



(51) МПК
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01K 67/0276 (2020.08); *A61K 48/005* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018124448, 14.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.12.2016

Дата регистрации:
09.02.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.12.2015 US 62/267,502

(43) Дата публикации заявки: 17.01.2020 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 09.02.2021 Бюл. № 4

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 16.07.2018

(86) Заявка РСТ:
US 2016/066611 (14.12.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/106313 (22.06.2017)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЙЮ, Нельсон (US),
ДЗИН, Донг-Киу (KR)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЗИМ КОРПОРЕЙШН (US),
САМСУНГ ЛАЙФ ПАБЛИК УЭЛФЭР
ФАУНДЕЙШН (KR)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2015168666 A2, 05.11.2015.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79158> от
05.09.2009 (согласно интернет архиву Wayback
Machine) [Найдено в интернет 14.08.2020].
DataBasa GenBank: AHD72821.1 от 23.12.2013
[Найдено в интернет 14.08.2020]. RU 2012154831
A, 27.07.2014.

(54) ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
МУКОЛИПИДОЗА ТИПА II

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описан вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа- и бета-субъединицы N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазы (GNPTAB), и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) AAV. Изобретение расширяет арсенал

средств лечения муколипидоза типа II (ML II) или муколипидоза типа III (ML III) у млекопитающего, или связанных с увеличением размера тела, содержания минеральных веществ в костной ткани и/или минеральной плотности костной ткани у млекопитающего с муколипидозом типа II (ML II) или муколипидозом типа III (ML III). 12 н. и 10 з.п. ф-лы, 12 ил., 4 табл., 2 пр.

R U 2 7 4 2 6 1 2 C 2

R U 2 7 4 2 6 1 2 C 2

R U 2 7 4 2 6 1 2 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19)

RU (11)

2 742 612⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A01K 67/0276 (2020.08); A61K 48/005 (2020.08)

(21)(22) Application: 2018124448, 14.12.2016

(24) Effective date for property rights:
14.12.2016

Registration date:
09.02.2021

Priority:

(30) Convention priority:
15.12.2015 US 62/267,502

(43) Application published: 17.01.2020 Bull. № 2

(45) Date of publication: 09.02.2021 Bull. № 4

(85) Commencement of national phase: 16.07.2018

(86) PCT application:
US 2016/066611 (14.12.2016)

(87) PCT publication:
WO 2017/106313 (22.06.2017)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"

(72) Inventor(s):

JYU, Nelson (US),
DZIN, Dong-Kiu (KR)

(73) Proprietor(s):

DZHENZIM KORPOREJSHN (US),
SAMSUNG LAJF PABLICK UELFER
FAUNDEJSHN (KR)

R U 2 7 4 2 6 1 2 C 2

(54) ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTORS FOR TREATING MUCOLIPIDOSIS TYPE II

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology.

Described is a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector comprising nucleic acid encoding alpha and beta subunits N-acetylglucosamine-1 -phosphate transferase, (GNPTAB) and at least one AAV inverted terminal repeat (ITR).

EFFECT: invention expands the range of methods for treating mucolipidosis type II (ML II) or mucolipidosis type III (ML III) in a mammal or relating to increasing body size, bone mineral content and/or bone mineral density in a mammal with mucolipidosis type II (ML II) or mucolipidosis type III (ML III).

22 cl, 12 dwg, 4 tbl, 2 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США под серийным №62/267502, поданной 15 декабря 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

5 ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

Содержание нижеследующего представленного текстового файла ASCII включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (название файла: 159792012640SEQLIST.txt, дата 10 составления: 9 декабря 2016 г., размер: 21 кБ).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к векторам на основе rAAV, частицам, композициям для лечения муколипидоза типа II и/или типа III, а также к способам, наборам и связанным с ними применением.

15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Типы муколипидоза II и III (ML II; ML III) представляют собой аутосомно-рецессивные лизосомальные болезни накопления, характеризующиеся дефицитом UDP-GlcNAc; лизосомального фермента N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы (сокращенно GlcNAc-1-фосфотрансфераза). GlcNAc-1-фосфотрансфераза представляет собой 20 гексамерный ферментный комплекс, состоящий из трех различных субъединиц: α_2 , β_2 и γ_2 . Субъединицы α_2 и β_2 содержат каталитическую активность и кодируются одним геном GNPTAB. Мутации в GNPTAB, которые приводят к полной потере 25 ферментативной активности, обнаружены у пациентов с MLII. Муколипидоз II является высоко прогрессирующими, и пациенты редко выживают после первого десятилетия жизни. Кроме того, доступные варианты лечения для ML II остаются ограниченными. Лишь у небольшого количества пациентов попытались провести транспланацию 30 костного мозга. В отличие от этого, у пациентов с MLIII обнаружены мутации в GNPTAB, приводящие к частичному снижению активности GlcNAc-1-фосфотрансферазы. У этих пациентов обычно проявляются менее выраженные симптомы и более медленное прогрессирование заболевания, однако все еще имеют место серьезные проблемы со здоровьем, такие как скелетные аномалии, задержка развития и кардиомегалия.

Наличие AAV определенных серотипов, которые проявляют тканеспецифический тропизм и способствуют устойчивой экспрессии трансгенов, обеспечивает возможность 35 AAV-опосредованной генной терапии для системного лечения лизосомального заболевания, в том числе ML II и ML III. Соответственно, исследование AAV-опосредованного лечения ML II/III является важным для определения того, представляет ли данный подход потенциальную терапевтическую стратегию для этого разрушительного заболевания. Однако до того, как AAV-опосредованное лечение 40 MLII/III может быть исследовано, необходимо преодолеть технические ограничения. Кодирующая последовательность GNPTAB (свыше 5,6 т.о. у людей) длиннее эндогенного генома AAV (приблизительно 4,7 т.о.). Поэтому весьма выгодными являются векторы 45 на основе AAV, которые способны вместить GNPTAB вместе с функциональными последовательностями промотора/энхансера и другими компонентами генома AAV, облегчая в то же время эффективную упаковку в вирусные частицы.

Настоящее изобретение предусматривает вектор на основе рекомбинантного 45 аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазу (GNPTAB), и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления

GNPTAB содержит альфа- и бета-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB функционально связан с промотором. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB представляет собой GNPTAB человека. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой составной промотор на основе энхансера CMV/промотора бета-актина курицы (CBA). В некоторых вариантах осуществления промотор CBA представляет собой модифицированный промотор CBA представляет собой усеченный промотор CBA. В некоторых вариантах осуществления энхансер CMV представляет собой укороченный энхансер CMV. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит инtron. В некоторых вариантах осуществления инtron представляет собой инtron MVM. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста. В некоторых вариантах осуществления концевой повтор AAV представляет собой ITR серотипа AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV козы, AAV крупного рогатого скота или AAV мыши. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV содержит два ITR.

В некоторых аспектах настояще изобретение предусматривает частицу rAAV, содержащую вектор на основе rAAV согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления частица AAV содержит капсид серотипа AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV козы, химерный AAV1/AAV2, AAV крупного рогатого скота, AAV мыши или rAAV2/HBoV1. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV содержит один или несколько ITR и капсид, полученные из одного и того же серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV содержит один или несколько ITR, полученных из серотипа AAV, отличного от такового для капсида вирусных частиц rAAV. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV содержит капсид AAV8, и где вектор содержит ITR AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV получена с помощью трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей вектор на основе rAAV, и нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементыгер и сар AAV, и обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления функциональные элементы помощника AAV обеспечиваются путем трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления функциональные элементы помощника AAV обеспечиваются путем инфицирования клетки-хозяина вирусом-помощником AAV, который обеспечивает функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления вирус-помощник AAV представляет собой адено-вирус, вирус простого герпеса или бакуловирус. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV получена с помощью клетки-

продуцента AAV, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вектор на основе rAAV, и нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональные элементы гер и сар AAV, и обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент AAV

- 5 содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления функциональные элементы помощника AAV обеспечиваются путем инфицирования клеток-продуцентов AAV вирусом-помощником AAV, который обеспечивает функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления вирус-помощник AAV представляет собой
- 10 аденоовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую любые частицы rAAV, описанные в данном документе.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ лечения муколипидоза типа II (ML II) или муколипидоза типа III (ML III) у млекопитающего, 15 включающий введение млекопитающему эффективного количества любой из частиц rAAV, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

- 20 В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ лечения муколипидоза типа II (ML II) или муколипидоза типа III (ML III) у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества частиц rAAV, где частицы rAAV содержат вектор на основе rAAV, где вектор на основе rAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюказамин-1-фосфаттрансферазу (GNPTAB), и по меньшей мере один ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение предусматривает способ сохранения или увеличения размера
- 25 тела у млекопитающего с муколипидозом типа II (ML II) или муколипидозом типа III (ML III), включающий введение млекопитающему эффективного количества частиц rAAV, где частицы rAAV содержат вектор на основе rAAV, где вектор на основе rAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюказамин-1-фосфаттрансферазу (GNPTAB), и по меньшей мере один ITR AAV, где экспрессия
- 30 GNPTAB приводит к сохранению или увеличению прибавки веса тела и/или сохранению или увеличению прибавки роста. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение предусматривает способ предупреждения снижения размера тела у млекопитающего с муколипидозом типа II (ML II) или муколипидозом типа III (ML III), включающий введение млекопитающему эффективного количества частиц rAAV, где
- 35 частицы rAAV содержат вектор на основе rAAV, где вектор на основе rAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюказамин-1-фосфаттрансферазу (GNPTAB), и по меньшей мере один ITR AAV, где экспрессия GNPTAB предупреждает снижение веса тела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение предусматривает способ сохранения или увеличения содержания минеральных веществ
- 40 в костной ткани у млекопитающего с муколипидозом типа II (ML II) или муколипидозом типа III (ML III), включающий введение млекопитающему эффективного количества частиц rAAV, где частицы rAAV содержат вектор на основе rAAV, где вектор на основе rAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую GNPTAB, и по меньшей мере один ITR AAV, где экспрессия GNPTAB приводит к сохранению или увеличению содержания
- 45 минеральных веществ в костной ткани. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретение предусматривает способ предупреждения снижения содержания минеральных веществ в костной ткани у млекопитающего с муколипидозом типа II (ML II) или муколипидозом типа III (ML III), включающий введение млекопитающему

эффективного количества частиц гAAV, где частицы гAAV содержат вектор на основе гAAV, где вектор на основе гAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую GNPTAB, и по меньшей мере один ITR AAV, где экспрессия GNPTAB предупреждает снижение содержания минеральных веществ в костной ткани. В некоторых вариантах 5 осуществления настоящее изобретение предусматривает способ сохранения или увеличения минеральной плотности костной ткани у млекопитающего с муколипидозом типа II (ML II) или муколипидозом типа III (ML III), включающий введение млекопитающему эффективного количества частиц гAAV, где частицы гAAV содержат вектор на основе гAAV, где вектор на основе гAAV содержит нуклеиновую кислоту, 10 кодирующую GNPTAB, и по меньшей мере один ITR AAV, где экспрессия GNPTAB приводит к сохранению или увеличению минеральной плотности костной ткани. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ предупреждения снижения минеральной плотности костной ткани у млекопитающего с муколипидозом типа II (ML II) или муколипидозом типа III (ML III), включающий 15 введение млекопитающему эффективного количества частиц гAAV, где частицы гAAV содержат вектор на основе гAAV, где вектор на основе гAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую GNPTAB, и по меньшей мере один ITR AAV, где экспрессия GNPTAB предупреждает снижение минеральной плотности костной ткани.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов лечение уменьшает

- 20 интенсивность одного или нескольких симптомов ML II или ML III, где один или несколько симптомов ML II или ML III представляют собой дефекты скелета, когнитивные нарушения, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса, выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции,
- 25 утолщение и недостаточность митрального клапана, запор или диарею. В некоторых вариантах осуществления лечение замедляет прогрессирование одного или нескольких симптомов ML II или ML III, где один или несколько симптомов ML II или ML III представляют собой дефекты скелета, когнитивные нарушения, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса, выступающий 30 живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, утолщение и недостаточность митрального клапана, запор или диарею. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего, включающий введение млекопитающему 35 эффективного количества частиц гAAV, где частицы гAAV содержат вектор на основе гAAV, где вектор на основе гAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую GNPTAB, и по меньшей мере один ITR AAV; где один или несколько симптомов ML II или ML III представляют собой дефекты скелета, когнитивные нарушения, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса,
- 40 выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, утолщение и недостаточность митрального клапана, запор или диарею. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего, включающий введение 45 млекопитающему эффективного количества частиц гAAV, где частицы гAAV содержат вектор на основе гAAV, где вектор на основе гAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую GNPTAB, и по меньшей мере один ITR AAV; где один или несколько симптомов ML II или ML III представляют собой дефекты скелета, когнитивные

нарушения, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса, выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, утолщение и недостаточность митрального клапана, запор или диарею.

- 5 В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов GNPTAB функционально связан с промотором. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB представляет собой GNPTAB человека. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:
- 10 1. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой составной промотор на основе энхансера CMV/промотора бета-актина курицы (СВА). В некоторых вариантах осуществления промотор СВА представляет собой модифицированный промотор СВА. В некоторых вариантах
- 15 осуществления модифицированный промотор СВА представляет собой усеченный промотор СВА. В некоторых вариантах осуществления энхансер CMV представляет собой укороченный энхансер CMV. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит инtron. В некоторых вариантах осуществления инtron представляет собой инtron MVM. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит
- 20 последовательность полиденилирования. В некоторых вариантах осуществления последовательность полиденилирования представляет собой последовательность полиденилирования бычьего гормона роста. В некоторых вариантах осуществления концевой повтор AAV представляет собой ITR серотипа AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12,
- 25 AAV2R471A, AAV DJ, AAV козы, AAV крупного рогатого скота или AAV мыши. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV содержит два ITR. В некоторых вариантах осуществления частица AAV содержит капсид серотипа AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV1, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2
- 30 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV козы, химерный AAV1/AAV2, AAV крупного рогатого скота, AAV мыши или гAAV2/HBoV1. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV содержит один или несколько ITR и капсид, полученные из одного и того же серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV содержит один или несколько ITR, полученных из серотипа AAV, отличного от такового для капсида
- 35 вирусных частиц rAAV. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV содержит капсид AAV8, и где вектор содержит ITR AAV2.

- В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных вариантов осуществления частица rAAV получена с помощью трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей вектор на основе rAAV, и нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементы геп и кап AAV, и обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления функциональные элементы помощника AAV обеспечиваются путем трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления функциональные элементы помощника AAV обеспечиваются путем инфицирования клетки-хозяина вирусом-помощником AAV, который обеспечивает функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления вирус-помощник AAV представляет собой аденоовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус. В некоторых

вариантах осуществления частица rAAV получена с помощью клетки-продуцента AAV, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вектор на основе rAAV, и нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональные элементы гер и кап AAV, и обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы помощника AAV. В

- 5 некоторых вариантах осуществления клетка-продуцент AAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах осуществления функциональные элементы помощника AAV обеспечиваются путем инфицирования клеток-продуцентов AAV вирусом-помощником AAV, который обеспечивает функциональные элементы помощника AAV. В некоторых вариантах
- 10 осуществления вирус-помощник AAV представляет собой аденоовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления человек является педиатрическим субъектом. В некоторых вариантах осуществления человек является взрослым субъектом молодого возраста.

- 15 В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов rAAV вводят внутривенно, внутрибрюшинно, внутриартериально, внутримышечно, подкожно или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят в более чем одно местоположение.
- 20 В некоторых вариантах осуществления введение повторяют. В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы rAAV находятся в фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает применение любой фармацевтической композиции, как описано в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для лечения ML II или ML III у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение любой фармацевтической композиции, как описано в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для применения в любом из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение любой из частиц гAAV, как описано в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для лечения ML II или ML III у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение любой из частиц rAAV, описанных в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для применения в любом из способов, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение любой из фармацевтических композиций, описанных в данном документе, для лечения ML II или ML III у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение любой из фармацевтических композиций, описанных в данном документе, для применения в любом из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение любого из рекомбинантных AAV, описанных в данном документе, для лечения ML II или ML III у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение любого из рекомбинантных AAV, описанных в данном документе, для применения в любом из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение любой из фармацевтических композиций, описанных в данном документе,

при изготовлении лекарственного препарата для уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего или для замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение

- 5 предусматривает применение любой из частиц гAAV, описанных в данном документе, при изготовлении лекарственного препарата для уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего или для замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение
- 10 предусматривает применение любой фармацевтической композиции, описанной в данном документе, для уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего или для замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает применение любого
- 15 рекомбинантного AAV, описанного в данном документе, для уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего или для замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления один или несколько симптомов ML II или ML III представляют собой дефекты скелета, когнитивные нарушения,
- 20 задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса, выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, утолщение и недостаточность митрального клапана, запор или диарею. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

- 25 В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает набор, содержащий любой из описанных в данном документе векторов на основе гAAV, любую из описанных в данном документе частиц гAAV или любую фармацевтическую композицию, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор предназначен для лечения ML II или ML III согласно любому из способов, описанных
- 30 в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит любой из описанных в данном документе векторов на основе гAAV, любую из описанных в данном документе частиц гAAV или любую фармацевтическую композицию, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или несколько буферов или фармацевтически приемлемых
- 35 вспомогательных веществ. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкции по применению при лечении ML II и/или ML III.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает животную модель муколипидоза II (ML II), где по меньшей мере один аллель гена N-ацетилглюказамин-1-fosфаттрансферазы (GNPTAB) содержит делецию, расположенную между экзоном 40 12 и экзоном 20. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один аллель гена GNPTAB содержит делецию, охватывающую экзон 12 и экзон 20. В некоторых вариантах осуществления животное является гомозиготным по делеции в гене GNPTAB. В некоторых вариантах осуществления животное является гетерозиготным по делеции в гене GNPTAB. В некоторых вариантах осуществления часть гена GNPTAB заменена 45 геном, кодирующим репортер и/или селектируемый маркер. В некоторых вариантах осуществления селектируемый маркер придает резистентность к неомицину. В некоторых вариантах осуществления животное является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является грызуном. В некоторых вариантах

осуществления грызун представляет собой мышь. В некоторых вариантах осуществления мышь характеризуется генетическим фоном, полученным от 129/Sv и/или C57Bl/6. В некоторых вариантах осуществления животное является иммунокомпетентным или иммунодефицитным.

- 5 В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ получения животной модели муколипидоза II (ML II), включающий введение делеции между экзонами 12 и 20 по меньшей мере в одном аллеле гена GNPTAB у животного. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один аллель гена GNPTAB содержит делецию, охватывающую экзон 12 и экзон 20. В некоторых вариантах
- 10 осуществления осуществляют разведение с получением животного, гомозиготного по делеции в гене GNPTAB. В некоторых вариантах осуществления осуществляют разведение с получением животного, гетерозиготного по делеции в гене GNPTAB. В некоторых вариантах осуществления часть гена GNPTAB заменена геном, кодирующим репортер и/или селектируемый маркер. В некоторых вариантах осуществления
- 15 селектируемый маркер придает резистентность к неомицину. В некоторых вариантах осуществления животное является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является грызуном. В некоторых вариантах осуществления грызун представляет собой мышь. В некоторых вариантах осуществления мышь характеризуется генетическим фоном, полученным от 129/Sv и/или C57Bl/6. В
- 20 некоторых вариантах осуществления животное является иммунокомпетентным или иммунодефицитным.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ оценки средства для лечения муколипидоза II (ML II), включающий введение средства животной модели, как описано в данном документе, где уменьшение интенсивности одного или

- 25 нескольких симптомов ML II указывает на то, что средство может обеспечить эффективное лечение ML II. В некоторых вариантах осуществления симптом ML II представляет собой снижение веса тела, снижение плотности костной ткани, снижение содержания минеральных веществ в костной ткани, дефекты скелета, когнитивные нарушения, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие
- 30 мышечного тонуса, выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, утолщение и недостаточность митрального клапана, запор и/или диарею. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой небольшую молекулу, полипептид, антитело, нуклеиновую кислоту или рекомбинантную вирусную частицу.

35 Все литературные источники, цитируемые в данном документе, в том числе патентные заявки и публикации, включены с помощью ссылки во всей своей полноте.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1А представлена диаграмма структуры гена GNPTAB мыши и сайт геномной вставки вектора для введения вставки в ген, используемого для создания нокаутных по GNPTAB мышей.

ФИГ. 1В представляет собой Саузерн-блоттинг, показывающий мышиные клонды ES, используемые для создания нокаутных по GNPTAB мышей.

На ФИГ. 2А-2С показано замедление роста, присутствующее у нокаутных по GNPTAB мышей. (ФИГ. 2А): вес тела (г) мышей дикого типа (+/+), гетерозиготных (+/-) и гомозиготных (-/-) мышей в возрасте 6 недель (***(***; p<0,0001; критерий множественного сравнения Бонферрони). (ФИГ. 2В): назо-анальная длина (мм) мышей дикого типа, гетерозиготных и гомозиготных мышей в возрасте 6 недель (*; p<0,02; критерий множественного сравнения Бонферрони). (ФИГ. 2С): общая морфология мышей дикого

типа и гомозиготных мышей.

На ФИГ. 3А и 3В показаны изображения световой микроскопии типичных окрашенных гематоксилином и эозином срезов хряща бедренной кости мышей дикого типа (ФИГ. 3А) и гомозиготных нокаутных мышей (ФИГ. 3В).

На ФИГ. 4А-4F продемонстрировано накопление аутолизосом в слюнных железах нокаутных (КО) мышей. (ФИГ. 4А-С): ЕМ демонстрирует общий вид ацинуса слюнной железы мыши дикого типа, состоящего из слизистых клеток и сероцитов. (ФИГ. 4D): общий вид ацинуса слюнной железы КО. Общая структура нарушена массовым накоплением крупных вакуолей у КО. (ФИГ. 4Е-Ф): более высокое увеличение вакуоли из (ФИГ. 4D), которая окружена однослойной мембраной и содержит неразрушенный материал. Область увеличения указана рамкой на (ФИГ. 4D). AL - аутолизосома; Mu - слизистая клетка; N - ядро; SG - секреторная гранула.

На ФИГ. 5А-5Д показана активность лизосомальных ферментов в сыворотке мышей дикого типа (незакрашенные кружки) и КО (закрашенные кружки), как отмечено.

