дополнительные

подходящие трансгены для доставки пациенту в вирусном векторе для генотерапии может выбирать специалист в данной области. Эти терапевтические последовательности нуклеиновой кислоты, как правило, кодируют продукты (например, белки или РНК) для введения и экспрессии у пациента *in vivo* или *ex vivo* для лечения наследственного или не наследственного генетического дефекта, например, посредством замены или коррекции недостаточности, для лечения эпигенетического нарушения или заболевания, или для лечения состояния, ассоциированного с нарушением регуляции продукта гена. Такие терапевтические гены, которые являются желательными для проведения генотерапии, включают, без ограничения, ген рецептора липопротеинов очень низкой плотности (VLDL-R) для лечения семейной гиперхолестеринемии или семейной комбинированной гиперлипидемии, ген трансмембранного регулятора кистозного фиброза (CFTR) для лечения кистозного фиброза, аллель Беккера гена DMD для лечения мышечной дистрофии Дюшенна, и ряд других генов, которые может легко выбрать специалист в данной области для лечения конкретного нарушения или заболевания. В предпочтительном варианте осуществления, вектор гAAV содержит трансген, кодирующий терапевтический белок или РНК, такую как мкРНК. Предпочтительно, терапевтический белок выбран из группы, состоящей из фактора IX (предпочтительно, фактора IX человека), фактора VIII (предпочтительно, фактора VIII человека), липопротеинлипазы (LPL; включая мутанты, например, такие как LPL^{S447X}; см. WO 01/00220 A2), порфибилиногендезаминазы (PBGD), рецептора липопротеинов очень низкой плотности (VLDL-R), трансмембранного регулятора проводимости при кистозном фиброзе (CFTR), продукта аллеля Беккера гена мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), продукта гена гипероксалурии (AGXT), N-ацетил-альфа-D-глюкозаминидазы (NaGlu), нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (GDNF), S100A1 (также известного как связывающий кальций белок A1 S100, который у человека кодирован геном S100A1). В предпочтительном варианте осуществления, терапевтический белок представляет собой фактор IX, более предпочтительно, фактор IX человека.

Альтернативно или в комбинации с любым из предшествующих вариантов осуществления, в предпочтительном варианте осуществления, генотерапия предназначена для лечения, предотвращения, излечения и/или обращения состояния или заболевания, предпочтительно, так называемого орфанного заболевания, которое в настоящем описании понимают как редкое заболевание, поражающее небольшой процент популяции, например, менее 1 на 1500 человек из популяции, которое является опасным для жизни, хронически истощающим и/или подвергаемым неадекватному лечению. Как правило, орфанное заболевание представляет собой генетическое заболевание и таким образом, заболевание длительностью на протяжении всей жизни, даже если симптомы не появляются немедленно. В предпочтительном варианте осуществления, такое состояние или заболевание выбрано из группы, состоящей из недостаточности липопротеинлипазы (LPLD), гемофилии В, острой интермиттирующей порфирии (AIP), синдрома Санфилиппо В, болезни Паркинсона (PD), застойной сердечной недостаточности (CHF), гемофилии А, болезни Гентингтона, мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), врожденного амавроза Лебера, X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), тяжелого комбинированного иммунодефицита с недостаточностью аденозиндезаминазы (ADA-SCID), адренолейкодистрофии, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, множественной миеломы, кистозного фиброза, серповидно-клеточного заболевания, гиперлипидемии типа I, талассемии, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), эпилепсии, атаксии Фридрейха, анемии Фанкони, болезни Баттена, влажной AMD, недостаточности альфа-антитрипсина-1, болезни Помпе, SMA-1, устойчивого к лекарственным средствам немелкоклеточного рака легкого, GM1 ганглиозидоза, пигментного ретинита, гомозиготной семейной гиперхолестеринемии, болезней лизосомального накопления, нарушений с накоплением меди или железа (например, болезни Вильсона или Менкеса), недостаточности лизосомной кислой липазы, гипооксалурии, болезни Гоше, болезни Гурлера, недостаточности аденозиндезаминазы, заболевания накопления гликогена и дегенеративного заболевания сетчатки (такого как недостаточность RPE65, хороидеремия).

В следующем варианте осуществления, указанный генотерапевтический вектор AAV5 предназначен для использования в медицинском лечении человека по изобретению, где указанное использование включает введение в кровоток, например, введение генотерапевтического вектора AAV5 в кровоток. Кровь может содержать антитела против AAV5, и в частности, предусмотрен способ доставки через кровоток, например, посредством внутрисосудистой инфузии или инъекции. Доставка через кровоток позволяет доставку вектора AAV5 в ткань-мишень. Такую доставку в ткань-мишень можно осуществлять посредством системной доставки. Настоящее изобретение не является ограниченным введением в кровоток. Действительно, общепринятые и фармацевтически приемлемые способы введения, которые могут быть предусмотрены, включают прямую доставку в орган, ткань или участок - мишень (например, печень или ЦНС), интраназальный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный, пероральный и другие парентеральные способы введения. Однако, предпочтительной тканью-мишенью, которая может быть предусмотрена, является печень. Таким образом, наиболее предпочтительно, генотерапевтический вектор AAV5 доставляет свой трансген в печень посредством способа введения через кровоток. Как указано, вирусный вектор AAV5 вводят в достаточных количествах для трансфекции желательных клеток и обеспечения достаточных уровней трансдукции и экспрессии выбранного трансгена, для обеспечения терапевтического преимущества без чрезмерных неблагоприятных эффектов или с при-

емлемыми с медицинской точки зрения физиологическими эффектами, которые может определять специалист в области медицины. Способы введения можно также комбинировать, если желательно. Дозы вектора гAAV (т.е. генотерапевтического вектора AAV5) в первую очередь зависят от таких факторов, как состояние, подвергнутое лечению, выбранный ген, возраст, масса и состояние здоровья пациента, и могут, таким образом, меняться среди пациентов.