Показана активность N-ацетилглюкозаминидазы (ФИГ. 5А), β -гексозаминидазы А (ФИГ. 5В), β -галактозидазы (ФИГ. 5С) и β -глюкуронидазы (ФИГ. 5Д).

На ФИГ. 6А и 6В представлен общий вид экспериментального плана-графика для инъекций. (ФИГ. 6А): план-график для долгосрочного лечения при исследовании мышей, которым вводили вирусный вектор в возрасте 6 недель. (ФИГ. 6В): указано общее количество мышей (n) с введением для каждой группы лечения.

На ФИГ. 7А показана схема вектора pAAV2/8-GNPTAB, содержащего кДНК GNPTAB мыши. Последовательность кДНК GNPTAB мыши основана на последовательности под номером доступа в GenBank NM_001004164.2. Нуклеотидную последовательность кодон-оптимизировали для экспрессии у мыши. Аминокислотная последовательность не изменена.

На ФИГ. 7В показан количественный анализ печени мышей КО, которым инъецировали AAV-GNPTAB, по сравнению с их контрольными однопометниками.

На ФИГ. 8А и 8В показано изменение веса тела, начиная с начального веса с течением времени для контрольных мышей и мышей КО, обработанных AAV-GNPTAB. (ФИГ. 8А): общий вес тела контрольных мышей и мышей КО, обработанных AAV-GNPTAB ($*p<0,05$, критерий множественного сравнения Даннетта). (ФИГ. 8В): данные выражены в виде итогового изменения веса, начиная с начального веса с течением времени.

На ФИГ. 9А и 9В показано изменение роста от начального роста с течением времени для контрольных мышей и мышей КО, обработанных AAV-GNPTAB. (ФИГ. 9А): данные выражены как отношение длины тела, сравниваемой до инъекции и через 6 недель после нее. (ФИГ. 9В): данные выражены как отношение длины тела, сравниваемой до инъекции и через 32 недели после нее.

На ФИГ. 10А-10С представлены гистограммы, демонстрирующие уровни минеральной плотности костной ткани до инъекции (ФИГ. 10А), через 16 недель после инъекции (ФИГ. 10В) и через 32 недели после инъекции (ФИГ. 10С). (ФИГ. 10А): данные от гомозигот и гомозигот, получавших лечение с AAV-GNPTAB, сравнивали с данными дикого типа и гетерозигот. (\dagger ; $p<0,05$, \ddagger ; $p<0,02$ по сравнению с диким типом, $*$; $p<0,02$, $**$; $p<0,002$ по сравнению с гетерозиготами). Лечение с AAV-GNPTAB приводило к статистически значимому увеличению отношения BMD (после/до Tx) у гомозиготных мышей через 16 недель лечения (ФИГ. 10В) и 32 недели лечения (ФИГ. 10С). (ФИГ. 10В): через 16 недель после лечения мыши GNPTAB-нуль, получавшие лечение с AAV-GNPTAB, продемонстрировали значительное увеличение отношения BMD по сравнению с другими мышами (**; $P<0,02$). (ФИГ. 10С): через 32 недели после лечения наблюдали

значительные различия отношения BMD у мышей, получавших лечение с GNPTAB. (#; p<0,05, **; p<0,02). Значения Р определяли с помощью анализов с двусторонним непарным t-критерием. Данные представлены в виде среднего значения ± SEM.

На ФИГ. 11А-11С представлены гистограммы, демонстрирующие гистограммы

- 5 уровня содержания минеральных веществ в костной ткани до инъекции (ФИГ. 11А), через 16 недель после инъекции (ФИГ. 11В) и через 32 недели после инъекции (ФИГ. 11С). (ФИГ. 11А): данные от гомозигот и гомозигот, получавших лечение с AAV-GNPTAB, сравнивали с данными дикого типа и гетерозигот. (†; p<0,05, ‡; p<0,02 по сравнению с диким типом, *; p<0,02, **; p<0,002 по сравнению с гетерозиготами). Лечение
- 10 с AAV-GNPTAB приводило к статистически значимому увеличению отношения BMD (после/до Tx) у гомозиготных мышей через 16 недель лечения (ФИГ. 11В) и 32 недели лечения (ФИГ. 11С). (ФИГ. 11В): через 16 недель после лечения мыши GNPTAB-нуль, получавшие лечение с AAV-GNPTAB, продемонстрировали значительное увеличение
- 15 отношения BMD по сравнению с другими мышами (**; P<0,02). (ФИГ. 11С): через 32 недели после лечения наблюдали значительные различия отношения BMD у мышей, получавших лечение с GNPTAB. (#; p<0,05, **; p<0,02). Значения Р определяли с помощью анализов с двусторонним непарным t-критерием. Данные представлены в виде среднего значения ± SEM.

На ФИГ. 12А и 12В представлены гистограммы, демонстрирующие уровни в

- 20 процентах массы нежировых тканей перед инъекцией (ФИГ. 12А) и изменение выраженной в процентах массы нежировых тканей через 32 недели после инъекции (ФИГ. 12В). (ФИГ. 12А): данные от гомозигот и гомозигот, получавших лечение с AAV-GNPTAB, сравнивали с данными дикого типа и гетерозигот. (†; p<0,02 по сравнению с диким типом, *; p<0,05, **; p<0,001 по сравнению с гетерозиготами). (ФИГ. 12В): через
- 25 32 недели после лечения не наблюдалось изменения % массы нежировых тканей у мышей, получавших лечение с AAV-GNPTAB. Значения Р определяли с помощью анализов с двусторонним непарным t-критерием. Данные представлены в виде среднего значения ± SEM.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

- 30 В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа- и бета-субединицы N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазы (GNPTAB), и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) AAV. Дополнительно в данном документе предусмотрены частицы rAAV,
- 35 содержащие вектор на основе rAAV по настоящему изобретению, а также фармацевтические композиции, содержащие частицу rAAV по настоящему изобретению.

- 40 В некоторых аспектах настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы лечения муколипидоза типа II (ML II) или муколипидоза типа III (ML III) у млекопитающего, включающие введение млекопитающему эффективного количества частиц rAAV, где частицы rAAV содержат вектор на основе rAAV, и при этом вектор на основе rAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую GNPTAB, и по меньшей мере один ITR AAV. Дополнительно в данном документе предусмотрены способы увеличения размера тела, содержания минеральных веществ в костной ткани и/или минеральной плотности костной ткани у млекопитающего с муколипидозом типа II
- 45 (ML II) или муколипидозом типа III (ML III), включающие введение млекопитающему эффективного количества частиц rAAV, где частицы rAAV содержат вектор на основе rAAV, и при этом вектор на основе rAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую GNPTAB, и по меньшей мере один ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления

экспрессия GNPTAB приводит к увеличению размера тела, содержания минеральных веществ в костной ткани и/или минеральной плотности костной ткани.

В некоторых аспектах настоящее изобретение также дополнительно предусматривает варианты применения и/или наборы для лечения ML II или ML III, например, с использованием вектора на основе гAAV, частицы гAAV или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

I. Общие методики

Методики и процедуры, описанные или упоминаемые в данном документе, как правило, широко распространены и часто используются специалистами в данной области техники с использованием традиционной методологии, как например широко используемые методологии, описанные в Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); серии Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow and Lane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002); Immunobiology (C.A. Janeway et al., 2004); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995) и Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Определения

Термин "вектор", используемый в данном документе, относится к рекомбинантной плазмиде или вирусу, содержащим нуклеиновую кислоту, которую необходимо доставить в клетку-хозяина *in vitro* или *in vivo*.

Термины "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", используемые в данном документе, относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, данный термин включает без ограничения одно-, двух- или многонитевые ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания. Остов нукleinовой кислоты может содержать сахара и фосфатные группы (которые обычно могут обнаруживаться в РНК или ДНК) или модифицированные или замещенные сахарные или фосфатные группы. В качестве альтернативы, остов нукleinовой кислоты может включать в себя полимер из синтетических субъединиц, таких как фосфорамидаты, и, таким образом, может представлять собой

олигодезоксинуклеозидный фосфорамидат ($P\text{-NH}_2$) или смешанный фосфорамидатно-фосфодиэфирный олигомер. Кроме того, двухцепочечную нукleinовую кислоту можно получить из одноцепочечного полинуклеотидного продукта химического синтеза посредством либо синтеза комплементарной цепи и отжига цепей в соответствующих 5 условиях, либо посредством синтеза комплементарной цепи *de novo* с использованием ДНК-полимеразы с соответствующим праймером.

Термины "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяющими для обозначения полимера из аминокислотных остатков, и не ограничены минимальной длиной. Такие полимеры из аминокислотных остатков могут содержать природные или неприродные 10 аминокислотные остатки, и включают без ограничения пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры из аминокислотных остатков. Данным определением охватываются как полноразмерные белки, так и их фрагменты. Термины включают также постэкспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, 15 сиалирование, ацетилирование, фосфорилирование и т. п. Кроме того, применительно к целям настоящего изобретения термин "полипептид" относится к белку, нативная последовательность которого содержит модификации, такие как делеции, добавления и замены (обычно консервативные по своей природе), при условии, что белок сохраняет требуемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, как например получеными с помощью сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, 20 как например возникшими вследствие мутаций у хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок, обусловленных ПЦР-амплификацией.

Термин "рекомбинантный вирусный вектор" относится к рекомбинантному полинуклеотидному вектору, содержащему одну или несколько гетерологичных 25 последовательностей (т. е. последовательность нукleinовой кислоты, не происходящую от вируса). В случае векторов на основе рекомбинантного AAV, рекомбинантную нукleinовую кислоту flankируют с помощью по меньшей мере одной, например двух, последовательностей инвертированных концевых повторов (ITR).

Термин "вектор на основе рекомбинантного AAV (вектор на основе rAAV)" относится к полинуклеотидному вектору, содержащему одну или несколько гетерологичных 30 последовательностей (т. е. последовательность нукleinовой кислоты, не происходящую из AAV), которые являются flankированными по меньшей мере одной, например двумя, последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. Такие векторы на основе rAAV могут реплицироваться и упаковываться в инфекционные вирусные частицы, если они присутствуют в клетке-хозяине, которая была инфицирована 35 подходящим вирусом-помощником (или которая экспрессирует подходящие функциональные элементы помощника) и которая экспрессирует продукты генов Rep и Cap AAV (т. е. белки Rep и Cap AAV). Если вектор на основе rAAV встроен в более крупный полинуклеотид (например, в хромосому или в другой вектор, такой как плазмида, применяемая для клонирования или трансфекции), то вектор на основе rAAV 40 можно называть "провектором", который может быть "спасен" с помощью репликации и заключения в капсид в присутствии упаковывающих функциональных элементов и подходящих функциональных элементов помощника AAV. Вектор на основе rAAV может находиться в любой из множества форм, в том числе без ограничения в форме плазмид, линейных искусственных хромосом, образующих комплексы с липидами, 45 инкапсулированными в липосомах, и наиболее предпочтительно инкапсидированными в вирусной частице, в частности частице AAV. Вектор на основе rAAV может быть упакован в капсид вируса AAV с образованием "частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (частица rAAV)".

Термины "вирус rAAV" или "вирусная частица rAAV" относятся к вирусной частице, состоящей по меньшей мере из одного капсидного белка AAV и инкапсидированного генома вектора на основе rAAV.

"Гетерологичный" означает полученный из объекта, генотипически отличающегося

- 5 от остальной части объекта, с которым его сравнивают или в который его вводят или встраивают. Например, нуклеиновая кислота, введенная посредством методик генетической инженерии в другой тип клетки, является гетерологичной нуклеиновой кислотой (и при экспрессии может кодировать гетерологичный полипептид).
- 10 Аналогично, клеточная последовательность (например, ген или его часть), встроенная в вирусный вектор, является гетерологичной нуклеотидной последовательностью по отношению к вектору.

Термин "трансген" относится к нуклеиновой кислоте, вводимой в клетку и способной к транскрипции в РНК и необязательно к трансляции и/или экспрессии в соответствующих условиях. В некоторых аспектах он придает требуемое свойство

- 15 клетке, в которую он был введен, или иным образом приводит к требуемому терапевтическому или диагностическому эффекту. В другом аспекте он может транскрибироваться в молекулу, которая опосредует РНК-интерференцию, такую как siRNA.

Термины "геномные частицы (gp)", "геномные эквиваленты" или "копии генома",

- 20 используемые в отношении вирусного титра, относятся к числу вирионов, содержащих ДНК-геном рекомбинантного AAV, вне зависимости от инфекционности или функциональности. Число геномных частиц в конкретном векторном препарате можно определять с помощью процедур, таких как описанные в примерах данного документа или, например, в Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002)
- 25 Mol. Ther., 6:272-278.

Термины "инфекционная единица (iu)", "инфекционная частица" или "единица репликации", используемые в отношении вирусного титра, относятся к числу инфекционных и репликационно-компетентных частиц вектора на основе рекомбинантного AAV, как измерено с помощью анализа центров инфекции, также

- 30 известного как анализ центров репликации, описанного например в McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973.

Термин "трансдуцирующая единица (tu)", используемый в отношении вирусного титра, относится к числу инфекционных частиц вектора на основе рекомбинантного AAV, которые приводят к получению функционального трансгенного продукта,

- 35 измеряемого в функциональных анализах, таких как описанные в примерах данного документа или, например, в Xiao et al. (1997) Exp. Neurobiol., 144:113-124; или в Fisher et al. (1996) J. Virol., 70:520-532 (анализ LFU).

Последовательность "инвертированных концевых повторов" или "ITR" является термином, широко распространенным в уровне техники, и относится к относительно

- 40 коротким последовательностям, встречающимся на концах вирусных геномов, которые имеют противоположную ориентацию.

Последовательность "инвертированного концевого повтора (ITR) AAV", термин, хорошо известный из уровня техники, обозначает последовательность из примерно 145 нуклеотидов, которая присутствует на обоих концах нативного однонитевого

- 45 генома AAV. Крайние 125 нуклеотидов ITR могут присутствовать в любой из двух альтернативных ориентаций, что обусловливает гетерогенность между различными геномами AAV и между двумя концами одного генома AAV. Крайние 125 нуклеотидов также содержат несколько более коротких областей самокомплémentарности

(обозначаемых как A-, A'-, B-, B'-, C-, C'- и D-области), которые обеспечивают возможность образования внутринитевого спаривания оснований в пределах данной части ITR.

"Последовательность концевого разрешения" или "trs" представляет собой

- 5 последовательность в D-области ITR AAV, которая отщепляется белками геп AAV в ходе репликации вирусной ДНК. Мутантная последовательность концевого разрешения устойчива к отщеплению белками геп AAV. "Функциональными элементами помощника AAV" называют функциональные элементы, которые обеспечивают возможность репликации и упаковки AAV в клетке-хозяине. Функциональные элементы помощника
- 10 AAV могут быть представлены любой из множества форм, в том числе без ограничения вирусом-помощником или генами вируса-помощника, которые способствуют репликации и упаковке AAV. Из уровня техники известны другие функциональные элементы помощника AAV, такие как генотоксичные средства.

"Функциональными элементами помощника AAV" называют функциональные

- 15 элементы, которые обеспечивают возможность репликации и упаковки AAV в клетке-хозяине. Функциональные элементы помощника AAV могут быть представлены любой из множества форм, в том числе без ограничения вирусом-помощником или генами вируса-помощника, которые способствуют репликации и упаковке AAV. Из уровня техники известны другие функциональные элементы помощника AAV, такие как
- 20 генотоксичные средства.

Термин "вирус-помощник" для AAV относится к вирусу, который обеспечивает возможность репликации и упаковки AAV (который является дефектным парвовирусом) в клетке-хозяине. Было идентифицировано множество таких вирусов-помощников, в том числе аденоовириусы, герпесвириусы, поксивириусы, такие как вирус осповакцины, и

- 25 бакуловириус. Аденоовириусы охватывают множество различных подгрупп, однако наиболее широко применяется аденоовириус 5 типа подгруппы C (Ad5). Многочисленные аденоовириусы человека, млекопитающих, отличных от человека, и птиц, известны и доступны из депозитариев, таких как ATCC. Вирусы семейства герпесвириусов, которые также доступны из депозитариев, таких как ATCC, включают, например, вирусы
- 30 простого герпеса (HSV), вирусы Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловириусы (CMV) и вирусы псевдобешенства (PRV). Бакуловириусы, доступные из депозитариев, включают вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica*.

Термин "процентная (%) идентичность последовательностей" относительно эталонной полипептидной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты

- 35 определяется как процентная доля аминокислотных остатков или нуклеотидов в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам или нуклеотидам в эталонной полипептидной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты после выравнивания последовательностей и, при необходимости, введения гэпов для достижения максимальной процентной идентичности
- 40 последовательностей, и не учитывая любые консервативные замены как часть идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах компетенции специалиста в данной области техники, например с помощью
- 45 общедоступных компьютерных программ, например описанных в Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1987), Supp. 30, section 7.7.18, Table 7.7.1, и в том числе программного обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Потенциальной программой выравнивания является ALIGN Plus (Scientific and Educational

Software, Пенсильвания). Специалисты в данной области техники способны определить соответствующие параметры для оценки выравнивания, в том числе любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по полной длине сравниваемых последовательностей. Для целей данного документа % идентичность

- 5 аминокислотной последовательности, свойственная данной аминокислотной последовательности А, в отношении данной аминокислотной последовательности В, с ней или в сравнении с ней (что в качестве альтернативы можно перефразировать как данная аминокислотная последовательность А, которая характеризуется или обладает определенной % идентичностью аминокислотной последовательности в отношении
- 10 данной аминокислотной последовательности В, с ней или в сравнении с ней), рассчитывается следующим образом: 100 умножить на частное от X/Y, где X представляет собой число аминокислотных остатков, учитываемых в качестве идентичных совпадений программой для выравнивания последовательностей в данном программном выравнивании А и В, и где Y представляет собой общее число
- 15 аминокислотных остатков в В. Следует принимать во внимание, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичность аминокислотной последовательности А в отношении В не будет равна % идентичности аминокислотной последовательности В в отношении А. Для целей данного документа % идентичность последовательности
- 20 нукleinовой кислоты, свойственная данной последовательности нукleinовой кислоты С, в отношении данной последовательности нукleinовой кислоты D, с ней или в сравнении с ней (что в качестве альтернативы можно перефразировать как данная последовательность нукleinовой кислоты С, которая характеризуется или обладает определенной % идентичностью последовательности нукleinовой кислоты в отношении
- 25 данной последовательности нукleinовой кислоты D, с ней или в сравнении с ней), рассчитывается следующим образом: 100 умножить на частное от W/Z, где W представляет собой число нуклеотидов, учитываемых в качестве идентичных совпадений программой для выравнивания последовательностей в данном программном выравнивании С и D, и где Z представляет собой общее число нуклеотидов в D. Следует
- 30 принимать во внимание, что если длина последовательности нукleinовой кислоты С не равна длине последовательности нукleinовой кислоты D, то % идентичность последовательности нукleinовой кислоты С в отношении D не будет равна % идентичности последовательности нукleinовой кислоты D в отношении С.

Термин "выделенная" молекула (например, нукleinовая кислота или белок) или

- 35 клетка означает, что она была идентифицирована и отделена и/или извлечена из компонента своего природного окружения.

"Эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для достижения полезных или требуемых результатов, в том числе клинических результатов (например, уменьшение интенсивности симптомов, достижение клинических конечных

- 40 точек и т.п.). Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений. Применительно к болезненному состоянию, эффективным количеством является количество, достаточное для уменьшения интенсивности, стабилизации или задержки развития заболевания. Например, эффективное количество частицы гAAV экспрессирует требуемое количество гетерологичной нукleinовой кислоты, такой как терапевтический
- 45 полипептид или терапевтическая нукleinовая кислота.

"Индивидуум" или "субъект" является млекопитающим. Млекопитающие включают без ограничения одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и отличных от человека приматов, таких как

обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект является человеком.

Термин "лечение", используемый в данном документе, представляет собой подход для получения полезных или требуемых клинических результатов. Для целей настоящего изобретения полезные или требуемые клинические результаты включают без ограничения смягчение симптомов, снижение степени заболевания, стабилизированное (например, не ухудшающееся) состояние заболевания, предотвращение распространения (например, метастазирования) заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное облегчение состояния заболевания и ремиссию (частичную или полную), выявляемые или невыявляемые. Термин "лечение" может означать также продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в случае неполучения лечения.

При использовании в отношении гена или кодирующей последовательности "N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза (также называемая GlcNAc-1-фосфотрансфераза или GNPTAB)" относится к полинуклеотидной последовательности, кодирующей альфа- и бета-субъединицы фермента, который катализирует химическую реакцию, включающую в себя образование N-ацетил-глюкозаминил-фосфо-D-маннозы лизосомального фермента и UMP из UDP-N-ацетил-D-глюкозамина и D-маннозы лизосомального фермента (код ЕС 2.7.8.17). При использовании в отношении полипептида "N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза (также называемая GlcNAc-1-фосфотрансфераза или GNPTAB)" относится к альфа- и бета-субъединицам вышеупомянутого фермента (Kudo, M. et al., J Biol Chem. 2005, 280(43):36141-9; Gelfman, CM et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007, 48(11):5221-5228). Известно, что полный ферментный комплекс GlcNAc-1-фосфотрансферазы включает в себя субъединицы α_2 ,

β_2 и γ_2 , из которых альфа- и бета-субъединицы необходимы для каталитической активности. Любой фермент, для которого известно или предсказано, что он катализирует реакцию, описанную под кодом ЕС 2.7.8.17, и/или выполняет молекулярную функцию, описанную в терминологии генной онтологии (GO) как GO: 0003976, может представлять собой GNPTAB по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB представляет собой вариант GNPTAB. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB представляет собой усеченную GNPTAB. В некоторых вариантах осуществления размер нукleinовой кислоты, кодирующей GNPTAB, составляет

приблизительно 4,7 т.о. В некоторых вариантах осуществления размер нукleinовой кислоты, кодирующей GNPTAB, составляет менее чем приблизительно 4,7 т.о. В некоторых вариантах осуществления варианта (например, усеченная) GNPTAB содержит альфа- и бета-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления варианта GNPTAB (например, усеченная GNPTAB) является по меньшей мере на приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным нативной GNPTAB. В некоторых вариантах осуществления варианта GNPTAB (например, усеченная GNPTAB) сохраняет по меньшей мере приблизительно 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% или 10% активность нативной GNPTAB. Примеры GNPTAB человека представлены под номерами доступа в GenBank NP_077288.2 и NM_024312.4. Пример аминокислотной последовательности GNPTAB человека представлен под SEQ ID NO:

1. Примеры GNPTAB мыши представлены под номером доступа в GenBank NP_001004164. Пример аминокислотной последовательности GNPTAB мыши представлен под SEQ ID NO:2. Дополнительные примеры GNPTAB представлены под номерами доступа GenBank XP_001155334 и XP_509312 (Pan troglodytes), XP_002687680 и NP_001179157 (Bos taurus), XP_416329 (Gallus gallus), XP_532667 (Canis familiaris),

XP_001497199 (*Equus caballus*), XP_001079967, и XP_343195 (*Rattus norviegicus*), и NP_001038233 (*Danio rerio*).