Генотерапевтический вектор AAV5 для использования в медицинском лечении человека по изобретению, предпочтительно, представляет собой генотерапевтический вектор AAV5, полученный в клетках насекомых. Без связи с теорией, способ получения может играть роль в профиле иммунитета, ассоциированном с вектором AAV, поскольку капсиды AAV могут отличаться при получении в клетках насекомых от капсидов AAV, полученных в клетках млекопитающих. Это различие может присутствовать применительно к гликозилированию или другой посттрансляционной модификации. Кроме того, получение на основе клеток млекопитающих может иметь тот побочный эффект, что экспрессирующие гер и сар конструкции содержатся внутри капсидов AAV, которые вводят пациентам, что приводит к переносу экспрессирующих гер и сар конструкций, хотя и в очень небольших количествах, субъектам-людям. Экспрессия гер и сар AAV у пациента-человека может являться неблагоприятной в плане иммунитета, в частности, в случае пациентов-людей, которых тестируют как положительных применительно к антителам против AAV5. Таким образом, может являться предпочтительным, чтобы вирусный вектор AAV5, предназначенный для введения пациентам-людям, был получен в клетках насекомых. Получение на основе клеток насекомых хорошо разработано и включает, но без ограничения, средства и способы, как описано в WO 2007046703, WO 2007148971, WO 2009014445, WO 2009104964, WO 03042361, WO 2008024998, WO 2010114948, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу определения пациентов-людей, пригодных для медицинского лечения с использованием генотерапевтического вектора AAV5, включающего стадии:

получение образца сыворотки от пациента-человека;

определение титра антитела против AAV5;

где пациентов можно считать пригодными для медицинского лечения, если титр суммарных антител против AAV5 имеет значение в диапазоне 0,02-5, как определено с использованием анализа титра суммарных антител против AAV5 (TA_b), как описано в примерах.

Необязательно указанный способ затем включает стадию:

введение пригодному пациенту-человеку генотерапевтического вектора AAV5.

Понятно, что любое из требований и ограничений, как описано выше применительно к вариантам осуществления, относящимся к медицинскому применению факторов генотерапии AAV5, применимо также к любому из способов, как описано в настоящем описании, например, для способов доставки генотерапевтического вектора AAV5 или для определения пригодности. Предпочтительно, указанный титр суммарных антител против AAV5 имеет значение в диапазоне 0,02-4, 0,02-3 или 0,02-2, как определено для суммарных антител против AAV5 (TA_b) как описано в примерах.

В другом варианте осуществления, способ определения пациентов-людей, пригодных для медицинского лечения с использованием генотерапевтического вектора AAV5, включает стадии:

получение образца сыворотки от пациента-человека;

определение титра антитела против AAV5;

где пациентов можно считать пригодными для медицинского лечения, если титр нейтрализующих антител против AAV5 имеет значение в диапазоне 3-10000, как определено с использованием анализа нейтрализующих антител против AAV5 (NA_b), как описано в примерах.

Необязательно, указанный способ затем включает стадию:

введение пригодному пациенту-человеку генотерапевтического вектора AAV5.

Предпочтительно указанный титр антитела против AAV5 имеет значение в диапазоне 3-5000, 3-3000, или 3-1000, как определено с использованием анализа нейтрализующего антитела против AAV5 (NA_b) как описано в примерах.

Понятно, что вышеописанный критерий пригодности является не единственным критерием, который можно использовать для выбора генотерапевтического лечения с использованием AAV5. Таким образом, когда пациент-человек удовлетворяет всем другим критериям, критерий антитела против AAV5 определяет пригодность пациента-человека.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения человека, включающему введение эффективного количества генотерапевтического вектора AAV5 нуждающемуся в этом человеку;

где указанного человека не подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5;

и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения.

В дополнительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения человека, включающему введение эффективного количества генотерапевтического вектора AAV5 нуж-

дающемуся в этом человеку;

где указанного человека подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5;

где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения;

и где указанный человек имеет уровень антитела против AAV5 соответствующий самое большее, 95-му процентилу уровней антител против AAV5, как наблюдали в популяции людей.

В другом дополнительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу доставки гена человеку, включающему введение эффективного количества генотерапевтического вектора AAV5 нуждающемуся в этом человеку;

где указанного человека подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5;

где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения;

и где указанный человек имеет уровень антитела против AAV5 соответствующий самое большее, 95-му процентилу уровней антитела против AAV5, как наблюдали в популяции людей.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу доставки гена человеку, включающему введение эффективного количества генотерапевтического вектора AAV5 нуждающемуся в этом человеку;

где указанного человека не подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5;

где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения.