"Муколипидоз типа II" (термины MLII, ML-II, и ML типа II могут использоваться в данном документе взаимозаменяю) и "муколипидоз типа III" (термины MLIII, ML-III и ML типа III могут использоваться в данном документе взаимозаменяю) относятся к классу заболеваний, вызванных мутациями в гене GNPTAB. Оба заболевания являются аутосомно-рецессивными нарушениями. Однако MLIII обычно ассоциирован с мутациями, вызывающими более умеренную потерю функции GNPTAB по сравнению с MLII. Таким образом, MLII обычно приводит к более тяжелым фенотипам заболевания, чем MLIII. MLII также известен как I-клеточная болезнь. Дополнительное описание MLII можно найти в записи OMIM #252500. MLIII также известен как псевдополидистрофия Гурлер. Дополнительное описание MLIII можно найти в записи OMIM #252600.

"Промотор β -актина курицы (CBA)" относится к полинуклеотидной

последовательности, полученной из гена β -актина курицы (например, гена бета-актина Gallus gallus, представленного геном с ID 396526 в GenBank Entrez). Как используется в данном документе, "промотор β -актина курицы" может относиться к промотору, содержащему ранний энхансерный элемент цитомегаловируса (CMV), промотор и первый экзон и инtron гена β -актина курицы, а также акцепторный сайт сплайсинга гена бета-глобина кролика, такому как последовательности, описанные в Miyazaki, J., et al. (1989) Gene 79(2):269-77. Используемый в данном документе термин "промотор CAG" может использоваться взаимозаменяю. Используемый в данном документе термин "ранний энхансер CMV/промотор бета-актина курицы (CAG)" может использоваться взаимозаменяю.

Укороченный промотор бета-актина курицы выбрали на основе исследований делеции, которые продемонстрировали, что последовательности выше -106 можно удалить без существенного влияния на активность промотора (Quitschke et al., J. Biol. Chem. 264:9539-9546, 1989).

Ссылка на термин "приблизительно" в отношении значения или параметра в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на данное значение или параметр *per se*. Например, описание, относящееся к "приблизительно X", включает описание "X".

Формы единственного числа, используемые в данном документе, включают ссылки на множественное число, если не указано иное.

Понятно, что аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, включают аспекты и варианты осуществления "содержащие", "состоящие из" и/или "состоящие практически из".

III. Векторы

В определенных аспектах настоящее изобретение предусматривает векторы на основе гAAV, например, подходящие для применения в любом из способов, частичах гAAV и/или фармацевтических композициях, описанных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления гетерологичную нуклеиновую кислоту (например, полинуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный полипептид GNPTAB) доставляют субъекту посредством вектора на основе гAAV по настоящему изобретению.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к альфа- и бета-субъединицам N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазы (GNPTAB), например полипептидам GNPTAB или нуклеиновым кислотам, кодирующими полипептид GNPTAB.

Как известно из уровня техники, фермент N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансфераза (также известный как N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза) включает в себя две альфа-, две бета- и две гамма-субъединицы. Альфа- и бета-субъединицы кодируются геном GNPTAB (также известным как GNPTA, I-клеточная болезнь или ICD, или

- 5 EG432486, или mKIAA1208 у мыши). Примеры генов GNPTAB включают, например, GNPTAB человека (например, как описано под NCBI Gene ID №79158) и GNPTAB мыши (например, как описано под NCBI Gene ID №432486).

В некоторых вариантах осуществления полипептид GNPTAB может представлять собой полипептид GNPTAB человека. Последовательность полипептида GNPTAB 10 человека может включать без ограничения эталонную последовательность NCBI №NP_077288. В некоторых вариантах осуществления полипептид GNPTAB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления полипептид GNPTAB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 15 81%, по меньшей мере на приблизительно 82%, по меньшей мере на приблизительно 83%, по меньшей мере на приблизительно 84%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 86%, по меньшей мере на приблизительно 87%, по меньшей мере на приблизительно 88%, по меньшей мере на приблизительно 89%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 20 91%, по меньшей мере на приблизительно 92%, по меньшей мере на приблизительно 93%, по меньшей мере на приблизительно 94%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 25 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB представляет собой усеченную GNPTAB. В некоторых вариантах осуществления размер нуклеиновой кислоты, кодирующей GNPTAB, составляет приблизительно 4,7 т.о. В некоторых вариантах осуществления размер нуклеиновой кислоты, кодирующей GNPTAB, составляет менее чем приблизительно 30 4,7 т.о. В некоторых вариантах осуществления вариант (например, усеченный) GNPTAB содержит альфа- и бета-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления полипептид GNPTAB представляет собой вариант полипептида GNPTAB (например, усеченный GNPTAB), который сохраняет по меньшей мере часть активности полипептида GNPTAB дикого типа (например, по меньшей мере приблизительно любую из 5%, 10%, 25%, 50%, 75% или 100% активности GNPTAB дикого типа). В некоторых вариантах осуществления 35 35 варианта полипептида GNPTAB (например, усеченный GNPTAB) характеризуется большей активностью по сравнению с полипептидом GNPTAB дикого типа (например, по меньшей мере приблизительно любой из 125%, 150%, 200%, 300% или 500% большей активности по сравнению с GNPTAB дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота 40 (например, нуклеиновая кислота, кодирующая GNPTAB) функционально связана с промотором. Иллюстративные промоторы включают без ограничения немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, промотор гена фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор вируса обезьян 40 (SV40) и промотор СК6, промотор гена транстиреина (TTR), промотор ТК, тетрациклин-чувствительный 45 промотор (TRE), промотор HBV, промотор hAAT, LSP-промотор, химерные печень-специфические промоторы (LSP), промотор E2F, промотор гена теломеразы (hTERT); составной энхансер цитомегаловируса/промотор гена бета-актина курицы/промотор гена β-глобина кролика (промотор CAG; Niwa et al., Gene, 1991, 108(2):193-9) и промотор

фактора элонгации 1-альфа (EF1-альфа) (Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23 и Guo et al., Gene Ther., 1996, 3(9):802-10). Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит промотор β -глюкуронидазы человека или энхансер

- 5 цитомегаловируса (CMV), соединенный с промотором β -актина курицы (СВА). В некоторых вариантах осуществления промотор содержит модифицированный или усеченный промотор СВА. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит укороченный энхансер CMV.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит инtron. Например, в

- 10 некоторых вариантах осуществления инtron представляет собой химерный инtron, полученный из бета-актина курицы и бета-глобина кролика. В некоторых вариантах осуществления инtron представляет собой инtron мелкого вируса мышей (MVM).

15 В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность полиаденилирования (поли(A)). Из уровня техники известны многочисленные примеры последовательностей полиаденилирования, такие как последовательность поли(A) бычьего гормона роста (BGH) (см., например, номер доступа EF592533), последовательность полиаденилирования SV40 и последовательность полиаденилирования рA TK HSV.

20 Не желая ограничиваться теорией, вследствие большого размера кодирующей последовательности GNPTAB может быть выгодно минимизировать размер других элементов вектора на основе rAAV (например, промотора, энхансера, интрана, последовательности поли(A) и т. д.). В некоторых вариантах осуществления укороченный вариант любого из промоторов, описанных в данном документе, можно использовать в векторе на основе rAAV. Способы получения укороченного варианта

- 25 промотора (например, вышеуказанного промотора) известны из уровня техники.

Например, представляющий интерес промотор можно мутировать путем введения делеций и/или замен одного или нескольких нуклеотидов в последовательность промотора, и такие варианты последовательностей промотора можно индивидуально клонировать в векторы, которые включают в себя конструкцию репортера под

30 регуляцией каждой последовательности промотора. Эту систему можно использовать для идентификации укороченных вариантов промотора, которые сохраняют указанную силу (например, количество произведенного транскрипта). В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV по настоящему изобретению может включать в себя модифицированный, усеченный и/или укороченный энхансер CMV/промотор

35 СВА, например, как описано в данном документе. Аналогичные способы можно использовать для идентификации укороченных вариантов интрана, которые сохраняют надлежащие уровни транскрипции, стабильности mRNA и/или сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV по настоящему изобретению может включать в себя укороченный инtron, как описано в данном документе. Аналогичные

40 способы можно использовать для идентификации укороченных вариантов последовательности поли(A), которые сохраняют надлежащие уровни транскрипции, стабильности mRNA и/или полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV по настоящему изобретению может включать в себя укороченную последовательность поли(A), как описано в данном документе. В

45 некоторых вариантах осуществления ген GTNAP содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1 или 2.

Настоящее изобретение рассматривает применение рекомбинантного вирусного

генома для введения одной или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих терапевтический полипептид и/или нуклеиновую кислоту, для упаковки в вирусную частицу гAAV. Рекомбинантный вирусный геном может содержать любой элемент для осуществления экспрессии терапевтического полипептида и/или нуклеиновой кислоты, например, промотор, ITR по настоящему изобретению, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер, инtron, сигнал поли(A) и/или точку начала репликации.

IV. Вирусные частицы и способы получения вирусных частиц

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к частицам гAAV,

- 5 10 например, содержащим вектор на основе гAAV по настоящему изобретению. В частице AAV нуклеиновая кислота заключена в капсид частицы AAV. Частица AAV также содержит капсидные белки. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит представляющую(-ие) интерес кодирующую(-ие) последовательность(-и) (например, кодирующую последовательность GNPTAB), функционально связанные
- 15 20 компоненты в направлении транскрипции, контролирующие последовательности, в том числе последовательности инициации и терминации транскрипции, с образованием таким образом кассеты экспрессии. Кассета экспрессии фланкирована на 5'- и 3'-конце по меньшей мере одной функциональной последовательностью ITR AAV. Под "функциональными последовательностями ITR AAV" подразумевается, что последовательности ITR функционируют в качестве предполагаемых для спасения, репликации и упаковки вириона AAV. См. Davidson et al., PNAS, 2000, 97(7):3428-32; Passini et al., J. Virol., 2003, 77(12):7034-40; и Pechan et al., Gene Ther., 2009, 16:10-16, все из которых включены в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки. Для осуществления на практике некоторых аспектов настоящего изобретения
- 25 30 рекомбинантные векторы содержат по меньшей мере все последовательности AAV, необходимые для заключения в капсид, и физические структуры для инфицирования с помощью гAAV. ITR AAV для применения в векторах по настоящему изобретению не обязательно должны иметь нуклеотидную последовательность дикого типа (например, как описано в Kotin, Hum. Gene Ther., 1994, 5:793-801), и могут быть изменены путем вставки, делеции или замены нуклеотидов, или ITR AAV можно получить из любого из нескольких серотипов AAV. На сегодняшний день известно более 40 серотипов AAV, и продолжают идентифицировать новые серотипы и варианты существующих серотипов. См. Gao et al., PNAS, 2002, 99(18): 11854-6; Gao et al., PNAS, 2003, 100(10):6081-6; и Bossis et al., J. Virol., 2003, 77(12):6799-810. Применение AAV любого серотипа рассматривается в пределах объема настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой вектор, полученный из серотипа AAV, включая без ограничения ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV козы, AAV крупного рогатого скота или ITR AAV мыши и т. п. В некоторых вариантах осуществляния нуклеиновая кислота в AAV содержит ITR из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV козы, AAV крупного рогатого скота или ITR AAV мыши и т. п.
- 35 40 45

В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит белок для заключения

- в капсид, выбранный из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (например, капсид AAV6 дикого типа или капсид варианта AAV6, такого как ShH10, как описано в публикации заявки на патент США 2012/0164106, опубликованной до выдачи патента), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (например, капсид AAV9 дикого типа или капсид

модифицированного AAV9, как описано в публикации заявки на патент США 2013/0323226, опубликованной до выдачи патента), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, мутантного по тирозину капсида, мутантного капсида с гепарин-связывающим мотивом, капсида AAV2R471A, капсида AAVAAV2/2-7m8, капсида AAV DJ (например, капсида

- 5 AAV-DJ/8, капсида AAV-DJ/9 или любого другого из капсидов, описанных в публикации заявки на патент США 2012/0066783, опубликованной до выдачи патента), капсида AAV2 N587A, капсида AAV2 E548A, капсида AAV2 N708A, капсида AAV V708K, капсида AAV козы, химерного капсида AAV1/AAV2, капсида AAV крупного рогатого скота, капсида AAV мыши, капсида rAAV2/HBoV1, или капсида AAV, описанного в патенте
- 10 США №8283151 или в Международной публикации №WO/2003/042397. В дополнительных вариантах осуществления частица rAAV содержит капсидные белки AAV определенного серотипа из клад A-F.

Для оптимизации трансдукции определенных клеток-мишеней или для нацеливания специфических типов клеток в пределах определенной ткани-мишени (например, большой ткани) используются различные серотипы AAV. Частица rAAV может содержать белки вируса и нуклеиновые кислоты вируса одного и того же серотипа или смешанного серотипа. Например, частица rAAV может содержать один или несколько ITR и капсид, полученные из одного и того же серотипа AAV, или частица rAAV может содержать один или несколько ITR, полученных из серотипа AAV, отличного от такового для 20 капсида частиц rAAV. В определенных вариантах осуществления частица rAAV содержит капсид AAV8 и один или несколько (например, 2) ITR AAV2.

Получение частиц AAV

Из уровня техники известны многочисленные способы получения векторов на основе rAAV, в том числе трансфекция, стабильное продуцирование клеточной линии и системы 25 получения инфекционных гибридных вирусов, которые включают в себя гибриды аденовирус-AAV, гибриды герпесвирус-AAV (Conway, JE et al., (1997) J. Virology 71(11) :8780-8789) и гибриды бакуловирус-AAV (Urabe, M. et al., (2002) Human Gene Therapy 13 (16):1935-1943; Kotin, R. (2011) Hum Mol Genet. 20(R1): R2-R6). Всем производственным культурам rAAV для получения вирусных частиц rAAV необходимы: 1) подходящие 30 клетки-хозяева, 2) подходящие функциональные элементы вируса-помощника, 3) гены гер и сар AAV и генные продукты; 4) нуклеиновая кислота (такая как терапевтическая нуклеиновая кислота), фланкированная по меньшей мере одной из последовательностей ITR AAV (например, геном AAV, кодирующий GNPTAB); и 5) подходящая среда и компоненты среды для поддержки производства rAAV. В некоторых вариантах 35 осуществления подходящая клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, полученную от примата. В некоторых вариантах осуществления подходящая клетка-хозяин представляет собой линии клеток, полученные от человека, такие как клетки HeLa, A549, 293 или Perc.6. В некоторых вариантах осуществления подходящий функциональный элемент вируса-помощника обеспечивается аденовирусом дикого 40 типа или мутантным аденовирусом (таким как термочувствительный аденовирус), вирусом герпеса (HSV), бакуловирусом или плазмидной конструкцией, обеспечивающей функциональные элементы помощника. В некоторых вариантах осуществления 45 продукции генов гер и сар AAV могут происходить из AAV любого серотипа. В целом, но не обязательно, продукт гена гер AAV относится к тому же серотипу, что и ITR из генома вектора на основе rAAV, при условии, что продукты гена гер могут обеспечивать возможность репликации и упаковки генома rAAV. Для получения векторов на основе rAAV можно применять подходящие среды, известные из уровня техники. Эти среды включают без ограничения среды, производимые Hyclone Laboratories и JRH, в том числе

5 модифицированную среду Игла (MEM), среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), изготавливаемые по заказу составы, такие как описанные в патенте США №6566118, и среду Sf-900 II SFM, описанную в патенте США №6723551, каждый из которых включен в данный документ с помощью ссылки во всей своей полноте, в
10 особенности в отношении изготавливаемых по заказу составов сред для применения в производстве рекомбинантных векторов на основе AAV. В некоторых вариантах осуществления функциональные элементы помощника AAV представлены аденоизирусом или HSV. В некоторых вариантах осуществления функциональные элементы помощника AAV представлены бакуловирусом, а клетка-хозяин представляет собой клетку насекомого (например, клетки *Spodoptera frugiperda* (Sf9)).

Один способ получения частиц гAAV представляет собой способ тройной трансфекции. Вкратце, плазмиду, содержащую ген гер и ген капсидного белка, вместе с аденоизирусной плазмидой-помощником, можно ввести путем трансфекции (например, с использованием способа с фосфатом кальция) в линию клеток (например, клеток HEK-293), и вирус можно собрать и факультативно очистить. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления частица гAAV была получена с помощью тройной трансфекции в клетку-хозяина нуклеиновой кислоты, кодирующей вектор на основе гAAV, нуклеиновой кислоты, кодирующей гер и кап AAV, и нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы вируса-помощника AAV, при этом трансфекция 20 нуклеиновых кислот в клетки-хозяева приводит к получению клетки-хозяина, способной продуцировать частицы гAAV.

В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV можно получить с помощью способа с линией клеток-продуцентов (см. Martin et al., (2013) Human Gene Therapy Methods 24:253-269; в публикации заявки на патент США №US2004/0224411, опубликованной 25 до выдачи патента; и Liu, X.L. et al. (1999) Gene Ther. 6:293-299). Вкратце, линию клеток (например, линию клеток HeLa, 293, A549 или Perc.6) можно стабильно трансфицировать плазмидой, содержащей ген гер, ген капсидного белка и векторный геном, содержащий последовательность промотор-гетерологичная нуклеиновая кислота (например, GNPTAB). Линии клеток можно подвергать скринингу для отбора лидерного клона 30 для получения гAAV, который можно затем размножать в производственном биореакторе и инфицировать вирусом-помощником (например, аденоизирусом или HSV), чтобы инициировать продукцию гAAV. Затем вирус можно собрать, аденоизирус можно инактивировать (например, действием тепла) и/или удалить, а частицы гAAV можно очистить. В связи с этим, в некоторых вариантах осуществления частица гAAV 35 была получена с помощью линии клеток-продуцентов, содержащих одну или несколько из нуклеиновой кислоты, кодирующей вектор на основе гAAV, нуклеиновой кислоты, кодирующей гер и кап AAV, и нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы вируса-помощника AAV. Как описано в данном документе, способ с линией клеток-продуцентов может быть преимущественным для получения частиц гAAV с 40 увеличенным в размере геномом по сравнению со способом тройной трансфекции.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая гены гер и кап AAV, и/или геном гAAV стабильно поддерживаются в линии клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую гены гер и кап AAV, и/или геном гAAV вводят в линию клеток в одной или нескольких плазмидах 45 с целью создания линии клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления гер AAV, кап AAV и геном гAAV вводят в клетку в той же плазмиде. В других вариантах осуществления гер AAV, кап AAV и геном гAAV вводят в клетку в разных плазмидах. В некоторых вариантах осуществления линия клеток, стабильно трансфицированная

плазмидой, поддерживает плазмиду в течение нескольких пассажей линии клеток (например, 5, 10, 20, 30, 40, 50 или более чем 50 пассажей клетки). Например, плазмида (-ы) может(могут) реплицироваться при делении клетки, или плазмида(-ы) может(могут) интегрироваться в геном клетки. Было идентифицировано множество

- 5 последовательностей, которые позволяют плазмиде реплицироваться автономно в клетке (например, человеческой клетке) (см., например, Krysan, P.J. et al. (1989) Mol. Cell Biol. 9:1026-1033). В некоторых вариантах осуществления плазмида(-ы) может(могут) содержать селектируемый маркер (например, маркер резистентности к антибиотику), который позволяет отбирать клетки, поддерживающие плазмиду. Селектируемые
- 10 маркеры, обычно используемые в клетках млекопитающих, включают без ограничения бластицидин, G418, гигромицин В, зеоцин, пуромицин и их производные. Способы введения нуклеиновых кислот в клетку известны из уровня техники и включают без ограничения вирусную трансдукцию, катионную трансфекцию (например, с использованием катионного полимера, такого как DEAE-декстран, или катионного
- 15 липида, такого как липофектамин), трансфекцию фосфатом кальция, микроГИБЕКцию, бомбардировку частицами, электропорацию и трансфекцию наночастицами (более подробно см., например, Kim, T.K. and Eberwine, J.H. (2010) Anal. Bioanal. Chem. 397:3173-3178).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая гены гер 20 и кап AAV, и/или геном гAAV стабильно интегрированы в геном линии клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую гены гер и кап AAV, и/или геном гAAV вводят в линию клеток в одной или нескольких плазмидах с целью создания линии клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления гер AAV, кап AAV и геном гAAV вводят в клетку в той же 25 плазмиде. В других вариантах осуществления гер AAV, кап AAV и геном гAAV вводят в клетку в разных плазмidaх. В некоторых вариантах осуществления плазмида(-ы) может(могут) содержать селектируемый маркер (например, маркер резистентности к антибиотику), который позволяет отбирать клетки, поддерживающие плазмиду.

Способы стабильной интеграции нуклеиновых кислот в различные линии клеток-хозяев 30 известны из уровня техники. Например, повторный отбор (например, с применением селектируемого маркера) можно использовать для отбора клеток, которые интегрировали нуклеиновую кислоту, содержащую селектируемый маркер (а также гены кап и гер AAV и/или геном гAAV). В других вариантах осуществления нуклеиновые кислоты могут быть интегрированы в линию клеток сайт-специфичным образом с 35 целью создания линии клеток-продуцентов. Из уровня техники известно несколько сайт-специфичных систем рекомбинации, таких как FLP/FRT (см., например, O'Gorman, S. et al. (1991) Science 251:1351-1355), Cre/loxP (см., например, Sauer, B. and Henderson, N. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5166-5170) и phi C31-att (см., например, Groth, A.C. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. 97:5995-6000).

- 40 В некоторых вариантах осуществления линия клеток-продуцентов получена из линии клеток примата (например, линии клеток примата, отличного от человека, такой как линия клеток Vero или FRhL-2). В некоторых вариантах осуществления линия клеток получена из линии клеток человека. В некоторых вариантах осуществления линия клеток-продуцентов получена из клеток HeLa, 293, A549 или PERC.6® (Crucell).
- 45 Например, до введения и/или стабильного поддержания/интеграции нуклеиновой кислоты, кодирующей гены гер и кап AAV и/или геном гAAV увеличенного размера, в линию клеток с получением линии клеток-продуцентов, линия клеток представляет собой линию клеток HeLa, 293, A549 или PERC.6® (Crucell) или их производную.

В некоторых вариантах осуществления линия клеток-продуцентов адаптирована для роста в супензии. Как известно из уровня техники, субстратзависимые клетки, как правило, не способны расти в супензии без субстрата, такого как гранулы-микроносители. Адаптация линии клеток к росту в супензии может включать, например,

- 5 выращивание линии клеток в культурах с постоянным перемешиванием с помощью перемешивающей лопасти, с использованием культуральной среды, не содержащей ионов кальция и магния с целью предотвращения агрегации (и необязательно противовспенивающего средства), с использованием сосуда для культивирования, покрытого силиконизирующим соединением, и отбор клеток в культуре (скорее в
- 10 больших комках или на стенках сосуда) при каждом пассаже. Для дополнительного описания см., например, документ ATCC с часто задаваемыми вопросами (режим доступа www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx) и ссылки, цитируемые в нем.

- 15 В некоторых аспектах предусмотрен способ получения любой частицы rAAV, раскрываемой в данном документе, предусматривающий: (a) культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых получают частицы rAAV, при этом клетка-хозяин содержит (i) один или несколько генов AAV, обеспечивающих упаковку, где каждый указанный ген AAV, обеспечивающий упаковку, кодирует белок AAV, участвующий в
- 20 репликации и/или заключении в капсид; (ii) провектор на основе rAAV, содержащий нукleinовую кислоту, кодирующую гетерологичную нукleinовую кислоту, как описано в данном документе, flankированный по меньшей мере одним ITR AAV, и (iii) функциональный элемент помощника AAV; и (b) извлечение частиц rAAV, получаемых в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления указанный по меньшей мере
- 25 один ITR AAV выбран из группы, состоящей из ITR серотипов AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AA VRh8, AA VRh8R, AAV9, AAV10, AA VRh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV козы, AAV крупного рогатого скота или AAV мыши и т. п. Например, в некоторых вариантах осуществления серотип AAV представляет собой AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AA VRh8, AA VRh8R, AAV9, AAV10 или
- 30 AA VRh10. В определенных вариантах осуществления нукleinовая кислота в AAV содержит ITR AAV2. В некоторых вариантах осуществления указанный белок, участвующий в заключении в капсид, выбран из группы, состоящей из капсидных белков серотипов AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AA VRh8, AA VRh8R, AAV9, AAV10, AA VRh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV
- 35 DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, капсида AAV козы, химерного AAV1/AAV2, AAV крупного рогатого скота или AAV мыши, rAAV2/HBoV1 или их мутантов. В некоторых вариантах осуществления белок, участвующий в заключении в капсид, представляет собой белок капсида AAV8. В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV содержат капсид AAV8 и рекомбинантный геном,
- 40 содержащий ITR AAV2 и нукleinовую кислоту, кодирующую терапевтический трансген/нукleinовую кислоту (например, нукleinовую кислоту, кодирующую GNPTAB).

- 45 Подходящие культуральные среды для получения rAAV по настоящему изобретению могут быть дополнены сывороткой или рекомбинантными белками, полученными из сыворотки, на уровне 0,5%-20% (об./об. или вес/об.). Как альтернатива, как известно из уровня техники, векторы на основе rAAV можно получать в бессывороточных условиях, которые также могут называться средой, не содержащей продуктов животного происхождения. Специалист обычной квалификации в данной области техники может понять, что коммерческие или оригинальные среды, разработанные для способствования

получению векторов на основе гAAV, также могут быть дополнены одним или несколькими компонентами для культур клеток, известными из уровня техники, включающими без ограничения глюкозу, витамины, аминокислоты и/или факторы роста, в целях повышения титра гAAV в культурах для получения.

- 5 Культуры для получения гAAV можно выращивать при различных условиях (в широком диапазоне температур, в течение различных промежутков времени и т. п.), подходящих для конкретной используемой клетки-хозяина. Как известно из уровня техники, культуры для получения гAAV включают культуры, зависимые от прикрепления, которые можно культивировать в подходящих сосудах для культур,
- 10 зависимых от прикрепления, как например, в роллерных флаconах, на фильтрах из полых волокон, на микроносителях и в биореакторах со слоем носителя или псевдоожженным слоем. Культуры для получения векторов на основе гAAV также могут включать клетки-хозяева, приспособленные к супензионному росту, такие как клетки HeLa, 293 и SF-9, которые можно культивировать разнообразными способами,
- 15 15 в том числе, например, во флаconах с перемешиванием, биореакторах с механическим перемешиванием и одноразовых системах, таких как резервуарная система Wave.

Частицы, представляющие собой вектор на основе гAAV по настоящему изобретению, можно собирать из культур для производства гAAV посредством лизиса клеток-хозяев в культуре для продуцирования или посредством сбора отработанной среды из культуры

- 20 для продуцирования, при условии, что клетки культивируют при условиях, которые, как известно из уровня техники, вызывают высвобождение частиц гAAV в среду из интактных клеток, как более подробно описано в патенте США №6566118. Подходящие способы лизиса клеток также известны из уровня техники и включают, например, несколько циклов замораживания/размораживания, обработку ультразвуком,
- 25 микрофлюидизацию и обработку химическими веществами, такими как детергенты и/или протеазы.

В дополнительном варианте осуществления частицы гAAV очищают. Термин "очищенный", используемый в данном документе, подразумевает препарат из частиц гAAV, в котором отсутствуют по меньшей мере некоторые другие компоненты, которые

- 30 могут также присутствовать в среде, где частицы гAAV встречаются в природе или из которой они изначально получены. Таким образом, например, выделенные частицы гAAV можно получать с использованием методики очистки для увеличения их концентрации в исходной смеси, такой как лизат культуры или надосадочная жидкость культуры для продуцирования. Обогащение можно измерять с помощью множества
- 35 способов, таких как, например, по доле устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) или копий генома (gc), присутствующих в растворе, или по инфекционности, или его можно измерять по отношению ко второму, потенциально вредному веществу, присутствующему в исходной смеси, такому как контаминаントы, в том числе контаминаントы из культуры для продуцирования или контаминаントы в ходе
- 40 продуцирования, в том числе вирус-помощник, компоненты среды и т. п.

В некоторых вариантах осуществления сбор культуры для продуцирования гAAV очищают от примесей для удаления дебриса из клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления сбор культуры для продуцирования очищают от примесей посредством фильтрации через серию пористых фильтров, включающих, например, модульный

- 45 фильтр Millipore Millistak+ HC марки D0HC, модульный фильтр Millipore Millistak+ HC марки A1HC и 0,2 мкм фильтр Opticap XL1O с гидрофильтрной мембраной фильтра Millipore Express SHC. Очистку от примесей также можно осуществлять с помощью ряда других стандартных методик, известных из уровня техники, таких как

центрифугирование или фильтрация через любой фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,2 мкм или больше, известный из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления сбор культуры для продуцирования гAAV дополнительно обрабатывают с помощью Benzonase® с целью расщепления любой высокомолекулярной ДНК, присутствующей в культуре для продуцирования. В некоторых вариантах осуществления расщепление с помощью Benzonase® осуществляют в стандартных условиях, известных из уровня техники, в том числе, например, при конечной концентрации 1-2,5 единиц Benzonase®/мл, при температуре, варьирующей в диапазоне от температуры окружающей среды до 37°C, в течение периода времени от 30 минут до нескольких часов.

Частицы гAAV можно выделять или очищать с использованием одной или нескольких из следующих стадий очистки: равновесного центрифугирования; проточной анионообменной фильтрации; тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для концентрирования частиц гAAV; захвата гAAV с помощью хроматографии на апатите; термоинактивации вируса-помощника; захвата гAAV с помощью хроматографии с гидрофобными взаимодействиями; замены буфера с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC); нанофильтрации и захвата гAAV с помощью анионообменной хроматографии, катионаобменной хроматографии или аффинной хроматографии. Эти стадии можно применять в отдельности, в различных комбинациях или в различном порядке. В некоторых вариантах осуществления способ включает все стадии в порядке, описанном ниже. Способы очистки частиц гAAV приведены, например, в Xiao et al., (1998) Journal of Virology 72:2224-2232; патентах США №№6989264 и 8137948; а также WO 2010/148143.

25 V. Способы лечения

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения муколипидоза типа II и/или муколипидоза типа III или увеличения размера тела, увеличения содержания минеральных веществ в костной ткани или увеличения минеральной плотности костной ткани у млекопитающего с муколипидозом типа II или муколипидозом типа III. Эти способы частично основаны на описанном в данном документе открытии того, что AAV-опосредованная экспрессия GNPTAB может уменьшать интенсивность симптомов MLII, таких как ухудшение роста костной ткани, на мышиной модели заболевания. Как описано выше, оба заболевания вызваны мутациями с потерей функции в гене GNPTAB, который кодирует каталитические альфа- и бета-субъединицы GlcNAc-1-фосфотрансферазы.

Известно, что MLII является аутосомно-рецессивным нарушением, вызванным мутациями в GNPTAB. Активность GNPTAB необходима, чтобы добавить манноза-6-фосфат к белкам, тем самым маркируя их для миграции в лизосому. Вместо этого, в отсутствие активности GNPTAB, лизосомальные белки (например, лизосомальные гидролазы) секретируются внеклеточно. В результате, вещества, которые обычно разрушаются в лизосомах, такие как гликозаминогликаны, липиды и олигосахариды, накапливаются в клетках, что приводит к наличию крупных включений. MLII также называют I-клеточной болезнью из-за присутствия этих клеток-включений ("I-клеток"), которые идентифицируются с помощью микроскопа. Симптомы MLII часто появляются вскоре после рождения и могут включать скелетные аномалии, низкорослость, слабый мышечный тонус, отсутствие мышечного тонуса (гипотония), грыжи (например, выступающий живот, пупочные грыжи), дислокацию тазобедренного сустава и деформации суставов, кардиомегалию, утолщение и недостаточность митрального

клапана, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, грубое и/или шумное дыхание, частые респираторные инфекции, запор, диарею, задержки в развитии общей и мелкой моторики, туготоухость и задержки развития, особенно речи и моторики, когнитивные нарушения. Эти симптомы являются изнурительными для 5 пациентов с MLII, которые обычно не способны самостоятельно передвигаться и не переживают период детства.

Как и MLII, MLIII известен из уровня техники как аутосомно-рецессивное нарушение, вызванное мутациями в GNPTAB. Однако по сравнению с MLII, MLIII обычно является результатом более слабых мутаций с потерей функции в GNPTAB и, таким образом, 10 характеризуется более умеренными фенотипами заболевания. Симптомы MLIII могут быть не полностью очевидны до 3-5 лет и весьма различны по степени тяжести, некоторые пациенты живут после 60 лет, в то время как другие не переживают детство. Симптомы MLIII обычно включают скелетные аномалии, низкорослость, аортальный порок сердца, помутнение роговицы, умеренную гипертрофию органов, потерю 15 подвижности и аномалии суставов. MLIII также назван псевдополидистрофией Гурлера. Для более подробного описания и конкретных мутаций, обнаруженных у пациентов с MLII и MLIII, см., например, Paik, K.H., et al. (2005) Hum. Mutat. 26(4):308-14.

Из уровня техники известны различные диагностические тесты для MLII и MLIII. В некоторых вариантах осуществления MLII и/или MLIII можно диагностировать путем 20 измерения активности одного или нескольких лизосомальных ферментов в образце сыворотки или другом образце от пациента (например, образце кожи или культивируемых фибробластов). Активность определенных лизосомальных ферментов в сыворотке может быть в 5-20 раз выше у пациентов с MLII, чем у нормальных пациентов. Аналогично, при MLIII сывороточная активность этих ферментов может 25 быть увеличена до 10 раз. Эти ферменты могут включать без ограничения бета-D-гексозаминидазу (код EC 3.2.1.52), бета-D-глюкуронидазу (код EC 3.2.1.31), бета-D-галактозидазу (код EC 3.2.1.23), альфа-L-фукозидазу (код EC 3.2.1.51) и альфа-D-маннозидазу (код EC 3.2.1.24). Для сравнения, эти активности в культивируемых 30 фибробластах могут быть недостаточными. В некоторых вариантах осуществления активность N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы можно измерить для диагностики MLII или MLIII. В некоторых вариантах осуществления у пациента, образец которого демонстрирует менее чем 1% активность N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы по сравнению с активностью образца от нормального пациента, можно диагностировать 35 MLII. В некоторых вариантах осуществления у пациента, образец которого демонстрирует активность N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы в пределах 1%-10% по сравнению с активностью образца от нормального пациента, можно диагностировать MLII.

В некоторых вариантах осуществления MLII и/или MLIII можно диагностировать 40 путем секвенирования локуса GNPTAB (например, кодирующей последовательности, последовательностей промотора/интрона или любых других контролирующих последовательностей) на наличие мутаций. MLII и MLIII также можно охарактеризовать по повышенному содержанию полисахаридов в моче и/или гликозаминогликанов в моче, однако эти симптомы могут быть неспецифическими для MLII и MLIII. В некоторых вариантах осуществления MLII и/или MLIII можно диагностировать 45 пренатально путем исследования хорионного образца, например, биопсии трофобласта (см., например, Roenagru, L., et al. (1984) Am. J. Hum. Genet. 36(6):1379-85). Как описано выше, при MLII I-клетки из образца от пациента (например, фибробластов) также можно идентифицировать с помощью микроскопии.

В некоторых вариантах осуществления лечение MLII и/или MLIII (например, вектор генной терапии по настоящему изобретению) можно проверить на терапевтическую эффективность. Например, в некоторых вариантах осуществления лечения MLII и/или MLIII может привести к увеличению прибавки роста, содержания минеральных веществ

- 5 в костной ткани, минеральной плотности костной ткани или может привести к уменьшению интенсивности одного или нескольких симптомов MLII и/или MLIII, описанных в данном документе. Эффективность введения гAAV можно контролировать по некоторым критериям, описанным в данном документе. Например, после лечения субъекта с применением способов по настоящему изобретению у субъекта можно
- 10 оценивать, например, улучшение, и/или стабилизацию, и/или задержку прогрессирования одного или нескольких признаков или симптомов болезненного состояния по одному или нескольким клиническим параметрам, включающим описанные в данном документе. Примеры таких тестов известны из уровня техники и включают объективные, а также субъективные (например, сообщаемые субъектами) показатели.

15 В некоторых вариантах осуществления экспрессию GNPTAB можно измерять для контроля терапевтической эффективности. Измерение экспрессии GNPTAB может относиться к измерению экспрессии mRNA и/или белка GNPTAB. Различные способы измерения экспрессии mRNA и/или белка известны из уровня техники, в том числе без ограничения qPCR (количественная ПЦР), нозерн-блоттинг, РНК-секвенирование, 20 полуколичественную ПЦР, вестерн-блоттинг, масс-спектрометрию, ELISA и т. д.

25 В некоторых вариантах осуществления активность одного или нескольких лизосомальных ферментов, в том числе без ограничения бета-D-гексозаминидазы (код EC 3.2.1.52), бета-D-глюкуронидазы (код EC 3.2.1.31), бета-D-галактозидазы (код EC 3.2.1.23), альфа-L-фукозидазы (код EC 3.2.1.51) и альфа-D-маннозидазы (код EC 3.2.1.24), можно измерить в образце пациента (например, образце сыворотки) для контроля терапевтической эффективности. Снижение активности лизосомальных ферментов в сыворотке может указывать на эффективность.

30 В некоторых вариантах осуществления улучшение функции сустава или конечности может указывать на эффективность. В некоторых вариантах осуществления улучшение речи может указывать на эффективность. В некоторых вариантах осуществления улучшение двигательной функции может указывать на эффективность. В некоторых вариантах осуществления увеличение темпов развития (например, увеличение прибавки роста) может указывать на эффективность. В некоторых вариантах осуществления, как описано в приведенных в данном документе примерах, минеральную плотность 35 костной ткани, содержание минеральных веществ в костной ткани и/или развитие (например, рост) можно оценить для контроля терапевтической эффективности. Способы контроля роста хорошо известны специалисту в данной области техники. Тесты для контроля минеральной плотности костной ткани и содержания минеральных веществ в костной ткани (например, тесты денситометрии кости) также хорошо известны 40 специалистам в данной области техники (например, как описано в данном документе) и могут включать без ограничения сканирование с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA), сканирование с помощью периферической двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (P-DEXA), двухфотонную абсорбциометрию (DPA) и сканирование с помощью компьютерной томографии (СТ).

45 В некоторых вариантах осуществления лечение MLII и/или MLIII (например, вектор генной терапии по настоящему изобретению) можно протестировать на животной модели. Животные модели для MLII и MLIII известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления лечение MLII и/или MLIII можно тестировать на мышиной

5 модели, такой как модель генетически модифицированной мыши, описанная в приведенных в данном документе примерах. В некоторых вариантах осуществления лечение MLII можно протестировать на кошачьей модели для MLII (см. Mazrier, H., et al. (2003) J. Hered. 94(5):363-73 или Bosshard, N.U., et al. (1996) Vet. Pathol. 33(1):1-13 для дополнительного описания).

10 Выбор конкретного вектора и композиции на основе гAAV зависит от ряда различных факторов, включающих без ограничения индивидуальный анамнез человека и характерные особенности состояния и индивидуума, подвергаемого лечению. Оценка этих характерных особенностей и разработка соответствующего режима терапии в конечном счете является ответственностью лечащего врача.

15 В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения MLII и/или MLIII путем введения эффективного количества частицы гAAV по настоящему изобретению. При этом гAAV можно вводить в конкретную представляющую интерес ткань, или ее можно вводить системно. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество гAAV можно вводить парентерально. Парентеральные пути введения могут включать без ограничения внутривенный, внутрибрюшинный, внутрекостный, внутриартериальный, интрацеребральный, внутримышечный, интракальвический, подкожный, интрацеребровентрикулярный, внутривеночный и т. д. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество гAAV можно вводить посредством одного пути введения. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество гAAV можно вводить посредством комбинации более чем одного пути введения. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество гAAV вводят в одно местоположение. В других вариантах осуществления эффективное количество гAAV можно вводить более чем в одно местоположение.

20 25 Эффективное количество гAAV (в некоторых вариантах осуществления в форме частиц) вводят в зависимости от целей лечения. Например, если при низкой процентной доле трансдукции можно достичь требуемого терапевтического эффекта, то целью лечения, как правило, является соответствие данному уровню трансдукции или его превышение. В некоторых случаях данного уровня трансдукции можно достичь путем 30 трансдукции лишь приблизительно 1-5% клеток-мишеней требуемого типа ткани, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 20% клеток требуемого типа ткани, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 50%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 80%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 35 приблизительно 95%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 99% клеток требуемого типа ткани. Композицию на основе гAAV можно вводить с помощью осуществления одного или нескольких введений, осуществляемых в ходе одной и той же процедуры или разделенных несколькими днями, неделями, месяцами или годами. Можно применять один или несколько из путей 40 введения, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления для лечения человека можно применять несколько векторов.

45 Способы идентификации клеток, трансдуцированных вирусными частицами AAV, известны из уровня техники; например, для выявления трансдукции вирусными частицами, например вирусными частицами, содержащими капсид гAAV с одной или несколькими аминокислотными заменами, можно применять иммуногистохимический анализ или маркер, такой как усиленный зеленый флуоресцентный белок.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество частиц гAAV вводят в более чем одно местоположение одновременно или последовательно. В других

вариантах осуществления эффективное количество частиц гAAV вводят в одно местоположение более одного раза (например, повторно). В некоторых вариантах осуществления многократные инъекции вирусных частиц гAAV осуществляют с интервалом не более чем один час, два часа, три часа, четыре часа, пять часов, шесть

5 часов, девять часов, двенадцать часов или 24 часа.

Эффективное количество гAAV (в некоторых вариантах осуществления в форме частиц) вводят в зависимости от целей лечения. Например, если при низкой процентной доле трансдукции можно достичь требуемого терапевтического эффекта, то целью

10 лечения, как правило, является соответствие данному уровню трансдукции или его превышение. В некоторых случаях этого уровня трансдукции можно достичь путем трансдукции лишь приблизительно 1-5% клеток-мишеней, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 20% клеток требуемого типа ткани, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 50%, в некоторых

15 вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 80%, в некоторых осуществления по меньшей мере приблизительно 95%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 99% клеток требуемого типа ткани. Композицию на основе гAAV можно вводить с помощью осуществления одного или

нескольких введений, осуществляемых в ходе одной и той же процедуры или разделенных несколькими днями, неделями, месяцами или годами. В некоторых вариантах

20 осуществления нескольких векторов можно применять для лечения млекопитающего (например, человека).

В некоторых вариантах осуществления композицию гAAV по настоящему изобретению можно применять для введения человеку. В некоторых вариантах осуществления композицию гAAV по настоящему изобретению можно применять для

25 введения в педиатрию. Не желая ограничиваться теорией, поскольку многие из симптомов MLII и MLIII развиваются по своей природе в процессе становления организма (например, нарушения развития, конечностей и суставов, задержки речи и моторики), может быть особенно выгодно лечить MLII и/или MLIII как можно в более раннем возрасте. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество гAAV (в

30 некоторых вариантах осуществления в форме частиц) вводят пациенту в возрасте менее одного месяца, менее двух месяцев, менее трех месяцев, менее четырех месяцев, менее пяти месяцев, менее шести месяцев, менее семи месяцев, менее восьми месяцев, менее девяти месяцев, менее десяти месяцев, менее одиннадцати месяцев, менее одного года, менее 13 месяцев, менее 14 месяцев, менее 15 месяцев, менее 16 месяцев, менее 17 месяцев,

35 менее 18 месяцев, менее 19 месяцев, менее 20 месяцев, менее 21 месяца, менее 22 месяцев, менее двух лет или менее трех лет.

В некоторых вариантах осуществления композицию гAAV по настоящему изобретению можно применять для введения взрослому субъекту молодого возраста. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество гAAV (в некоторых

40 вариантах осуществления в форме частиц) вводят пациенту в возрасте менее 12 лет, менее 13 лет, менее 14 лет, менее 15 лет, менее 16 лет, менее 17 лет, менее 18 лет, менее 19 лет, менее 20 лет, менее 21 года, менее 22 лет, менее 23 лет, менее 24 лет или менее 25 лет.

VI. Наборы или готовые изделия

45 Векторы на основе гAAV, частицы и/или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут содержаться в наборе или готовом изделии, например, разработанном для применения в одном из способов по настоящему изобретению, описанных в данном документе.