Альтернативно или в комбинации с любым из предшествующих вариантов осуществления, в предпочтительном варианте осуществления, композиция вектора AAV5 дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавители, солюбилизатор, наполнитель, консервант и/или эксципиент. Вектор gAAV, несущий терапевтический ген, можно вводить пациенту, предпочтительно, суспендированным в биологически совместимом растворе или фармацевтически приемлемом носителе для доставки. Пригодный носитель включает стерильный солевой раствор. Другие водные и неводные изотонические стерильные растворы для инъекции и водные и неводные стерильные суспензии, как известно, являющиеся фармацевтически приемлемыми носителями и хорошо известные специалисту в данной области, можно использовать для этой цели. Вирусный вектор вводят пациенту-человеку в достаточных количествах, как описано выше, для трансфекции желательных клеток и обеспечения достаточных уровней трансдукции и экспрессии выбранного трансгена, для обеспечения терапевтического преимущества без чрезмерных неблагоприятных эффектов или с приемлемыми с медицинской точки зрения физиологическими эффектами, которые может определять специалист в области медицины.

Примеры

Дизайн исследования и участники.

Проводили многонациональное, открытое исследование с повышением дозы фазы 1/2, включающее взрослых мужчин с тяжелой (FIX <1 МЕ/дл) или умеренной-тяжелой (FIX ≤2 МЕ/дл) гемофилией В, которым требуется либо: 1) непрерывное профилактическое введение FIX, либо 2) введение FIX по необходимости, и которые имеют либо ≥4 кровотечений в год, либо гемофильную артропатию. Дополнительные детали исследования можно обнаружить на веб-сайте NIH clinicaltrials.gov (NCT02396342). Исследование было одобрено экспертным советом организации/этическим комитетом организации в каждом центре. Все участники предоставляли письменное информированное согласие. Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией и принципами надлежащей клинической практики.

Вектор AAV5, включающий ген hFIX дикого типа с оптимизированным кодонным составом под контролем специфического для печени промотора LP1 (Nathwani et al. N Engl J Med 2011; 365(25): 2357-65 и Nathwani et al. B. N Engl J Med 2014; 371(21): 1994-2004), использовали в исследовании. Вектор получали с использованием бакуловирусной системы экспрессии, в соответствии с надлежащей производственной практикой. Титры геномных копий (гк) вектора определяли с использованием qПЦР. Соотношение капсида к гк составляло приблизительно 10, т.е. количество капсидов приблизительно в десять раз превышало количество геномных копий. Титр капсида можно определять посредством высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии (HPL-SEC) с детекцией поглощения УФ. Способ основан на колонке SEC, которая выбрана из-за ее емкости для отделения частиц AAV от более мелких компонентов матрикса. В этом способе, калибровочную кривую получают с использованием препарата вектора AAV с известной суммарной концентрацией частиц. На калибровочную кривую суммарное количество инъецированных частиц наносят против данных ответа. С использованием полученной площади пика AAV и калибровочной кривой, количество инъецированных частиц образца рассчитывают посредством интерполяции. Вектор AAV5 вводят в форме однократной, 30-минутной, периферической внутривенной инфузии. Участников лечили в двух последовательных когортах с повышением дозы: когорте 1

(n=5, участники 1-5), в которой вводили 5×10^{12} гк/кг, и когорте 2 (n=5, участники 6-10) - 2×10^{13} гк/кг. Когорта 1 состояла из взрослых мужчин со средним возрастом 69 лет (35-72) и средней массой тела 84,5 кг (71,2-89,1), когорта 2 состояла из взрослых мужчин со средним возрастом 35 лет (33-46) и средней массой тела 84,0 кг (71,4-96,0). Показатели исхода эффективности включали показатели активности FIX в плазме. Кроме того, сыворотку от субъектов получали для анализа титра нейтрализующих антител против AAV5 (титра NAb) и титра суммарных антител против AAV5 (TAb).

Контрольную сыворотку от здоровых доноров получали на коммерческой основе из SeraLab (West Sussex, UK). Вся предоставленная информация, относящаяся к этой сыворотке, перечислена ниже.

Таблица 1

Здоровые доноры

Контрольная сыворотка							
<u>ПАРТИЯ</u> #:	<u>ПОЛ:</u>	<u>ВОЗ</u> <u>РАС</u> <u>Т:</u>	<u>ЭТН.:</u>	<u>ПАРТИЯ</u> #:	<u>ПОЛ:</u>	<u>ВОЗ</u> <u>РАС</u> <u>Т:</u>	<u>ЭТН.:</u>
1	МУЖС КОЙ	33	НЕГРОИД	26	МУЖСК ОЙ	57	ЕВРОПИО ИД
2	МУЖС КОЙ	53	НЕГРОИД	27	МУЖСК ОЙ	59	ЕВРОПИО ИД
3	МУЖС КОЙ	41	НЕГРОИД	28	МУЖСК ОЙ	54	ЕВРОПИО ИД
4	МУЖС КОЙ	49	ИСПАНЕЦ	29	МУЖСК ОЙ	48	ЕВРОПИО ИД
5	МУЖС КОЙ	59	ИСПАНЕЦ	30	МУЖСК ОЙ	41	ЕВРОПИО ИД
6	МУЖС	45	ИСПАНЕЦ	31	МУЖСК	52	ЕВРОПИО