Как правило, система содержит канюлю, один или несколько шприцев (например, 1, 2, 3, 4 или больше) и одну или несколько жидкостей (например, 1, 2, 3, 4 или больше), подходящих для применения в способах по настоящему изобретению.

Шприц может представлять собой любой подходящий шприц, при условии, что его можно соединить с канюлей для доставки жидкости. В некоторых вариантах осуществления системы содержит один шприц. В некоторых вариантах осуществления системы содержит два шприца. В некоторых вариантах осуществления системы содержит три шприца. В некоторых вариантах осуществления системы содержит четыре или более шприцов. Жидкости, подходящие для применения в способах по настоящему изобретению, включают жидкости, описанные в данном документе, например, одну или несколько жидкостей, каждая из которых содержит эффективное количество одного или нескольких векторов, описанных в данном документе, и одну или несколько жидкостей, содержащих одно или несколько терапевтических средств.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит одну жидкость (например, фармацевтически приемлемую жидкость, содержащую эффективное количество вектора). В некоторых вариантах осуществления набор содержит 2 жидкости. В некоторых вариантах осуществления набор содержит 3 жидкости. В некоторых вариантах осуществления набор содержит 4 или больше жидкостей. Жидкость может включать в себя разбавитель, буфер, вспомогательное вещество или любую другую жидкость, описанную в данном документе или известную из уровня техники, подходящую для доставки, разбавления, стабилизации, буферизации или транспортировки иным образом композиции вектора на основе гAAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит один или несколько буферов, например водный буферный раствор с pH. Примеры буферов могут включать без ограничения фосфатный, цитратный, трис-, HEPES и другие буферы на основе органических кислот.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит контейнер. Подходящие контейнеры могут включать, например, колбы, пакеты, шприцы и бутылки. Контейнер может быть изготовлен из одного или нескольких материалов, таких как стекло, металл или пластик. В некоторых вариантах осуществления контейнер используют для хранения композиции гAAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления контейнер может также содержать жидкость и/или другое терапевтическое средство.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит дополнительное терапевтическое средство с композицией гAAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления композиция гAAV и дополнительное терапевтическое средство могут быть смешаны. В некоторых вариантах осуществления композицию гAAV и дополнительное терапевтическое средство можно хранить отдельно. В некоторых вариантах осуществления композиция гAAV и дополнительное терапевтическое средство могут находиться в одном контейнере. В некоторых вариантах осуществления композиция гAAV и дополнительное терапевтическое средство могут находиться в разных контейнерах. В некоторых вариантах осуществления композицию гAAV и дополнительное терапевтическое средство можно вводить одновременно. В некоторых вариантах осуществления композицию гAAV и дополнительное терапевтическое средство можно вводить в один и тот же день. В некоторых вариантах осуществления композицию гAAV можно вводить в течение одного дня, двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, семи дней, двух недель, трех недель, четырех недель, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев или шести месяцев введения дополнительного терапевтического средства.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит терапевтическое средство,

которое временно подавляет иммунную систему перед введением AAV. В некоторых вариантах осуществления пациенты временно иммунологически ослаблены незадолго до и после инъекции вируса, чтобы ингибировать Т-клеточный ответ на частицы AAV (например см. Ferreira et al., Hum. Gene Ther. 25:180-188, 2014). В некоторых вариантах 5 осуществления набор дополнительно обеспечивает циклоспорин, миофенолата мофетил и/или метилпреднизолон.

Частицы и/или композиции rAAV по настоящему изобретению можно дополнительно упаковать в наборы, включающие инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат устройство для доставки (например, 10 любой тип парентерального введения, описанного в данном документе) композиций частиц rAAV. В некоторых вариантах осуществления инструкции по применению включают инструкции в соответствии с одним из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления инструкции напечатаны на этикетке, предоставляемой (например, прикрепленной) с контейнером. В некоторых вариантах 15 осуществления инструкции по применению включают инструкции для введения млекопитающему (например, человеку) эффективного количества частиц rAAV, например, для лечения муколипидоза типа II (ML II) и/или муколипидоза типа III (ML III), увеличения размера тела, увеличения содержания минеральных веществ в костной ткани и/или увеличения минеральной плотности костной ткани.

20 VII. Животные модели

Настоящее изобретение предусматривает животные модели муколипидоза II. Мутантных по GNPTAB мышей можно получать путем микроинъекции клонов эмбриональных стволовых клеток (ES) в бластоцисты хозяина с использованием стандартных способов. Вкратце, целенаправленное разрушение локуса GNPTAB мыши 25 (например, было удалено от экзона 12 до экзона 20) можно осуществлять путем гомологичной рекомбинации с заменяющим вектором, содержащим репортерный или селектируемый маркерный ген. Все потомство генотипировали с помощью анализа полимеразной цепной реакции ДНК из надреза хвоста. Все мыши, используемые в данном исследовании, были самцами, идентифицированными как мыши дикого типа 30 (+/+), или гетерозиготы (+/-), или гомозиготы (-/-). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один аллель гена GNPTAB содержит делецию, расположенную между экзоном 12 и экзоном 20. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один аллель гена GNPTAB содержит делецию, охватывающую экзон 12 и экзон 20. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает делецию одного или 35 нескольких экзонов 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления часть гена GNPTAB заменена геном, кодирующим репортер и/или селектируемый маркер. В некоторых вариантах осуществления селектируемый маркер придает резистентность к неомицину. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой млекопитающее (например, грызуна, кролика, кошку, собаку, 40 свинью, обезьяну). В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой грызуна (например, мышь, крысу, хомяка, морскую свинку). В некоторых вариантах осуществления животное является иммунокомпетентным или иммунодефицитным. В некоторых вариантах осуществления животная модель 45 предусматривает генетически модифицированное животное. Другие мышиные модели ML II представлены в Gelfman et al., (Invest. Optham. Visual Sci. 2007, 48:5221-5228) и Paton, L. et al., (J Biol Chem. 2014, 289(39):26709-21).

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ оценки средства для лечения муколипидоза II (ML II), включающий введение средства животной

модели, как описано в данном документе, где уменьшение интенсивности одного или нескольких симптомов ML II указывает на то, что средство может обеспечить эффективное лечение ML II. В некоторых вариантах осуществления симптом ML II представляет собой снижение веса тела, снижение плотности костной ткани, снижение 5 содержания минеральных веществ в костной ткани, дефекты скелета, когнитивные нарушения, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса, выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, утолщение и недостаточность митрального клапана, запор и/или диарею. В некоторых вариантах 10 осуществления средства представляет собой небольшую молекулу, полипептид, антитело, нуклеиновую кислоту или рекомбинантную вирусную частицу.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение будет более понятным со ссылкой на следующие примеры. Тем не менее, их не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего 15 изобретения. Понятно, что описанные в данном документе примеры и варианты осуществления служат только в качестве иллюстрации, и что различные модификации или изменения с их учетом будут понятны специалистам в данной области техники, и они должны быть включены в сущность и содержание данной заявки, а также объем прилагаемой формулы изобретения.

20 Пример 1. Получение и характеристика нокаутных по GNPTAB мышей

Муколипидоз типа II (ML типа II или ML-II, также называемый I-клеточной болезнью; запись OMIM #252500) представляет собой аутосомно-рецессивное лизосомальное 25 нарушение накопления, вызванное дефицитом N-ацетилглюказамин-1-фосфотрансферазы (GNPTAB). Признаками данного заболевания являются наличие многочисленных тел включения в цитоплазме фибробластов, отсутствие мукополисахариурии, увеличение активности лизосомальных ферментов в сыворотке и снижение активности GlcNAc-фосфотрансферазы. Для изучения патологии ML типа II разработали и охарактеризовали нокаутную (КО) по GNPTAB мышь.

Способы

30 Создание конструкций AAV2/8-GNPTAB

Кодирующую последовательность GNPTAB мыши амплифицировали и кодон-оптимизировали для экспрессии у мышей с помощью Genescrypt (Пискатавей, Нью-Джерси, США). Из-за большого размера кДНК GNPTAB и ограниченной емкости AAV кДНК не помещается ни в какие доступные векторы. Поэтому разработали новую 35 кассету экспрессии, которая содержала укороченные версии энхансера CMV и промотора бета-актина курицы, а также очень маленький инtron. Экспрессию полноразмерной mRNA GNPTAB подтверждали с помощью временной инфекции клеток HEK293 *in vitro* с последующей количественной RT-PCR. Этот AAV2/8-GNPTAB очищали, хранили при -70°C и использовали в концентрации, составлявшей $2,5 \times 10^{12}$ резистентных к ДНКазе 40 частиц/мл. Для этих исследований применяли укороченные последовательности энхансера и промотора.

Животные

Мутантных по GNPTAB мышей получали путем микроинъекции клонов 45 эмбриональных стволовых клеток (ES) в бластоцисты хозяина с использованием стандартных способов. Вкратце, целенаправленное разрушение локуса GNPTAB мыши (было удалено от экзона 12 до экзона 20) осуществляли путем гомологичной рекомбинации с заменяющим вектором, содержащим ген резистентности к неомицину. Мыши, используемые в данном исследовании, были смешанного генетического фона

(129/Sv и C57BL/6). Все потомство генотипировали с помощью анализа полимеразной цепной реакции ДНК из надреза хвоста. Все мыши, используемые в данном исследовании, были самцами, идентифицированными как мыши дикого типа (+/+, или гетерозиготы (+/-), или гомозиготы (-/-).

5 Мышей размещали в группах по 2-5 на клетку в комнате для колонии с 12-часовым циклом свет-темнота. Пища для грызунов (Harlan Teklad #8604, Мэдисон, Висконсин, США) и вода были доступны *ad libitum*. Уход за животными осуществляли в соответствии с руководящими принципами, описанными в Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, Washington DC, 1996).

10 Инъекции вектора

Одну билатеральную i.v. инъекцию PBS или AAV-GNPTAB осуществляли 6-недельным мышам GNPTAB КО. Группа мышей дикого типа или гетерозиготных мышей, которым вводили PBS, служила в качестве контрольной группы. Каждая мышь, которой вводили AAV-GNPTAB, получала 3×10^{11} векторных частиц. Для снижения или устранения иммунного ответа инъецировали антитело к CD40 лиганда (MR1) в соответствии с протоколом Halbert et al., (1998) J. Virol. 72:9795-9805.

15 Ауксология

Всех мышей исследовали еженедельно путем измерения общего веса тела (г) и длины тела (расстояние от носа до ануса, мм) с использованием электронного цифрового 20 штангенциркуля.

Гистология

25 Мышей дикого типа и GNPTAB^{-/-} в возрасте 10 мес. подвергали действию наркоза и перфузировали через сердце с PBS. После перфузии удаляли бедренную кость, фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA), декальцифицировали с помощью 0,5 М EDTA и заливали парафином. Срезы бедренной кости (4 мкм) окрашивали гематоксилином-эозином. Для сканирования предметных стекол и анализа при 4°C использовали Aperio ScanScope AT (v101.0). Ткани заливали и нарезали для TEM или гематоксилина и эозина (H&E).

30 Анализ ультраструктуры

Мышей дикого типа и КО обезглавливали, а слюнные железы удаляли и фиксировали путем погружения в 2,5% глутаральдегид в PBS в течение ночи при 4°C. Слюнные железы дегидратировали, а затем промывали в буфере PBS еще 30 мин. с последующей фиксацией 1% тетроксидом осмия в течение 1 ч. при комнатной температуре. Образцы дегидратировали в наборе спиртов повышающейся концентрации и заливали в Epon 35 812. Полутонкие серийные срезы нарезали при 2,5 мкм (Leica ultracut UCT), окрашивали толуидиновым синим и наблюдали в световой микроскоп. Наблюдение с помощью трансмиссионной электронной микроскопии осуществляли с использованием микроскопа Mirgagni (FEI).

40 Анализ лизосомальных ферментов

Кровь отбирали, и образцы центрифугировали 15 мин. ($8000 \times g$), и плазму хранили при -70°C. Активность лизосомальных ферментов в плазме измеряли в отделе химической патологии Медицинского центра Samsung, Южная Корея. При ML II было невозможно измерить специфическую активность GlcNAc-фосфотрансферазы. Таким образом, диагноз был сделан на основе повышения лизосомального фермента в плазме.

45 Анализ DEXA

Минеральную плотность костной ткани (BMD), содержание минеральных веществ в костной ткани (BMC) и массу нежировых тканей измеряли у анестезированных мышей с помощью костного денситометра pDEXA Sabre X-ray Bone Densitometer. После введения

анестезии регистрировали вес каждой мыши, а затем мышь помещали в сканер DEXA. Для анализа данных определяли область, содержащую все тело мыши.

ПЦР в реальном времени

Полимеризационную цепную реакцию в реальном времени осуществляли для

5 количественного определения уровней mRNA GNPTAB с использованием системы ABI PRISM 7900HT и анализов экспрессии гена TaqMan (Applied Biosystems, Фостер Сити, Калифорния). Уровни mRNA выражали относительно уровня GAPDH. Для анализа данных с помощью программного обеспечения SDS2.3 (Applied Biosystems) использовали способ $2^{-\Delta\Delta CT}$.

10 Статистический анализ

Для статистического анализа и построения фигур и таблиц использовали GraphPad Prism версии 5. Значимость различий определяли с помощью непарного t-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Если не указано иное, то все данные представлены как среднее значение \pm SEM.

15 Результаты

Для создания мышей GNPTAB KO использовали стратегию генов-ловушек. Как показано на ФИГ. 1А, для создания мышей использовали гомологичную рекомбинацию с заменяющим вектором, содержащим ген резистентности к неомицину между экзонами 12 и 20. Как показано на ФИГ. 1В, присутствие гена-ловушки в гене GNPTAB клонов ES подтверждалось с помощью анализа Саузерн-блот.

20 Обширный фенотипический анализ осуществляли на животных дикого типа, гетерозиготных и гомозиготных животных. Мышей KO можно было визуально отличить от однопометников дикого типа (WT) по их небольшому размеру. Средний вес тела (ФИГ. 2А) и длина (ФИГ. 2В) у мышей KO были значительно снижены. В соответствии 25 с их небольшим размером, гомозиготные мыши демонстрировали грубую форму мордочки (ФИГ. 2С).

Как показано на ФИГ. 3А, в нормальном хряще бесцветное лакунарное пространство окружает хондроциты. Цитоплазма содержит одну прозрачную вакуоль. У мышей KO хондроциты бедренной кости заметно гипертрофированы и полностью заполняют свои 30 увеличенные лакуны (FIG. 3В). Цитоплазма гипертрофированного хондроцита растянута множеством микровакуолей, содержащих ограниченное количество мелкозернистого амфохромофильтного материала. Было меньше связанного с фиксацией сжатия хондроцитов, которые заполняли увеличенные лакуны. Это контрастирует с 35 хондроцитами дикого типа, которые содержали одну большую прозрачную вакуоль и лишь частично заполняли лакуны.

Ацинусы экзокринных слюнных желез, которые состоят из секреторных клеток слизистого и серозного типов, демонстрировали обширную вакуолизацию у мышей KO при исследовании методом световой микроскопии (Gelfman et al., 2007, Invest. Optham. Visual Sci. 48:5221-5228). Чтобы получить представление о лежащей в основе патологии, 40 подчелюстную слюнную железу проанализировали с помощью электронной микроскопии (EM).

Секреторные клетки как слизистого, так и серозного типа легко обнаруживались у мышей дикого типа (ФИГ. 4А-С). В отличие от этого, общая структура подчелюстной 45 слюнной железы мышей KO была так сильно нарушена, что это сильно затрудняло идентификацию серозных клеток на срезах EM (ФИГ. 4D-F). Секреторные клетки слизистого типа были заполнены крупными мембранными связанными вакуолями, которые содержали гетерогенный материал (ФИГ. 4Е, F). Крупные вакуоли были заполнены не разрушенным цитоплазматическим материалом, который накапливался в слизистых

клетках КО и был окружен однослойной мембраной. Эти наблюдения указывают на то, что они вероятно представляют собой аутолизосомы, образованные путем слияния аутофагических компартментов с лизосомами.

Пациенты с ML-II имеют значительно повышенные уровни лизосомальных ферментов

- 5 в сыворотке из-за невозможности синтезировать маркер распознавания маннозо-6-фосфата, который необходим для правильного нацеливания этих ферментов на лизосомы. Данный дефект миграции приводит к гиперсекреции этих ферментов в кровь. На ФИГ. 5А-5Д показано, что по сравнению с мышами дикого типа мыши КО демонстрировали существенно повышенные уровни лизосомальных ферментов, таких
- 10 как N-ацетилглюкозаминидаза (ФИГ. 5А), β -гексозаминидаза А (ФИГ. 5В), β -галактозидаза (ФИГ. 5С) и β -глюкуронидаза (ФИГ. 5Д). Этот фенотип ожидался, если бы активность GlcNAc-1-фосфотрансферазы была дефектной у гомозиготных мышей, что согласуется с наблюдениями у людей.

Таким образом, эти эксперименты показывают, что мыши GNPTAB КО

- 15 демонстрировали явные фенотипические различия по сравнению с мышами дикого типа, особенно в отношении развития, морфологии слюнных желез и уровней лизосомальных ферментов. Эти результаты показывают, что мыши GNPTAB КО представляют собой модельную систему для изучения терапевтических методов лечения ML-II.

- 20 Пример 2: Оценка AAV-опосредованного введения GNPTAB мышам GNPTAB КО

Поскольку пациенты с ML-II демонстрируют замедление развития, то основной целью данного исследования было оценить эффективность AAV-опосредованного введения GNPTAB, которое может способствовать развитию на модели ML-II. Таким образом, проанализировали фенотипы мышей дикого типа, гетерозиготных по GNPTAB и GNPTAB КО по сравнению с мышами GNPTAB КО, которым инъектировали AAV-GNPTAB.

Как показано на ФИГ. 6А и 6В, все аналитические оценки осуществляли в течение двух периодов после инъекции: первый начинался через 16 недель после инъекции (в возрасте 12 недель), второй начался через 32 недели после инъекции (в возрасте 38 недель). Ауксиологический анализ добавляли через 6 недель после инъекции.

Сконструировали плазмиду, которая содержала кассету экспрессии, экспрессирующую кДНК GNPTAB мыши, регулируемую энхансером CMV/промотором СВА и сигналом поли(А) BGH (ФИГ. 7А). Полноразмерный GNPTAB находился под управлением укороченного энхансера CMV/промотора СВА, как описано в данном документе.

- 35 Количественный анализ ПЦР в реальном времени печени из мышей GNPTAB КО, которым инъектировали AAV2/8-GNPTAB, показал специфическую и высокую экспрессию AAV-GNPTAB. Как и ожидалось, в образцах контрольных однопометников какая-либо mRNA AAV-GNPTAB отсутствовала (ФИГ. 7В).

В качестве первоначального теста для определения того, влияет ли AAV-

- 40 опосредованный перенос гена на метаболизм физиологически значимым образом, контролировали прибавку веса в течение 32 недель после инъекции. Как показано на ФИГ. 8А, для лечения с AAV-GNPTAB у мышей КО какого-либо эффекта не наблюдалось. На ФИГ. 8В показано, что между контрольными и обработанными AAV-GNPTAB мышами КО не наблюдалось различий в отношении прибавки веса.

- 45 Затем оценивали эффективность ослабления фенотипа карликовости у мышей КО. Улучшение в отношении карликовости отмечали через 6 недель терапии у мышей КО, которым инъектировали AAV-GNPTAB, демонстрирующих увеличение размера тела (ФИГ. 9А, 9В и таблица 1 ниже).

Таблица 1. Изменение роста

		Соотношение увеличения роста (рост после указанного интервала/начальный рост)		
	Генотип	Исходный рост (мм)	Рост через 6 недель	Рост через 32 недели
5	Дикий тип (+/+)	84,31±0,885	1,06±0,011	1,11±0,008
	Гетерозигота (+/-)	84,83±0,475	1,07±0,008	1,11±0,005
10	GNPTAB-нокаяут (-/-)	76,09±2,483	1,04±0,012	1,09±0,015
	GNPTAB-нокаяут (-/-)+AAV-GNPTAB	75,10±1,964	1,07±0,009	1,11±0,017

Изображенные значения представляют собой среднее значение ± SEM.

Затем измеряли минеральную плотность костной ткани (BMD), содержание минеральных веществ в костной ткани (BMC) и состав тела. DEXA представляет собой рентгеновский метод визуализации для определения содержания минеральных веществ в костной ткани и состава тела (в виде жировой массы тела). Перенос AAV-GNPTAB индуцировал относительное увеличение BMC и BMD у мышей КО, которым инъецировали AAV. На ФИГ. 10А-10С показаны необработанные данные BMD, полученные до инъекции (ФИГ. 10А), и относительный показатель BMD (ФИГ. 10В, 10С), сравниваемый до и после инъекции. Эти данные также представлены в таблице 2 ниже. Эти результаты демонстрируют значительный эффект переноса гена в отношении минеральной плотности костной ткани.

Таблица 2. Изменение минеральной плотности костной ткани (BMD)

		Соотношение увеличения роста (рост после указанного интервала/начальный рост)		
	Генотип	Исходная BMD (г/см ²)	BMD через 16 недель	BMD через 32 недели
25	Дикий тип (+/+)	0,055±0,001	1,139±0,017	1,124±0,032
	Гетерозигота (+/-)	0,056±0,001	1,137±0,016	1,140±0,007
30	GNPTAB-нокаяут (-/-)	0,050±0,002	1,156±0,011	1,157±0,012
	GNPTAB-нокаяут (-/-)+AAV-GNPTAB	0,048±0,001	1,219±0,013	1,236±0,044

Изображенные значения представляют собой среднее значение ± SEM.

Аналогично, необработанные данные содержания минеральных веществ в костной ткани (BMC) продемонстрировали сильный эффект генной терапии (ФИГ. 11А). Данные о соотношении (ФИГ. 11В, 11С) также приблизились к значимому эффекту в отношении развития костной ткани. Эти данные также представлены в таблице 3 ниже.

Таблица 3. Изменение содержания минеральных веществ в костной ткани (BMC)

		Соотношение увеличения роста (рост после указанного интервала/начальный рост)		
	Генотип	Исходная BMD (г/см ²)	BMD через 16 недель	BMD через 32 недели
40	Дикий тип (+/+)	0,575±0,016	1,172±0,047	1,123±0,073
	Гетерозигота (+/-)	0,565±0,018	1,197±0,045	1,116±0,042
	GNPTAB-нокаяут (-/-)	0,448±0,027	1,272±0,044	1,228±0,049
45	GNPTAB-нокаяут (-/-)+AAV-GNPTAB	0,386±0,016	1,560±0,080	1,551±0,096

Изображенные значения представляют собой среднее значение ± SEM.

Затем анализ содержания нежировых тканей тела с использованием сканера DEXA показал, что масса нежировых тканей у мышей КО также снижена (ФИГ. 12А). Как показано на ФИГ. 12В, через 32 недели после инъекции контрольные мыши

продемонстрировали значительное снижение процента массы нежировых тканей по сравнению с данными до инъекции. Однако каких-либо значительных изменений в массе нежировых тканей у мышей КО, обработанных AAV-GNPTAB, не наблюдалось. Эти данные также представлены в таблице 4 ниже.

5 Таблица 4. Изменение процента массы нежировых тканей

Генотип	Исходный % массы нежировых тканей	% массы нежировых тканей через 32 недели
Дикий тип (+/+) 10	86,56±0,627	78,98±3,425
Гетерозигота (+/-)	87,44±0,321	69,5±3,429
GNPTAB-нокаут (-/-) 15	85,86±0,548	70,2±3,313
GNPTAB-нокаут (-/-)+AAV-GNPTAB 20	84,3±0,665	84,7±0,7087

Изображенные значения представляют собой среднее значение ± SEM.

Таким образом, мыши GNPTAB КО не смогли активно расти и характеризовались слабой плотностью костной ткани, как это имеет место при ML типа II у человека. С применением данной модели исследовали потенциал генной терапии с использованием вектора на основе AAV для лечения ML типа II. Было обнаружено, что у мышей КО сверхэкспрессия GNPTAB частично защищает от нарушения развития костной ткани. В целом, системная доставка GNPTAB посредством векторов на основе AAV была высокоэффективной и представляет собой перспективный подход для коррекции патологии костной ткани при ML типа II.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Все полипептидные последовательности представлены в направлении от N-конца к С-концу, если не указано иное.

25 Все последовательности нуклеиновых кислот представлены в направлении от 5'- к 3'-концу, если не указано иное.

GNPTAB

Последовательность белка GNPTAB человека (SEQ ID NO:1)

MLFKLLQRQTYTCLSHRYGLYVCFLGVVVITVSAFQFGEVVLERSRDQYHVLFDSYRDNIAKGKSQNRCLC
LPMPIDVVYTWNNGTDLELLKELQQVREQMEEEQAMREILGKNTTEPTKKSEKQLECLLTHCIKVPMVLV
LDPALPANITLKDLPSLYPSFHSASDIFNVAKPKNPSTNVSVVVFDSRKVDENAHGGLKGNSRQTVWRG
YLTTDKEVPGLVLMQDLAGLAFSLGFPPTFKETNQLKTKLPENLSSKVKLQLYSEASVALLKLNNPKDFQEL
NKQTKKNMTIDGKELTISPAYLLWDLSAISQSKQDEDISASRFEDNEELRYSLSIERHAPVRNIFIVT
NGQIPSWLNLDNPRVTIVTHQDVFRNLSHLPTFSSPAIESHIHRIEGLSQKFYIYLNDVMFGKDVWPDDF
YSHSKGQKVLTWVPVNCAEGCPGSWIKDGYCDKACNNASCDWDGGDCSGNSGGSRYIAGGGGTGSIGVG
QPWFQGGGINSVSYCNQGCANSWLAQKFCQACNVLSLSCGFDAGDCGQDHFHLYKVILLPNQTHYIIIPKG
ECLPYFSFAEVAKRGVEGAYSDNPPIRHASIANWKTIHLIMHSGMNATTIHFNLTQFQNTNDEEFKMQIT
VEVDTREGPKLNSTAQKGYENLVSPITLLPEAEILFEDIPKEKRFPKFRHDVNSTRRAQEEVKIPLVNI
SLLPKDAQLSLNTLDLQLEHGDTILKGYNLSSLRSFLMNSQHAKIKNQAIITDETNDSLVAPQEKFQV
HKSILPNSLGVSERLQRLTFPAVSVKVNGHDQGQNPLDLETTARFRVETHQKTIGGNVTKEKPPSLIV
PLESQMTKEKKITGKEKENSRMEEAENHIGVTEVLLGRKLQHYTDSYLGFLPWEKKKYFQDLLEEEESL
KTQLAYFTDSKNTGRQLKDTFADSLRYVNKILNSKFGFTSRKVAHMPHMIDRIVMQUELQDMFPEEFDKT
SFHKVRHSEDMQFAFSYFYLMSAVQPLNIQVFDEVDTDQSGVLSREIRTLATRIHELPLSLQDLTGL
EHMLINCSKMLPADITQLNNIPPTQESYYDPNLPVTKSLVTNCKPVTDKIHKAYKDKNKYRFEIMGE
IAFKMIRTNVSHVVGQLDIRKNPRKFVCLNDNIDHNHKDAQTVKAVLRDFYESMFPIP SQFELPREYRN
RFLHMHLOEWRAYRDKLKFWTHCVLATLIMFTIFSFFAEQLIALKRKIFPRRRIHKEASPNRIRV

Последовательность белка GNPTAB мыши (SEQ ID NO:2)

5 MLLKLLQRQTYTCLSHRYGLYVCFVGVVVTIVSAFQFGEVVLEWSRDQYHVLFD SYRDNIAGKSFQNRLC
 LPMPIDVVYTUVNGTDLELLKELQVREHMEEQRAMRETLGKNTEPTKKSEKQLECLLTHCIKVPLV
 LDPPPLPANCTLKDLPTLYPSFHAAASDMFNVAKPKNPSTNVSVVVFDTTKDVEDAHAGPFKGGSQWMWRA
 YLTIDKEAPGLVLMQGLAFLSGFPPTFKETSQLKTKLPEKLSSKIKLLRLYSEASVALLKLNPKGFQEL
 NKQTKKNMTIDGKELTISPAYLLWDLISAISQSKQDEDVSASRFEDNEELRYSLSIERHAPWVRNIFIVT
 NGQIPSWLNLDNPRVTIVTHQDIFQNLSHLPTFSSSPAIESHIHRIEGLSQKFIFYLNDDVMFGKDVWPDDF
 YSHSKGQKVYLTVWPVPNCAECPGSWIKDGYCDKACNNNSACDWGGDCSGNTAGNRFVAGGGGTGNIGAG
 QHWQFGGGINTISYCNQGCANSWLADKFCDAQCNVLSCGFDAGDCQDHFHELYKVTLNPQTHYVVPKG
 EYLSYFSFANIARRGVEGTYSDNPIIRHASIANWKTIHLIMHGMNATTIYFNLTQANANDEEKIQIA
 VEVDTREAPKLNSTTQKAYESLVSPVPLPQADVPFEDVPKERKFPKIRRHDVNATGRFQEEVKIPRVNI
 SLLPKEAQVRLSNLDLQLERGDTLKGYNLSKSALLRSFLGNSLDTKIKPQARTDETKGNLLEVPPQENPSH
 RRPHGFAGEHRSERWTAPAETVTVKGRDHALNPPPLETEARNARLAQPTLGTVSKENLSPLIVPPSHLPK
 EEESDRAEGNAVPVKELVPGRRQQNYPGFLPWEKKKYFQDLLDEEESLKTQLAYFTDSKHTGRQLKDTF
 ADSSLRYVNKILNSKFGFTSRKVPAMPHMIDRIVMQELQDMFPEEFDKTSFHKVRHSEDMQFAFSYFYL
 MSAVQPLNISQVFHEVDTDQSGVLSREIRTLATRIHDPLSLQDLTGLEHMLINCSKMLPANITQLNNI
 PPTQEAYYDPNLPPTVKSLVTNCPVTDKIHAKDKNKYRFEIMGEELIAFKMIRTNVSHVVGQLDIR
 KNPRKFVCLNDNIDHNHKDARTVKAVLRDFYESMFPIPSQFELPREYRNRFLHMHELQEWRAYRDKLKFW
 THCVLATLIIFTIFSFFAEQIIALKRKIFPERRRIHKEASPDRIKV

15

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENZYME CORPORATION

<120> ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУКОЛИПИДОЗА ТИПА I

<130> 159792012640

20

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/267,502

<151> 2015-12-15

<160> 2

25

<170> FastSEQ для Windows версии 4.0

<210> 1

<211> 1256

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

30

<400> 1

Met Leu Phe Lys Leu Leu Gln Arg Gln Thr Tyr Thr Cys Leu Ser His

1 5 10 15

Arg Tyr Gly Leu Tyr Val Cys Phe Leu Gly Val Val Val Thr Ile Val

20 25 30

35

Ser Ala Phe Gln Phe Gly Glu Val Val Leu Glu Trp Ser Arg Asp Gln

35 40 45

Tyr His Val Leu Phe Asp Ser Tyr Arg Asp Asn Ile Ala Gly Lys Ser

50 55 60

40

Phe Gln Asn Arg Leu Cys Leu Pro Met Pro Ile Asp Val Val Tyr Thr

65 70 75 80

Trp Val Asn Gly Thr Asp Leu Glu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Gln Val

85 90 95

Arg Glu Gln Met Glu Glu Gln Lys Ala Met Arg Glu Ile Leu Gly

100 105 110

45

Lys Asn Thr Thr Glu Pro Thr Lys Lys Ser Glu Lys Gln Leu Glu Cys

115 120 125

Leu Leu Thr His Cys Ile Lys Val Pro Met Leu Val Leu Asp Pro Ala

130 135 140

RU 2742612 C2

	Leu Pro Ala Asn Ile Thr Leu Lys Asp Leu Pro Ser Leu Tyr Pro Ser		
145	150	155	160
	Phe His Ser Ala Ser Asp Ile Phe Asn Val Ala Lys Pro Lys Asn Pro		
	165	170	175
5	Ser Thr Asn Val Ser Val Val Phe Asp Ser Thr Lys Asp Val Glu		
	180	185	190
	Asp Ala His Ser Gly Leu Leu Lys Gly Asn Ser Arg Gln Thr Val Trp		
	195	200	205
	Arg Gly Tyr Leu Thr Thr Asp Lys Glu Val Pro Gly Leu Val Leu Met		
10	210	215	220
	Gln Asp Leu Ala Phe Leu Ser Gly Phe Pro Pro Thr Phe Lys Glu Thr		
	225	230	235
	240		
	Asn Gln Leu Lys Thr Lys Leu Pro Glu Asn Leu Ser Ser Lys Val Lys		
	245	250	255
15	Leu Leu Gln Leu Tyr Ser Glu Ala Ser Val Ala Leu Leu Lys Leu Asn		
	260	265	270
	Asn Pro Lys Asp Phe Gln Glu Leu Asn Lys Gln Thr Lys Lys Asn Met		
	275	280	285
	Thr Ile Asp Gly Lys Glu Leu Thr Ile Ser Pro Ala Tyr Leu Leu Trp		
20	290	295	300
	Asp Leu Ser Ala Ile Ser Gln Ser Lys Gln Asp Glu Asp Ile Ser Ala		
	305	310	315
	320		
	Ser Arg Phe Glu Asp Asn Glu Glu Leu Arg Tyr Ser Leu Arg Ser Ile		
	325	330	335
25	Glu Arg His Ala Pro Trp Val Arg Asn Ile Phe Ile Val Thr Asn Gly		
	340	345	350
	Gln Ile Pro Ser Trp Leu Asn Leu Asp Asn Pro Arg Val Thr Ile Val		
	355	360	365
	Thr His Gln Asp Val Phe Arg Asn Leu Ser His Leu Pro Thr Phe Ser		
30	370	375	380
	Ser Pro Ala Ile Glu Ser His Ile His Arg Ile Glu Gly Leu Ser Gln		
	385	390	395
	400		
	Lys Phe Ile Tyr Leu Asn Asp Asp Val Met Phe Gly Lys Asp Val Trp		
	405	410	415
35	Pro Asp Asp Phe Tyr Ser His Ser Lys Gly Gln Lys Val Tyr Leu Thr		
	420	425	430
	Trp Pro Val Pro Asn Cys Ala Glu Gly Cys Pro Gly Ser Trp Ile Lys		
	435	440	445
	Asp Gly Tyr Cys Asp Lys Ala Cys Asn Asn Ser Ala Cys Asp Trp Asp		
40	450	455	460
	Gly Gly Asp Cys Ser Gly Asn Ser Gly Gly Ser Arg Tyr Ile Ala Gly		
	465	470	475
	480		
	Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ile Gly Val Gly Gln Pro Trp Gln Phe Gly		
	485	490	495
45	Gly Gly Ile Asn Ser Val Ser Tyr Cys Asn Gln Gly Cys Ala Asn Ser		
	500	505	510
	Trp Leu Ala Asp Lys Phe Cys Asp Gln Ala Cys Asn Val Leu Ser Cys		
	515	520	525

RU 2742612 C2

Gly Phe Asp Ala Gly Asp Cys Gly Gln Asp His Phe His Glu Leu Tyr
 530 535 540
 Lys Val Ile Leu Leu Pro Asn Gln Thr His Tyr Ile Ile Pro Lys Gly
 545 550 555 560
 5 Glu Cys Leu Pro Tyr Phe Ser Phe Ala Glu Val Ala Lys Arg Gly Val
 565 570 575
 Glu Gly Ala Tyr Ser Asp Asn Pro Ile Ile Arg His Ala Ser Ile Ala
 580 585 590
 Asn Lys Trp Lys Thr Ile His Leu Ile Met His Ser Gly Met Asn Ala
 10 595 600 605
 Thr Thr Ile His Phe Asn Leu Thr Phe Gln Asn Thr Asn Asp Glu Glu
 610 615 620
 Phe Lys Met Gln Ile Thr Val Glu Val Asp Thr Arg Glu Gly Pro Lys
 625 630 635 640
 15 Leu Asn Ser Thr Ala Gln Lys Gly Tyr Glu Asn Leu Val Ser Pro Ile
 645 650 655
 Thr Leu Leu Pro Glu Ala Glu Ile Leu Phe Glu Asp Ile Pro Lys Glu
 660 665 670
 Lys Arg Phe Pro Lys Phe Lys Arg His Asp Val Asn Ser Thr Arg Arg
 20 675 680 685
 Ala Gln Glu Glu Val Lys Ile Pro Leu Val Asn Ile Ser Leu Leu Pro
 690 695 700
 Lys Asp Ala Gln Leu Ser Leu Asn Thr Leu Asp Leu Gln Leu Glu His
 705 710 715 720
 25 Gly Asp Ile Thr Leu Lys Gly Tyr Asn Leu Ser Lys Ser Ala Leu Leu
 725 730 735
 Arg Ser Phe Leu Met Asn Ser Gln His Ala Lys Ile Lys Asn Gln Ala
 740 745 750
 Ile Ile Thr Asp Glu Thr Asn Asp Ser Leu Val Ala Pro Gln Glu Lys
 30 755 760 765
 Gln Val His Lys Ser Ile Leu Pro Asn Ser Leu Gly Val Ser Glu Arg
 770 775 780
 Leu Gln Arg Leu Thr Phe Pro Ala Val Ser Val Lys Val Asn Gly His
 785 790 795 800
 35 Asp Gln Gly Gln Asn Pro Pro Leu Asp Leu Glu Thr Thr Ala Arg Phe
 805 810 815
 Arg Val Glu Thr His Thr Gln Lys Thr Ile Gly Gly Asn Val Thr Lys
 820 825 830
 Glu Lys Pro Pro Ser Leu Ile Val Pro Leu Glu Ser Gln Met Thr Lys
 40 835 840 845
 Glu Lys Lys Ile Thr Gly Lys Glu Lys Glu Asn Ser Arg Met Glu Glu
 850 855 860
 Asn Ala Glu Asn His Ile Gly Val Thr Glu Val Leu Leu Gly Arg Lys
 865 870 875 880
 45 Leu Gln His Tyr Thr Asp Ser Tyr Leu Gly Phe Leu Pro Trp Glu Lys
 885 890 895
 Lys Lys Tyr Phe Gln Asp Leu Leu Asp Glu Glu Glu Ser Leu Lys Thr
 900 905 910

RU 2742612 C2

Gln Leu Ala Tyr Phe Thr Asp Ser Lys Asn Thr Gly Arg Gln Leu Lys
 915 920 925

Asp Thr Phe Ala Asp Ser Leu Arg Tyr Val Asn Lys Ile Leu Asn Ser
 930 935 940

5 Lys Phe Gly Phe Thr Ser Arg Lys Val Pro Ala His Met Pro His Met
 945 950 955 960

Ile Asp Arg Ile Val Met Gln Glu Leu Gln Asp Met Phe Pro Glu Glu
 965 970 975

Phe Asp Lys Thr Ser Phe His Lys Val Arg His Ser Glu Asp Met Gln
 10 980 985 990

Phe Ala Phe Ser Tyr Phe Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Val Gln Pro Leu
 995 1000 1005

Asn Ile Ser Gln Val Phe Asp Glu Val Asp Thr Asp Gln Ser Gly Val
 1010 1015 1020

15 Leu Ser Asp Arg Glu Ile Arg Thr Leu Ala Thr Arg Ile His Glu Leu
 1025 1030 1035 1040

Pro Leu Ser Leu Gln Asp Leu Thr Gly Leu Glu His Met Leu Ile Asn
 1045 1050 1055

Cys Ser Lys Met Leu Pro Ala Asp Ile Thr Gln Leu Asn Asn Ile Pro
 20 1060 1065 1070

Pro Thr Gln Glu Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Leu Pro Pro Val Thr Lys
 1075 1080 1085

Ser Leu Val Thr Asn Cys Lys Pro Val Thr Asp Lys Ile His Lys Ala
 1090 1095 1100

25 Tyr Lys Asp Lys Asn Lys Tyr Arg Phe Glu Ile Met Gly Glu Glu Glu
 1105 1110 1115 1120

Ile Ala Phe Lys Met Ile Arg Thr Asn Val Ser His Val Val Gly Gln
 1125 1130 1135

Leu Asp Asp Ile Arg Lys Asn Pro Arg Lys Phe Val Cys Leu Asn Asp
 30 1140 1145 1150

Asn Ile Asp His Asn His Lys Asp Ala Gln Thr Val Lys Ala Val Leu
 1155 1160 1165

Arg Asp Phe Tyr Glu Ser Met Phe Pro Ile Pro Ser Gln Phe Glu Leu
 1170 1175 1180

35 Pro Arg Glu Tyr Arg Asn Arg Phe Leu His Met His Glu Leu Gln Glu
 1185 1190 1195 1200

Trp Arg Ala Tyr Arg Asp Lys Leu Lys Phe Trp Thr His Cys Val Leu
 1205 1210 1215

Ala Thr Leu Ile Met Phe Thr Ile Phe Ser Phe Phe Ala Glu Gln Leu
 40 1220 1225 1230

Ile Ala Leu Lys Arg Lys Ile Phe Pro Arg Arg Arg Ile His Lys Glu
 1235 1240 1245

Ala Ser Pro Asn Arg Ile Arg Val
 1250 1255

45 <210> 2
 <211> 1235
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met	Leu	Leu	Lys	Leu	Leu	Gln	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ser	His	
1				5					10						15	
Arg	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Val	Cys	Phe	Val	Gly	Val	Val	Val	Thr	Ile	Val	
5			20					25						30		
Ser	Ala	Phe	Gln	Phe	Gly	Glu	VaL	VaL	Leu	Glu	Trp	Ser	Arg	Asp	Gln	
			35			40								45		
Tyr	His	Val	Leu	Phe	Asp	Ser	Tyr	Arg	Asp	Asn	Ile	Ala	Gly	Lys	Ser	
			50				55							60		
10	Phe	Gln	Asn	Arg	Leu	Cys	Leu	Pro	Met	Pro	Ile	Asp	Val	Val	Tyr	Thr
			65				70			75				80		
Trp	Val	Asn	Gly	Thr	Asp	Leu	Glu	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	Gln	Gln	Val	
			85					90						95		
Arg	Glu	His	Met	Glu	Glu	Gln	Arg	Ala	Met	Arg	Glu	Thr	Leu	Gly		
15			100				105							110		
Lys	Asn	Thr	Thr	Glu	Pro	Thr	Lys	Lys	Ser	Glu	Lys	Gln	Leu	Glu	Cys	
			115				120							125		
Leu	Leu	Thr	His	Cys	Ile	Lys	Val	Pro	Met	Leu	Val	Leu	Asp	Pro	Pro	
			130				135							140		
20	Leu	Pro	Ala	Asn	Cys	Thr	Leu	Lys	Asp	Leu	Pro	Thr	Leu	Tyr	Pro	Ser
			145				150				155			160		
Phe	His	Ala	Ala	Ser	Asp	Met	Phe	Asn	Val	Ala	Lys	Pro	Lys	Asn	Pro	
			165					170						175		
Ser	Thr	Asn	Val	Ser	Val	Val	Val	Phe	Asp	Thr	Thr	Lys	Asp	Val	Glu	
25			180				185							190		
Asp	Ala	His	Ala	Gly	Pro	Phe	Lys	Gly	Gly	Ser	Lys	Gln	Met	Val	Trp	
			195				200							205		
Arg	Ala	Tyr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Ala	Pro	Gly	Leu	Val	Leu	Met	
			210				215							220		
30	Gln	Gly	Leu	Ala	Phe	Leu	Ser	Gly	Phe	Pro	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Thr
			225			230				235				240		
Ser	Gln	Leu	Lys	Thr	Lys	Leu	Pro	Glu	Lys	Leu	Ser	Ser	Lys	Ile	Lys	
			245				250							255		
Leu	Leu	Arg	Leu	Tyr	Ser	Glu	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	
35			260				265							270		
Asn	Pro	Lys	Gly	Phe	Gln	Glu	Leu	Asn	Lys	Gln	Thr	Lys	Lys	Asn	Met	
			275				280							285		
Thr	Ile	Asp	Gly	Lys	Glu	Leu	Thr	Ile	Ser	Pro	Ala	Tyr	Leu	Leu	Trp	
			290			295					300					
40	Asp	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser	Gln	Ser	Lys	Gln	Asp	Glu	Asp	Val	Ser	Ala
			305			310			315					320		
Ser	Arg	Phe	Glu	Asp	Asn	Glu	Glu	Leu	Arg	Tyr	Ser	Leu	Arg	Ser	Ile	
			325				330							335		
Glu	Arg	His	Ala	Pro	Trp	Val	Arg	Asn	Ile	Phe	Ile	Val	Thr	Asn	Gly	
45			340				345							350		
Gln	Ile	Pro	Ser	Trp	Leu	Asn	Leu	Asp	Asn	Pro	Arg	Val	Thr	Ile	Val	
			355				360							365		
Thr	His	Gln	Asp	Ile	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	His	Leu	Pro	Thr	Phe	Ser	