	КОЙ				ОЙ		ИД
7	МУЖС КОЙ	41	ИСПАНЕЦ	32	МУЖСК ОЙ	57	ЕВРОПИО ИД
8	МУЖС КОЙ	23	ИСПАНЕЦ	33	МУЖСК ОЙ	52	ЕВРОПИО ИД
9	МУЖС КОЙ	39	НЕГРОИД	34	МУЖСК ОЙ	50	ЕВРОПИО ИД
10	МУЖС КОЙ	37	НЕГРОИД	35	МУЖСК ОЙ	51	ЕВРОПИО ИД
11	ЖЕНСК ИЙ	38	НЕГРОИД	36	ЖЕНСКИ Й	24	ЕВРОПИО ИД
12	ЖЕНСК ИЙ	27	ИСПАНЕЦ	37	ЖЕНСКИ Й	28	ЕВРОПИО ИД
13	ЖЕНСК ИЙ	48	ИСПАНЕЦ	38	ЖЕНСКИ Й	54	ЕВРОПИО ИД
14	ЖЕНСК ИЙ	49	ЕВРОПИОИ Д	39	ЖЕНСКИ Й	23	ЕВРОПИО ИД
15	ЖЕНСК ИЙ	31	НЕГРОИД	40	ЖЕНСКИ Й	47	ЕВРОПИО ИД
16	ЖЕНСК ИЙ	23	ИСПАНЕЦ	41	ЖЕНСКИ Й	27	ЕВРОПИО ИД
17	ЖЕНСК ИЙ	45	НЕГРОИД	42	ЖЕНСКИ Й	39	ЕВРОПИО ИД
18	ЖЕНСК ИЙ	30	ИСПАНЕЦ	43	ЖЕНСКИ Й	35	ЕВРОПИО ИД
19	ЖЕНСК ИЙ	36	НЕГРОИД	44	ЖЕНСКИ Й	24	ЕВРОПИО ИД
20	ЖЕНСК ИЙ	25	ИСПАНЕЦ	45	ЖЕНСКИ Й	47	ЕВРОПИО ИД
21	МУЖС КОЙ	59	ЕВРОПИОИ Д	46	ЖЕНСКИ Й	57	ЕВРОПИО ИД
22	МУЖС КОЙ	50	ЕВРОПИОИ Д	47	ЖЕНСКИ Й	55	ЕВРОПИО ИД
23	МУЖС	54	ЕВРОПИОИ	48	ЖЕНСКИ	46	ЕВРОПИО
	КОЙ		Д		Й		ИД
24	МУЖС КОЙ	57	ЕВРОПИОИ Д	49	ЖЕНСКИ Й	21	ЕВРОПИО ИД
25	МУЖС КОЙ	65	ЕВРОПИОИ Д	50	ЖЕНСКИ Й	51	ЕВРОПИО ИД

Титр нейтрализующих антител (NAb) против AAV5.

Показатели Nab в сыворотке человека оценивали на основании высоко чувствительного анализа *in vitro* с использованием AAV5, несущего трансген люциферазы (AAV5-luc), и линии клеток эмбриональной почки человека НЕК293Т (ATCC 11.268). Экспрессию трансгена выявляли посредством добавления аналога люциферина.

Использованные материалы:

клетки HEK293T (HEK293T/ATCC 11.268);
 DMEM с фенолом красным (Gibco, REF# 31966)/10% FBS (Greiner, REF# 758093)/1% пен.-стрепт. (Gibco, REF# 15140);
 DMEM без фенола красного (Gibco, REF# 21063)/1% пен.-стрепт. (Gibco, REF# 15140);
 1xPBS/- (Gibco, REF# 14190);
 1x трипсин-ЭДТА (Gibco, REF# 25200);
 раствор (2,5%) поли-L-лизина (PLL) (Sigma-Aldrich, REF# 8920-100);
 96-луночные плоскодонные черные культуральные планшеты (costar, REF #3916);
 прозрачные 96-луночные плоскодонные планшеты (corning, REF # 3596);
 система анализа люциферазы ONE-Glo (Promega, REF# E6120);
 буфер для лизиса Glo, 1x (Promega, REF# E2661);
 использовали AAV5-CMV-luc (например, AAV5-CMV-73QlucHtt из PKO, титр: 4e13 гк/мл).

В принципе, клетки рассевали в черные 96-луночные планшеты и прозрачные 96-луночные планшеты посредством добавления 100 мкл/лунку клеток HEK293T в DMEM (с фенолом красным/10% FBS и 1%P/S (пенициллина/стрептомицина)) в концентрации $0,5 \times 10^5$ клеток/лунку. Клетки инкубировали в течение ночи.