RU 2742612 C2

	370	375	380
	Ser Pro Ala Ile Glu Ser His Ile His Arg Ile Glu Gly Leu Ser Gln		
385	390	395	400
	Lys Phe Ile Tyr Leu Asn Asp Asp Val Met Phe Gly Lys Asp Val Trp		
5	405	410	415
	Pro Asp Asp Phe Tyr Ser His Ser Lys Gly Gln Lys Val Tyr Leu Thr		
	420	425	430
	Trp Pro Val Pro Asn Cys Ala Glu Gly Cys Pro Gly Ser Trp Ile Lys		
	435	440	445
10	Asp Gly Tyr Cys Asp Lys Ala Cys Asn Asn Ser Ala Cys Asp Trp Asp		
	450	455	460
	Gly Gly Asp Cys Ser Gly Asn Thr Ala Gly Asn Arg Phe Val Ala Gly		
465	470	475	480
	Gly Gly Gly Thr Gly Asn Ile Gly Ala Gly Gln His Trp Gln Phe Gly		
15	485	490	495
	Gly Gly Ile Asn Thr Ile Ser Tyr Cys Asn Gln Gly Cys Ala Asn Ser		
	500	505	510
	Trp Leu Ala Asp Lys Phe Cys Asp Gln Ala Cys Asn Val Leu Ser Cys		
	515	520	525
20	Gly Phe Asp Ala Gly Asp Cys Gly Gln Asp His Phe His Glu Leu Tyr		
	530	535	540
	Lys Val Thr Leu Leu Pro Asn Gln Thr His Tyr Val Val Pro Lys Gly		
545	550	555	560
	Glu Tyr Leu Ser Tyr Phe Ser Phe Ala Asn Ile Ala Arg Arg Gly Val		
25	565	570	575
	Glu Gly Thr Tyr Ser Asp Asn Pro Ile Ile Arg His Ala Ser Ile Ala		
	580	585	590
	Asn Lys Trp Lys Thr Ile His Leu Ile Met His Ser Gly Met Asn Ala		
	595	600	605
30	Thr Thr Ile Tyr Phe Asn Leu Thr Leu Gln Asn Ala Asn Asp Glu Glu		
	610	615	620
	Phe Lys Ile Gln Ile Ala Val Glu Val Asp Thr Arg Glu Ala Pro Lys		
625	630	635	640
	Leu Asn Ser Thr Thr Gln Lys Ala Tyr Glu Ser Leu Val Ser Pro Val		
35	645	650	655
	Thr Pro Leu Pro Gln Ala Asp Val Pro Phe Glu Asp Val Pro Lys Glu		
	660	665	670
	Lys Arg Phe Pro Lys Ile Arg Arg His Asp Val Asn Ala Thr Gly Arg		
	675	680	685
40	Phe Gln Glu Glu Val Lys Ile Pro Arg Val Asn Ile Ser Leu Leu Pro		
	690	695	700
	Lys Glu Ala Gln Val Arg Leu Ser Asn Leu Asp Leu Gln Leu Glu Arg		
705	710	715	720
	Gly Asp Ile Thr Leu Lys Gly Tyr Asn Leu Ser Lys Ser Ala Leu Leu		
45	725	730	735
	Arg Ser Phe Leu Gly Asn Ser Leu Asp Thr Lys Ile Lys Pro Gln Ala		
	740	745	750
	Arg Thr Asp Glu Thr Lys Gly Asn Leu Glu Val Pro Gln Glu Asn Pro		

RU 2742612 C2

	755	760	765
	Ser His Arg Arg Pro His Gly Phe Ala Gly Glu His Arg Ser Glu Arg		
	770	775	780
	Trp Thr Ala Pro Ala Glu Thr Val Thr Val Lys Gly Arg Asp His Ala		
5	785	790	795
	Leu Asn Pro Pro Pro Val Leu Glu Thr Asn Ala Arg Leu Ala Gln Pro		800
	805	810	815
	Thr Leu Gly Val Thr Val Ser Lys Glu Asn Leu Ser Pro Leu Ile Val		
	820	825	830
10	Pro Pro Glu Ser His Leu Pro Lys Glu Glu Glu Ser Asp Arg Ala Glu		
	835	840	845
	Gly Asn Ala Val Pro Val Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg Arg Leu Gln		
	850	855	860
	Gln Asn Tyr Pro Gly Phe Leu Pro Trp Glu Lys Lys Tyr Phe Gln		
15	865	870	875
	Asp Leu Leu Asp Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gln Leu Ala Tyr Phe		880
	885	890	895
	Thr Asp Ser Lys His Thr Gly Arg Gln Leu Lys Asp Thr Phe Ala Asp		
	900	905	910
20	Ser Leu Arg Tyr Val Asn Lys Ile Leu Asn Ser Lys Phe Gly Phe Thr		
	915	920	925
	Ser Arg Lys Val Pro Ala His Met Pro His Met Ile Asp Arg Ile Val		
	930	935	940
	Met Gln Glu Leu Gln Asp Met Phe Pro Glu Glu Phe Asp Lys Thr Ser		
25	945	950	955
	Phe His Lys Val Arg His Ser Glu Asp Met Gln Phe Ala Phe Ser Tyr		960
	965	970	975
	Phe Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Val Gln Pro Leu Asn Ile Ser Gln Val		
	980	985	990
30	Phe His Glu Val Asp Thr Asp Gln Ser Gly Val Leu Ser Asp Arg Glu		
	995	1000	1005
	Ile Arg Thr Leu Ala Thr Arg Ile His Asp Leu Pro Leu Ser Leu Gln		
	1010	1015	1020
	Asp Leu Thr Gly Leu Glu His Met Leu Ile Asn Cys Ser Lys Met Leu		
35	1025	1030	1035
	Pro Ala Asn Ile Thr Gln Leu Asn Asn Ile Pro Pro Thr Gln Glu Ala		1040
	1045	1050	1055
	Tyr Tyr Asp Pro Asn Leu Pro Pro Val Thr Lys Ser Leu Val Thr Asn		
	1060	1065	1070
40	Cys Lys Pro Val Thr Asp Lys Ile His Lys Ala Tyr Lys Asp Lys Asn		
	1075	1080	1085
	Lys Tyr Arg Phe Glu Ile Met Gly Glu Glu Glu Ile Ala Phe Lys Met		
	1090	1095	1100
	Ile Arg Thr Asn Val Ser His Val Val Gly Gln Leu Asp Asp Ile Arg		
45	1105	1110	1115
	Lys Asn Pro Arg Lys Phe Val Cys Leu Asn Asp Asn Ile Asp His Asn		1120
	1125	1130	1135
	His Lys Asp Ala Arg Thr Val Lys Ala Val Leu Arg Asp Phe Tyr Glu		

	1140	1145	1150	
	Ser Met Phe Pro Ile Pro Ser Gln Phe Glu Leu Pro Arg Glu Tyr Arg			
	1155	1160	1165	
	Asn Arg Phe Leu His Met His Glu Leu Gln Glu Trp Arg Ala Tyr Arg			
5	1170	1175	1180	
	Asp Lys Leu Lys Phe Trp Thr His Cys Val Leu Ala Thr Leu Ile Ile			
	1185	1190	1195	1200
	Phe Thr Ile Phe Ser Phe Phe Ala Glu Gln Ile Ile Ala Leu Lys Arg			
	1205	1210	1215	
10	Lys Ile Phe Pro Arg Arg Arg Ile His Lys Glu Ala Ser Pro Asp Arg			
	1220	1225	1230	
	Ile Arg Val			
	1235			

(57) Формула изобретения

1. Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) для лечения муколипидоза типа II (ML II) или муколипидоза типа III (ML III) у млекопитающего, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазу (GNPTAB), и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) AAV, причем вектор содержит составной промотор на основе энхансера CMV/промотора бета-актина курицы (CBA), причем:

(i) промотор СВА представляет собой модифицированный промотор СВА, необязательно усеченный промотор СВА, и/или

(ii) энхансер CMV представляет собой укороченный энхансер CMV;

и где необязательно:

(a) GNPTAB содержит альфа- и бета-субъединицы;

(b) GNPTAB функционально связан с промотором;

(c) GNPTAB представляет собой GNPTAB человека;

(d) GNPTAB содержит аминокислотную последовательность, которая является по

меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1;

(e) GNPTAB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1; и/или

(f) концевой повтор AAV представляет собой ITR серотипа AAV1, AAV2, AAV3,

35 AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11,

AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV козы, AAV крупного рогатого скота или AAV мыши.

2. Вектор на основе rAAV по п. 1, где вектор содержит:

(a) инtron, необязательно инtron MVM;

40 (b) последовательность полиаденилирования, необязательно последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста; и/или

(c) два ITR.

3. Частица rAAV, содержащая вектор на основе rAAV по п. 1 или 2, где частица rAAV содержит капсид, при этом частица rAAV необязательно содержит:

(a) капсид серотипа AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8,

AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV

DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV козы, химерный AAV1/

AAV2, AAV крупного рогатого скота, AAV мыши или rAAV2/HBoV1; и/или

(b) (1) по меньшей мере один ITR и капсид получены из одного и того же серотипа AAV, или

(2) по меньшей мере один ITR получен из серотипа AAV, отличного от такового для капсида вирусной частицы rAAV, при этом частица rAAV необязательно содержит 5 капсид AAV8 и ITR AAV2.

4. Частица rAAV по п. 3, где частица rAAV получена с помощью трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей вектор на основе rAAV, и нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементыгер и сар ААВ, и обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы помощника ААВ, где

10 необязательно функциональные элементы помощника ААВ получены путем трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементы помощника ААВ, или функциональные элементы помощника ААВ получены путем инфицирования клетки-хозяина вирусом-помощником ААВ, который обеспечивает функциональные элементы помощника ААВ, при этом вирус-помощник ААВ

15 необязательно представляет собой аденоовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус.

5. Частица rAAV по п. 3, где частица rAAV получена с помощью клетки-продуцента ААВ, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вектор на основе rAAV, и нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональные элементыгер и сар ААВ, и обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы помощника

20 ААВ, где необязательно клетка-продуцент ААВ содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональные элементы помощника ААВ, или функциональные элементы помощника ААВ получены путем инфицирования клеток-продуцентов ААВ вирусом-помощником ААВ, который обеспечивает функциональные элементы помощника ААВ, при этом вирус-помощник ААВ необязательно представляет собой

25 аденоовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус.

6. Фармацевтическая композиция для лечения муколипидоза типа II (ML II) или муколипидоза типа III (ML III) у млекопитающего, содержащая частицу rAAV по любому из пп. 3-5.

7. Способ лечения муколипидоза типа II (ML II) или муколипидоза типа III (ML III)

30 у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества частицы rAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтической композиции по п.6, где необязательно лечение уменьшает интенсивность или замедляет прогрессирование одного или нескольких симптомов ML II или ML III, где один или несколько симптомов ML II или ML III представляют собой дефекты скелета, когнитивные нарушения,

35 задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса, выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, утолщение и недостаточность митрального клапана, запор или диарею.

8. Способ сохранения, предупреждения снижения или увеличения размера тела,

40 содержания минеральных веществ в костной ткани или минеральной плотности костной ткани у млекопитающего с муколипидозом типа II (ML II) или муколипидозом типа III (ML III), включающий введение млекопитающему эффективного количества частиц rAAV, где частицы rAAV содержат вектор на основе rAAV, где вектор на основе rAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюкозамин-1-

45 фосфаттрансферазу (GNPTAB), и по меньшей мере один ITR ААВ, где экспрессия GNPTAB приводит к сохранению, предупреждению снижения или увеличению веса тела; сохранению или увеличению роста; и/или сохранению, предупреждению снижения или увеличению содержания минеральных веществ в костной ткани или минеральной

плотности костной ткани.

9. Способ уменьшения интенсивности или замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества частиц гAAV, где частицы гAAV содержат вектор на основе гAAV, где вектор на основе гAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую GNPTAB, и по меньшей мере один ITR AAV; где один или несколько симптомов ML II или ML III представляют собой дефекты скелета, когнитивные нарушения, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса, выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, утолщение и недостаточность митрального клапана, запор или диарею.

10. Способ по любому из пп. 7-9, где:

(а) GNPTAB функционально связан с промотором;

(б) GNPTAB представляет собой GNPTAB человека;

15 (в) GNPTAB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1;

(г) GNPTAB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1; и/или

(е) концевой повтор AAV представляет собой ITR серотипа AAV1, AAV2, AAV3,

20 AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV козы, AAV крупного рогатого скота или AAV мыши.

11. Способ по п. 10, где вектор содержит:

(а) составной промотор на основе энхансера CMV/промотора бета-актина курицы

25 (СВА), где необязательно:

(и) промотор СВА представляет собой модифицированный промотор СВА, необязательно усеченный промотор СВА, и/или

(ii) энхансер CMV представляет собой укороченный энхансер CMV;

(б) инtron, необязательно инtron MVM;

30 (с) последовательность полиаденилирования, необязательно последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста; и/или

(д) два ITR.

12. Способ по любому из пп. 7-11, где частица AAV содержит капсид, при этом частица гAAV необязательно содержит:

35 (а) капсид серотипа AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV козы, химерный AAV1/AAV2, AAV крупного рогатого скота, AAV мыши или гAAV2/HBoV1; и/или

(б) (1) по меньшей мере один ITR и капсид получены из одного и того же серотипа

40 AAV, или

(2) по меньшей мере один ITR получен из серотипа AAV, отличного от такового для капсида вирусной частицы гAAV, при этом частица гAAV необязательно содержит капсид AAV8 и ITR AAV2.

13. Способ по любому из пп. 7-12, где частица гAAV получена с помощью трансфекции

45 клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующющей вектор на основе гAAV, и

нуклеиновой кислотой, кодирующими функциональные элементы гер и кап AAV, и

обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы помощника AAV, где необязательно функциональные элементы помощника AAV получены путем

трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементы помощника AAV, или функциональные элементы помощника AAV получены путем инфицирования клетки-хозяина вирусом-помощником AAV, который обеспечивает функциональные элементы помощника AAV, при этом вирус-помощник AAV

5 необязательно представляет собой аденоовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус.

14. Способ по любому из пп. 7-12, где частица rAAV получена с помощью клетки-продуцента AAV, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вектор на основе rAAV, и нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональные элементы гер и сар AAV, и обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы

10 помощника AAV, где необязательно клетка-продуцент AAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональные элементы помощника AAV, или

функциональные элементы помощника AAV получены путем инфицирования клеток-продуцентов AAV вирусом-помощником AAV, который обеспечивает функциональные элементы помощника AAV, при этом вирус-помощник AAV необязательно представляет

15 собой аденоовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус.

16. Способ по любому из пп. 7-14, где млекопитающее представляет собой человека, необязательно педиатрического субъекта или взрослого субъекта молодого возраста.

17. Способ по любому из пп. 7-15, где:

(а) частицу rAAV вводят внутривенно, внутрибрюшинно, внутриартериально,

20 внутримышечно, подкожно или внутрипеченочно;

(б) частицу rAAV вводят в более чем одно местоположение;

(с) введение повторяют; и/или

(д) вирусные частицы rAAV находятся в фармацевтической композиции.

18. Применение частицы rAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтической

композиции по п. 6 в получении лекарственного средства для лечения ML II или ML III у млекопитающего, необязательно человека, необязательно с помощью способа по любому из пп. 7-16.

25 30 человека, необязательно с помощью способа по любому из пп. 7-16.

19. Применение частицы rAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтической композиции по п. 6 в получении лекарственного средства для уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего, необязательно человека, или замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов ML II

35 или ML III у млекопитающего, необязательно человека, где один или несколько симптомов ML II или ML III необязательно представляют собой дефекты скелета, когнитивные нарушения, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса, выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, 40 утолщение и недостаточность митрального клапана, запор или диарею.

20. Применение частицы rAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтической композиции по п. 6 для уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего, необязательно человека, или замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов ML II или ML III у

45 млекопитающего, необязательно человека, где один или несколько симптомов ML II или ML III необязательно представляют собой дефекты скелета, когнитивные нарушения, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного тонуса, выступающий живот, пупочные грыжи, прогрессирующее утолщение слизистой

оболочки дыхательных путей, частые респираторные инфекции, утолщение и недостаточность митрального клапана, запор или диарею.

21. Набор для лечения ML II или ML III у млекопитающего, содержащий вектор на основе rAAV по п. 1 или 2, частицу rAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтическую 5 композицию по п. 6, необязательно дополнительно содержащий один или несколько буферов или фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ и/или инструкции по применению при лечении ML II и/или ML III.

22. Набор для лечения ML II или ML III в соответствии со способом по любому из 10 пп. 7-16, где набор содержит вектор на основе rAAV по п. 1 или 2, частицу rAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтическую композицию по п. 6.