На следующие сутки, получали серийные разведения плазмы в прозрачных 96-луночных планшетах в среде (DMEM/1% PS без фенола красного/10% FBS). Полученные конечные разведения плазмы, после добавления вируса (см. ниже), составляли 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 и 1024.

Разведения получали посредством добавления 140 мкл среды в лунки, обозначенные A2-A11 (лунки отрицательного контроля), и 70 мкл среды добавляют в остальные ряды в столбцах 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11 планшета, и в ряду H2-H11 (положительный контроль). Образцы добавляют в лунки B2, C2, D2, E2, F2, G2 (140 мкл/лунку), что приводит к первому разведению: 1. Последовательные серийные разведения плазмы выполняют в планшете посредством переноса 70 мкл из столбца 2 в столбец 3 (разведение 2), из 3 в 4 (4), из 4 в 5 (8), из 5 в 6 (16), из 6 в 7 (32), из 7 в 8 (64), из 8 в 9 (128), из 9 в 10 (256), из 10 в 11 (512), затем 70 мкл из столбца 11 отбрасывают. AAV5-CMV-73QlucHtt подготавливают в среде (DMEM/1% PS без фенола красного/10% FBS) при 6×10^9 гк/мл. Затем 70 мкл/лунку разведения вируса 6×10^9 гк/мл AAV5(160)-CMV-73QlucHtt добавляют в планшеты для разведения плазмы, исключая лунки A2-A11 (отрицательный контроль). Планшеты осторожно помещают в встряхиватель для планшетов на 2 мин при 300 об/мин. Затем планшеты инкубируют в течение 1 ч при 4°C.

Культуральную среду удаляют из черных 96-луночных планшетов, подготовленных в предшествующие сутки (с клетками HEK293T) и переносят подготовленные разведения плазмы посредством пипетирования из прозрачных планшетов в черные планшеты с клетками HEK293T в объеме 100 мкл/лунку. Эти планшеты инкубировали в течение 16-20 ч при 37°C. На следующие сутки, клетки уравновешивали при комнатной температуре, и среду удаляли. Клетки промывали один раз с использованием 1X PBS/- (100 мкл/лунку), после чего 100 мкл/лунку буфера для лизиса Glo добавляли в планшеты и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, чтобы обеспечить прохождение лизиса. После этого, добавляют 100 мкл/лунку реагента из системы анализа люциферазы ONE-Glo (реагент готовят согласно инструкциям производителя). Через по меньшей мере 3 минуты, проводят измерения планшетов с использованием протокола ONE-Glo на устройстве GloMax Discover. Титр нейтрализующих антител против AAV5 определяют с использованием анализа посредством программного обеспечения LabKey, в котором рассчитывают процент нейтрализации для каждого разведения сыворотки после вычитания фоновой активности, и затем подбирают кривую для профиля нейтрализации. Затем в нем используют эту кривую для расчета титров нейтрализующих антител для выбранного эталона, площади под кривой (AUC) и оценок ошибки. Четырех-параметрический способ использовали для расчета подбора кривых. LabKey рассчитывает IC50, разведение, при котором антитела ингибируют трансдукцию на 50%. LabKey рассчитывает также титры "по точкам", в соответствии с Johnson and Byington, Techniques in HIV Research. New York, N. Y.: Stockton Press, 1990: 71-76. Это проводят посредством линейной интерполяции между двумя повторами с каждой стороны от целевого процента нейтрализации. Каждый анализ включал положительный контроль (лунки без образца сыворотки, но с AAV5-LUC), отрицательный контроль (лунки, содержащие только среду, без образца сыворотки и без AAV5-LUC) и отрицательный контрольный образец сыворотки (инактивированную нагреванием FBS) для оценки специфичности нейтрализации AAV5-LUC. FBS не должна иметь свойства нейтрализации против AAV5 при измерении в качестве образца.

Титр антитела против AAV5.

Количественная оценка суммарных Ab человека против AAV5 была основана на анализе ELISA с использованием специфического капсида для покрытия планшета. Присутствие суммарных Ab человека, специфических против капсида AAV5, выявляли с использованием белка A с пероксидазой. Планшеты для ELISA (планшет Nunc MaxiSorp. Ref: 456537, Thermo Scientific) покрывали антигеном (cap AAV5) при 100 нг/лунку в карбонатном буфере в течение ночи при 4°C. На следующие сутки планшеты промывали

вали три раза с использованием PBS tween-20 (PBSt) для удаления остатка антигена и блокировали с использованием блокирующего раствора (PBS+3% FBS) для предотвращения неспецифического связывания. После промывки три раза с использованием 200 мкл PBSt, добавляли разведения сыворотки человека в PBSt, начиная с 1:9, за которыми следовали серийные разведения 1:3 в конечном объеме 100 мкл. Все образцы тестировали в двух повторах. Отрицательный контроль без сыворотки человека включали в каждый планшет. Разведения сыворотки инкубировали в течение 2 ч при 37°. После этого, сыворотку удаляли, планшет промывали три раза с использованием PBSt, и 100 мкл белка А с пероксидазой, разведенного 1:10000 в блокирующем растворе, добавляли на один час. Планшет промывали три раза с использованием PBSt, и реакцию выявляли с использованием субстрата ТМВ и останавливали через 30 мин с использованием 2Н H₂SO₄. Оптическую плотность считывали при 450 нм в считывателе для микропланшетов. Титр суммарных антител рассчитывали как разведение сыворотки, имеющее оптическую плотность, в пять раз превышающую отрицательный контроль.

Результаты и обсуждение

У всех пациентов-людей в обеих когортах проявлялись значительные улучшения активности FIX, с улучшением у большинства пациентов-людей посредством изменения фенотипа от тяжелого до мягкого (табл. 2), приводящего к значительному уменьшению или даже отсутствию использования профилактического введения белка FIX. Существовала наблюдаемая изменчивость между уровнями активности FIX между пациентами и между когортами. Изменчивость уровней активности FIX не коррелировала со статусом NAb или TAb пациентов-людей.

Ранее опубликованная распространенность TAb против AAV5 (40%, Boutin et al. Hum Gene Ther. 2010 Jun 21(6): 704-712) приблизительно соответствовала результатам настоящего анализа (30%). Результаты, полученные с использованием анализа Nab на основе люциферазы (см. фиг. 1 и 2), позволяют предполагать, что распространенность (нейтрализующих) антител против AAV5 является сходной, поскольку положительный сигнал получили для 14 из 50 подвергнутых скринингу образцов контрольной сыворотки (28%), что согласуется с недавними исследованиями (Li C et al. Gene Ther. 2012 Mar;19(3):288-94). Результаты для сыворотки, полученной от пациентов-людей до генотерапевтического лечения, также согласуются с этим, где обнаружено, что 3 из 10 образцов сыворотки являлись положительными как в анализе Nab, так и в анализе Tab (30%). Суммарные антитела, как оценено посредством ELISA, и нейтрализующие антитела, как оценено посредством анализа на основе люциферазы, близко коррелировали, позволяя предполагать, что оба анализа детектируют одну и ту же молекулу (см. фиг. 2А).

Кроме того, тестировали также присутствие титров нейтрализующих антител после лечения и обнаружили, что они лежат в диапазоне приблизительно 10⁶ и выше. Таким образом, титры антител, обнаруженные у не подвергнутых лечению людей, эндемично приобретенные, находятся далеко за пределами диапазона титров, наблюдаемых у пациентов-людей, подвергнутых генотерапии на основе AAV5. Кроме того, для пациентов с предсуществующими NAb против AAV5 показано быстрое увеличение уровня IgG после введения AAV-FIX, характерного для бустер-стимуляции иммунитета, в отличие от пациентов без NAb, для которых показано быстрое и временное увеличение уровня IgM, с последующим увеличением уровня IgG, что типично для первого воздействия антигена. Кроме того, не присутствовало доказательств увеличения уровня ALT (аланинаминотрансферазы) или активации специфических для капсида Т-клеток у подвергнутых лечению пациентов с предсуществующими NAb. Таким образом, подвергание генотерапии на основе AAV5 пациентов с эндемично приобретенными предсуществующими NAb являлось хорошо переносимым без увеличения уровня ALT или активации Т-клеток.

В заключение, присутствие антител против AAV5, детектированных *in vitro* посредством либо анализа Nab, либо анализа TAb, не являлось ни прогностическим, ни показательным для нарушения трансдукции *in vivo*. Не присутствовало доказательства корреляции между присутствием Nab до терапии и уровнями FIX после терапии, в результате переноса гена FIX посредством AAV5. Поразительно, что человек с наивысшим ответом в когорте 1, которому вводили более низкую дозу вектора AAV5, имел также наивысший детектированный уровень антител NAb и TAb. Диапазон титров антител против AAV5, наблюдаемых в здоровой популяции, показывает, что уровни антител в здоровой популяции, которую не подвергали генотерапевтическому лечению с использованием AAV5, не нарушают трансдукцию AAV5 *in vivo*. Это происходит, поскольку наивысший титр, наблюдаемый в здоровой популяции, лежит близко внутри диапазона к наивысшему титру, наблюдаемому у пациента 5 из когорты 1. Таким образом, считают целесообразным, что тестирование присутствия или отсутствия антител против AAV5 в не подвергнутой лечению популяции не является необходимым до лечения с использованием генотерапевтического вектора AAV5.

Табл. 2. Средние уровни FIX в состоянии равновесия и профилактический статус участников. Включены только значения по меньшей мере через 10 суток после последнего введения FIX; ^a Профилактический статус является таким, как при последнем осмотре. CI, доверительный интервал; FIX, фактор девять; ME, международные единицы.

Таблица 2

Участник	До лечения			После лечения			
	Активность FIX, МЕ/дл	Фенотип гемофилии В	Профилактическое введение FIX	Средний уровень FIX в состоянии равновесия, активность, МЕ/дл (95% CI)	Профилактическое введение FIX ^a	Фенотип гемофилии В	Уменьшение тяжести
1	<1	Тяжелая	Да	6,2 (5,8-6,6)	Нет	Мягкая	Да
2	<1	Тяжелая	Да	4,7 (4,5-5,0)	Нет	Умеренная	Да
3	<1	Тяжелая	Да	1,3 (-0,7-3,2)	Да	Умеренная-тяжелая	Да
4	1,5	Умеренная-тяжелая	Да	6,8 (6,3-7,3)	Нет	Мягкая	Да
5	<1	Тяжелая	Да	3,0 (2,6-3,4)	Нет	Умеренная	Да
6	<1	Тяжелая	Да	12,7 (11,9-13,5)	Нет	Мягкая	Да
7	<1	Тяжелая	Да	6,4 (6,0-6,7)	Нет	Мягкая	Да
8	<1	Тяжелая	Нет ^b	6,8 (5,8-7,7)	Нет	Мягкая	Да
9	<1	Тяжелая	Да	3,1 (2,8-3,3)	Нет	Умеренная	Да
10	<1	Тяжелая	Да	5,8 (5,4-6,2)	Нет	Мягкая	Да

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение генотерапевтического вектора AAV5 в медицинском лечении человека, страдающего от заболевания, которое можно облегчать посредством генотерапии на основе AAV, где указанного человека не подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5 и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения.

2. Применение генотерапевтического вектора AAV5 в медицинском лечении человека, страдающего от заболевания, которое можно облегчать посредством генотерапии на основе AAV, где указанного человека подвергают предварительному скринингу с использованием анализа для определения антител против AAV5 и где указанного человека не подвергали медицинскому лечению с использованием генотерапевтического вектора AAV5 до указанного медицинского лечения, где указанный человек имеет уровень антитела против AAV5, соответствующий самое большее, 95-му перцентилю уровней антител против AAV5, как наблюдали в популяции людей, и где указанный человек тестирован как положительный по антителам против AAV5.

3. Применение по п.1 или 2, где указанный генотерапевтический вектор AAV5 вводят в дозе, соответствующей по меньшей мере 10^{12} капсидов/кг.

4. Применение по любому из пп.1-3, где указанный генотерапевтический вектор AAV5 применяют в дозе, соответствующей по меньшей мере 10^{12} гк/кг массы тела.

5. Применение по любому из пп.1-4, где указанный генотерапевтический вектор AAV5 применяют в лечении заболевания, выбранного из группы, состоящей из гемофилии А или гемофилии В.

6. Применение по любому из пп.1-5, где указанный генотерапевтический вектор AAV5 применяют в лечении гемофилии, где генотерапевтический вектор AAV5 кодирует белок FIX или его вариант.

7. Применение по любому из пп.1-6, где указанное применение включает введение вектора в кровоток.

8. Применение по любому из пп.1-7, где указанное применение включает доставку вектора в печень.

9. Применение по любому из пп.1-8, где указанный генотерапевтический вектор AAV5 получают в клетках насекомых.

10. Способ определения пациентов-людей, пригодных для медицинского лечения с использованием генотерапевтического вектора AAV5, включающий стадии:

получение образца сыворотки от пациента-человека;

определение титра антитела против AAV5;

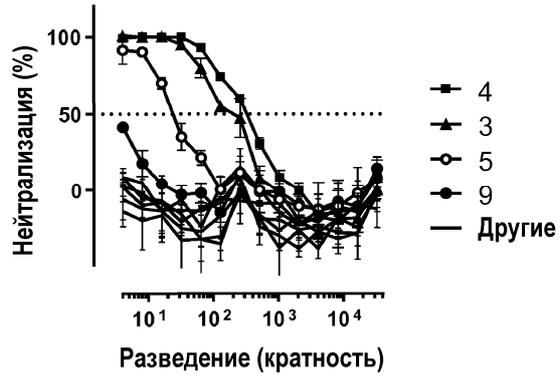
где пациентов можно считать пригодными для медицинского лечения, если титр суммарных антител против AAV5 имеет значение в диапазоне 0,02-5, как определено с использованием анализа суммарных антител (Tab) против AAV5.

11. Способ определения пациентов-людей, пригодных для медицинского лечения с использованием генотерапевтического вектора AAV5, включающий стадии:

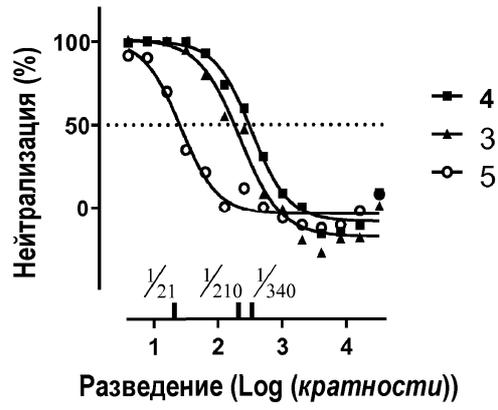
получение образца сыворотки от пациента-человека;

определение титра антитела против AAV5;

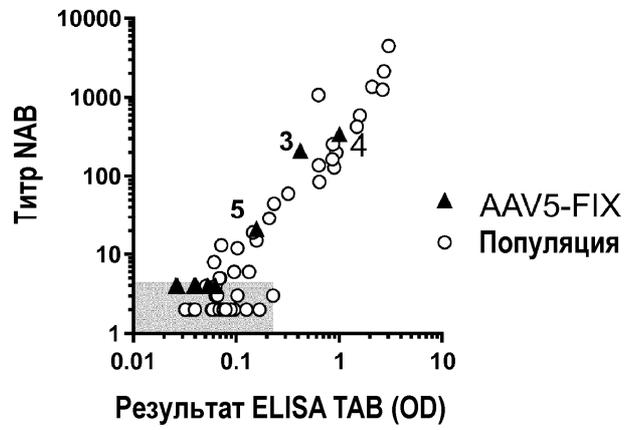
где пациентов можно считать пригодными для медицинского лечения, если титр антитела против AAV5 имеет значение в диапазоне 3-5000, как определено с использованием анализа нейтрализующих антител против AAV5, как определено посредством анализа Nab.



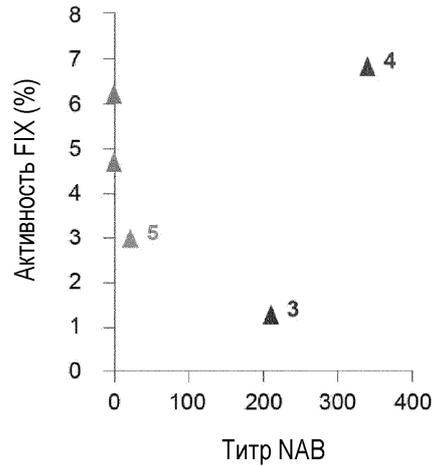
Фиг. 1А



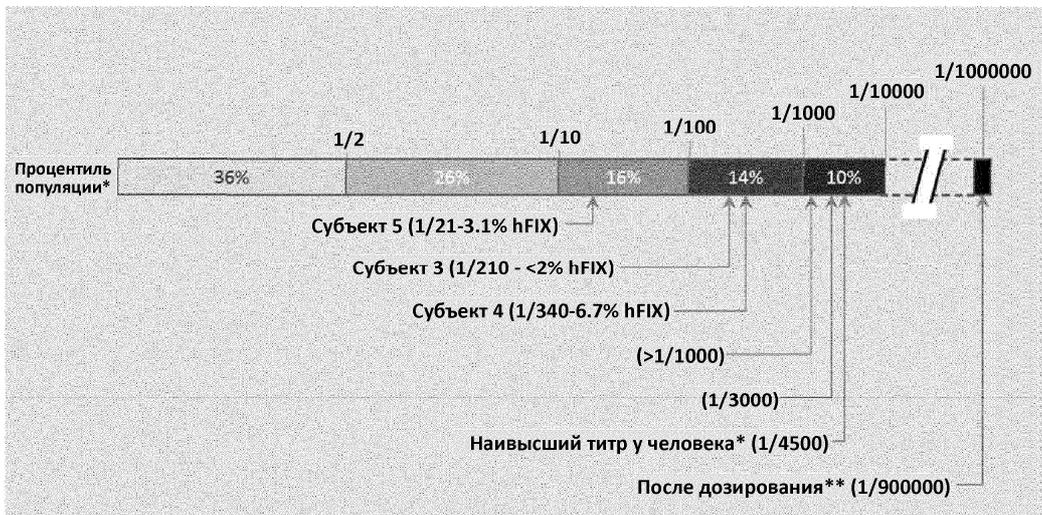
Фиг. 1В



Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 3

wtAAV5 - VP1 (SEQ ID NO.1)

```

MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVL
PGYNYLGPGNGLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYN
HADAEFQEKLADDTSFGGNLGKAVFQAQKRVLEPFGLVEEGAKTAPT
GKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQQLQIPAPASSL
GADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVTK
STRTWVLPSPYNNHQYREIKSGSVDGNSANAYFGYSTPWGYFDFNRFH
SHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNL
TSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRD
NTENPTERSSSFCLLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPPFHSSFAPSQN
LFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPM
GRTQGWNLGSVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNL
QGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAY
NVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPPIWA
KIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSS
FITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPD
STGEYRTRRPIGTRYLTRPL

```

Фиг. 4

Гибрид VP1 AAV2/AAV5* (SEQ ID NO.2)

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKGGPPPKPAERHKDDSRGLV
LPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKY
NHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPT
 GKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAPASSL
 GADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTK
 STRTWVLP SYN NHQYREIKSGSVDG SNANAYFGYSTPWGYFDFNRFH
 SHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNL
 TSTVQVFTDDDYQLPYVVGNNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRD
 NTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPPHSSFAPSQN
 LFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPM
 GRTQGWNLGSGVNRASVSATFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNL
 QGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAY
 NVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGP IWA
 KIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSS
 FITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPD
 STGEYRTRTRPIGTRYLTRPL

Фиг. 5

Вставка Ala AAV5 между AA1 и AA2 (SEQ ID NO.3)

MASFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLV
LPGYNYLGPNGLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLYKY
NHADAEFQEKLADDTSTFGGNL GKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAP
TGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAPASS
LGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVT
KSTRTWVLP SYN NHQYREIKSGSVDG SNANAYFGYSTPWGYFDFNRF
HSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANN
LTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNR
DNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPPHSSFAPSQ
NLFLKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGP
MGRTQGWNLGSGVNRASVSATFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTN
NLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRV
AYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGP I
WAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPV
SSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDF
APDSTGEYRTRTRPIGTRYLTRPL

Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2