15

20

25

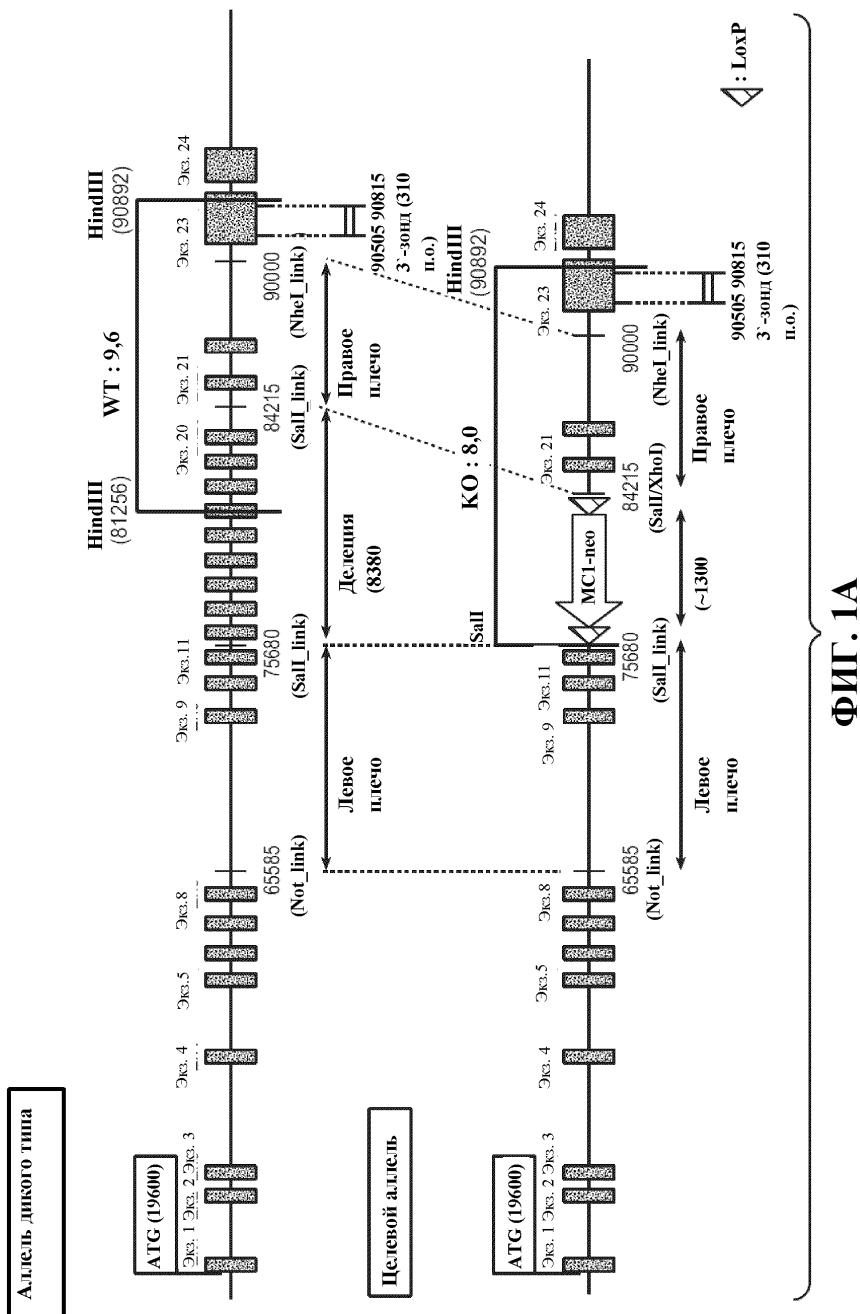
30

35

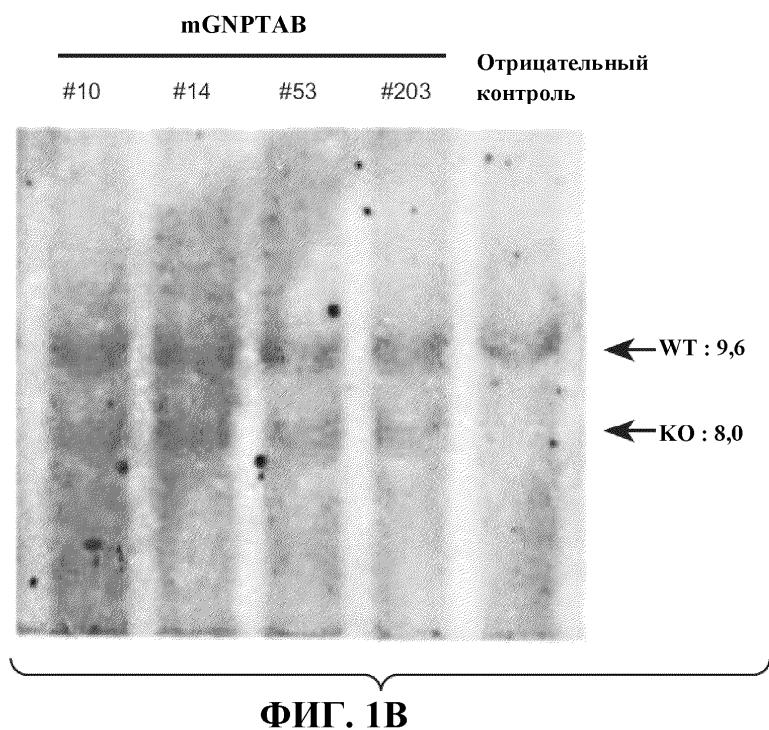
40

45

1/13

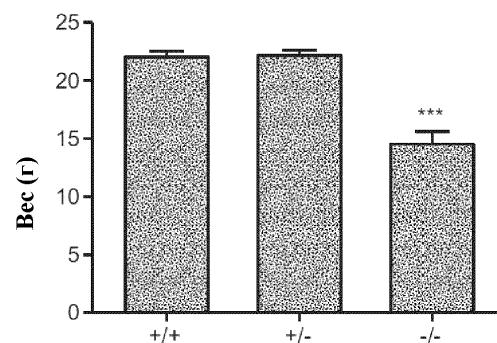


2/13

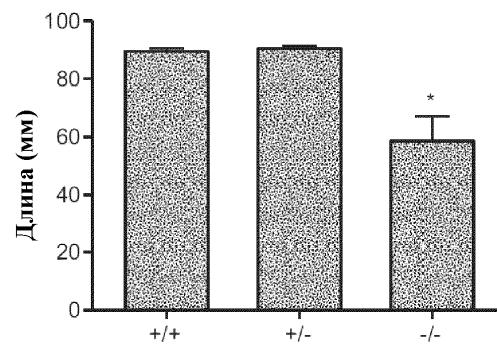


3/13

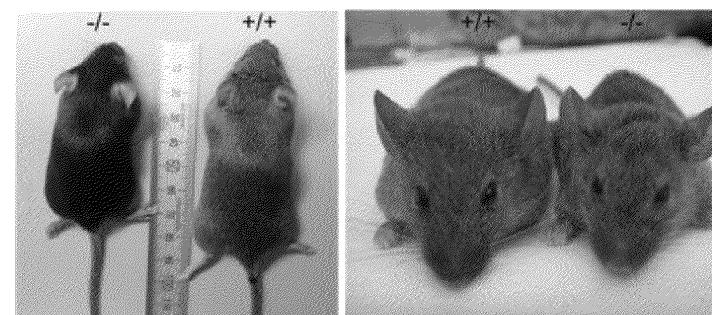
ФИГ. 2А



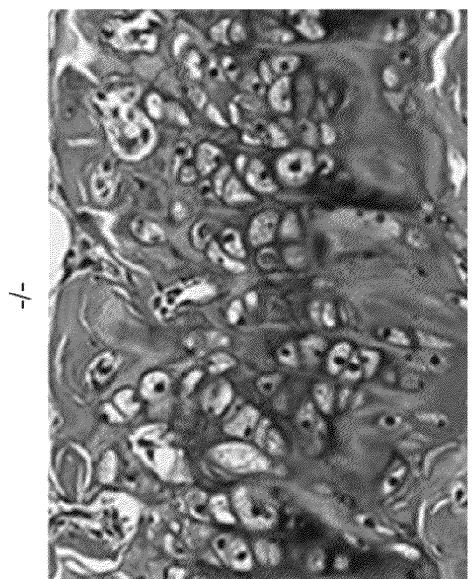
ФИГ. 2В



ФИГ. 2С



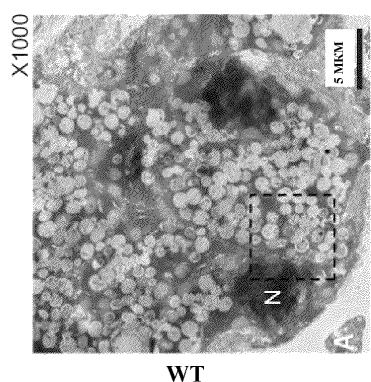
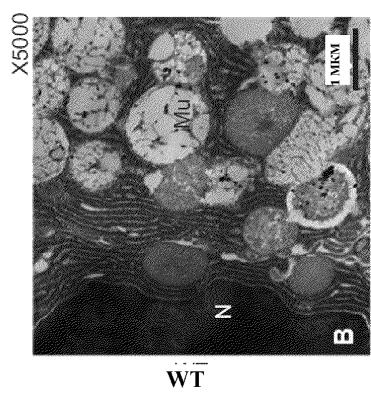
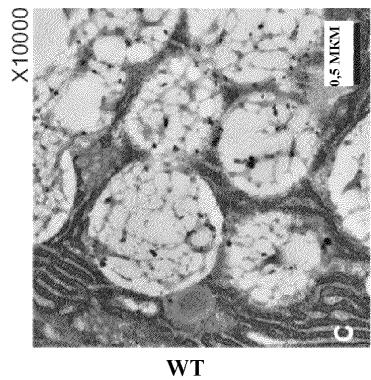
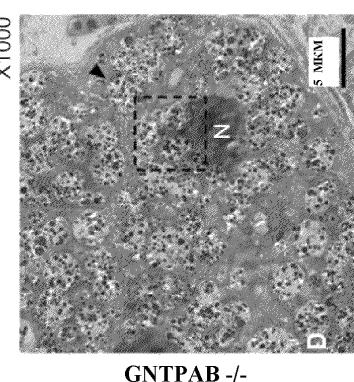
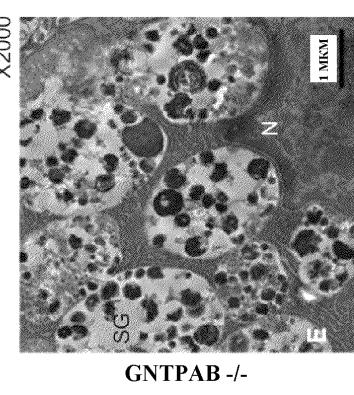
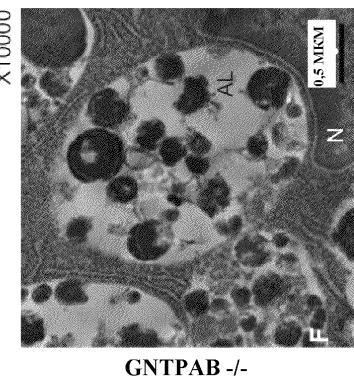
4/13



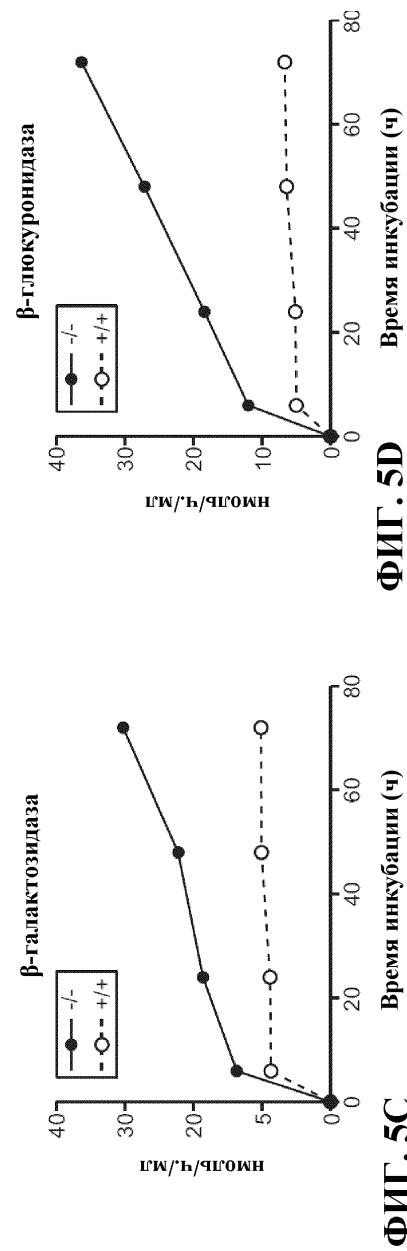
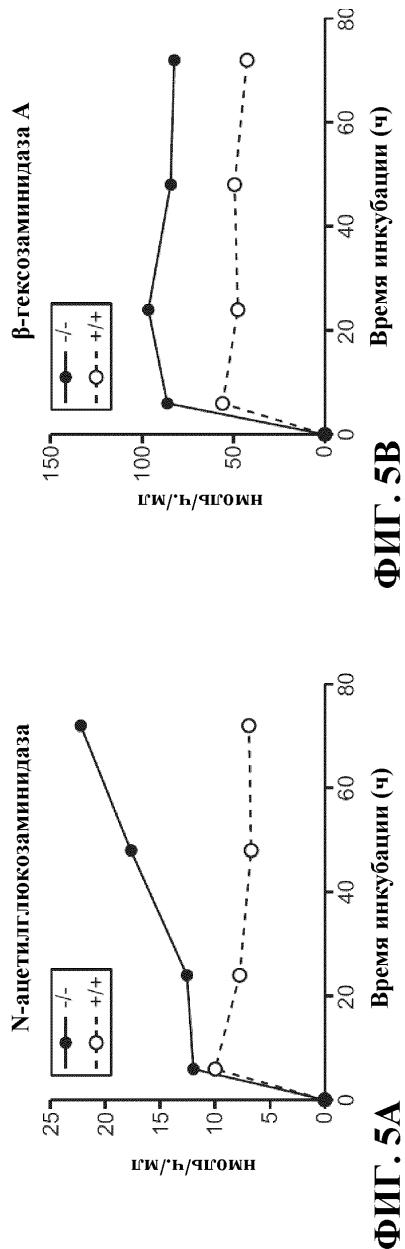
ФИГ. 3В

ФИГ. 3А

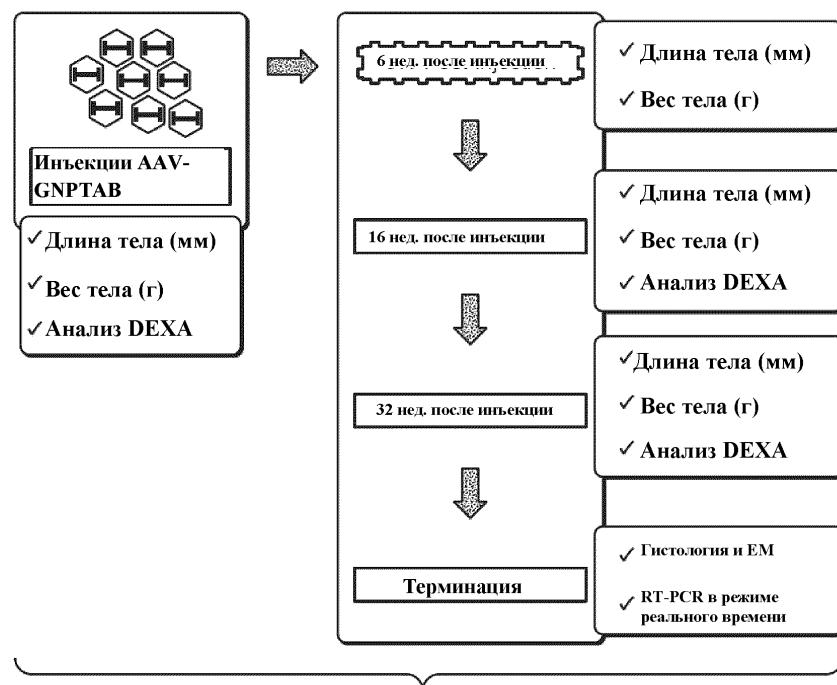
5/13

ФИГ. 4А**ФИГ. 4В****ФИГ. 4С****ФИГ. 4Д****ФИГ. 4Е****ФИГ. 4F**

6/13



7/13

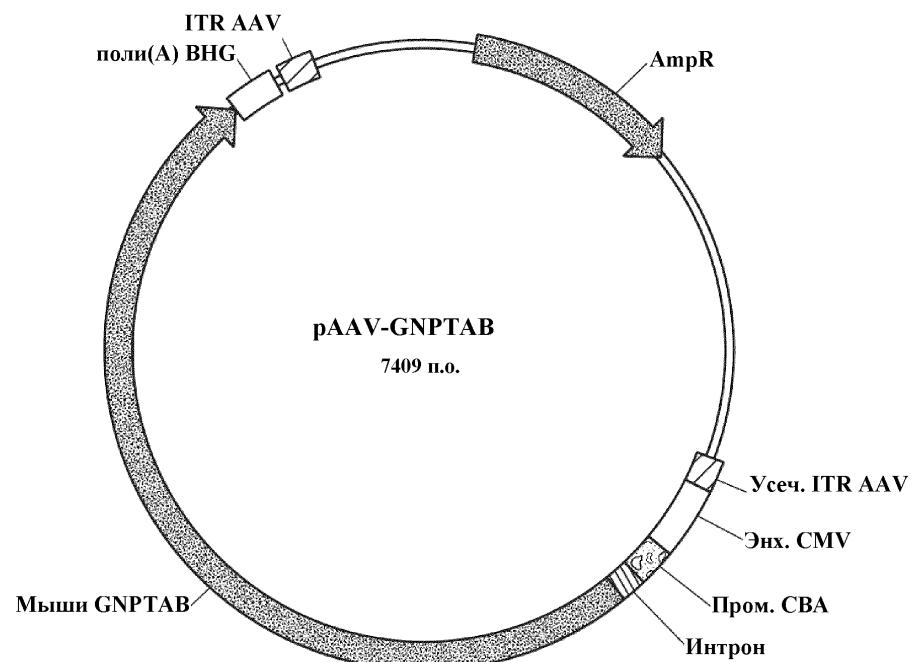


ФИГ. 6А

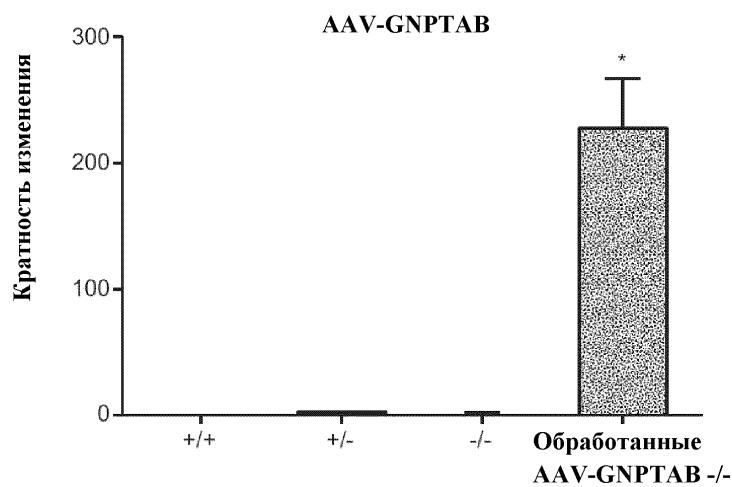
Животные	Обработка	Возраст при
Дикий тип (n=5)	PBS (плацебо)	
Тип гетеро (n=5)	PBS (плацебо)	
Тип KO (n=5)	PBS (плацебо)	Все мыши в 38 недель (долгосрочное лечение)
Тип KO (n=4)	3E11 капл. AAV-GNPTAB	

ФИГ. 6В

8/13

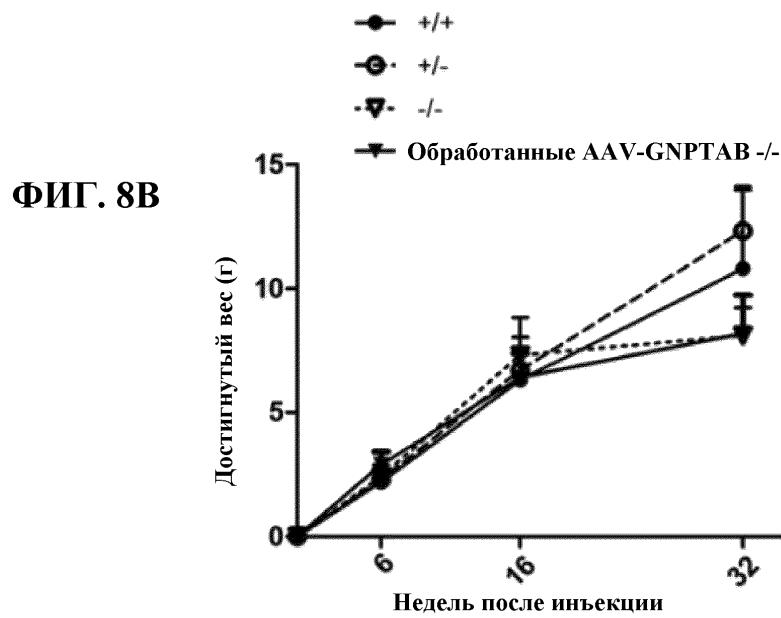
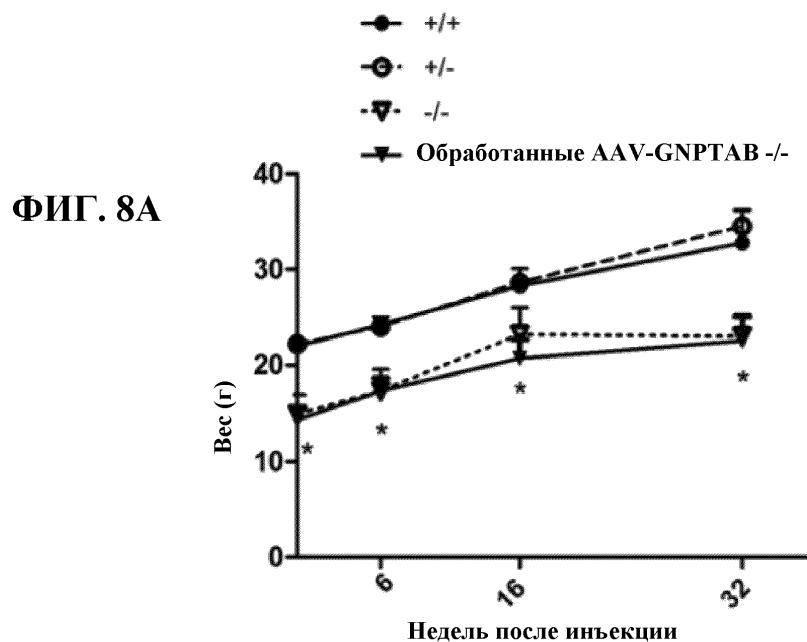


ФИГ. 7А

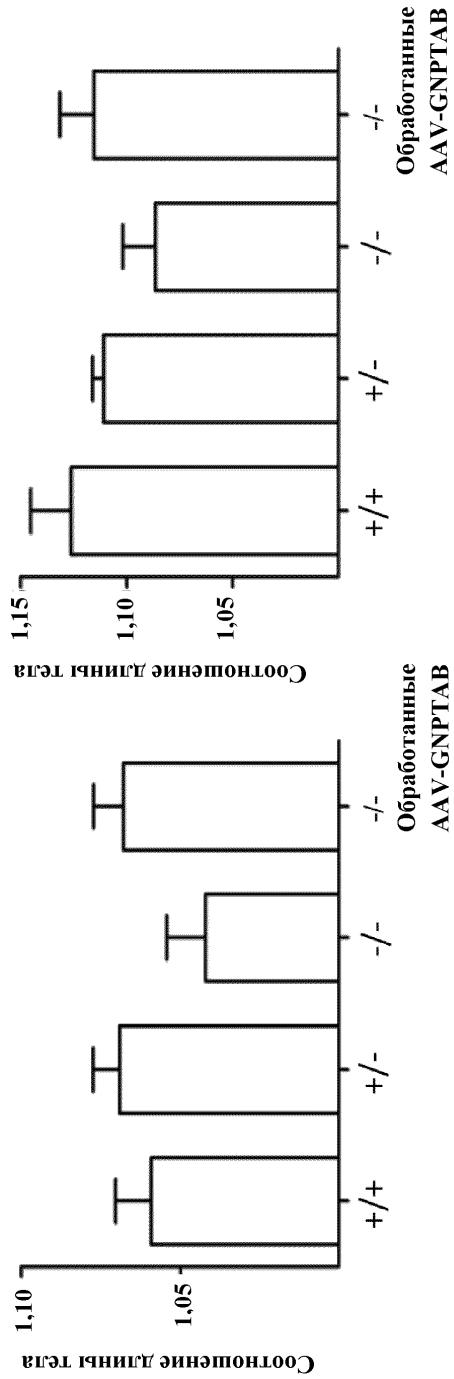


ФИГ. 7В

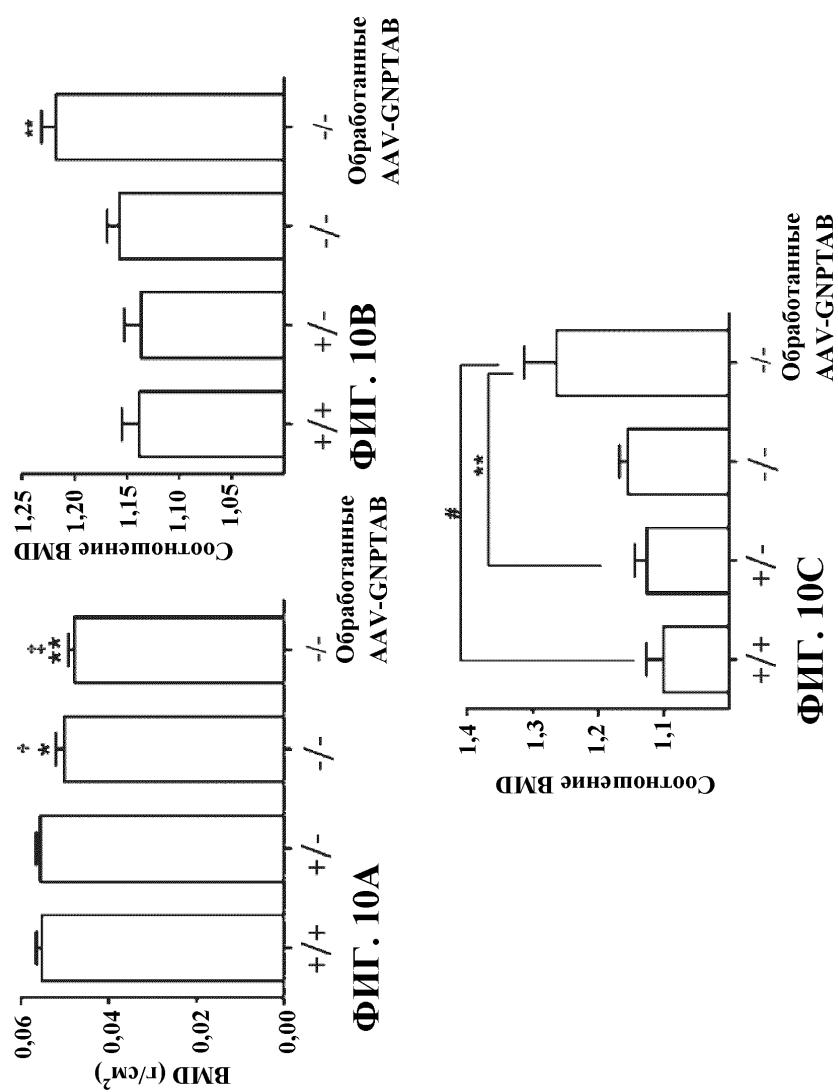
9/13



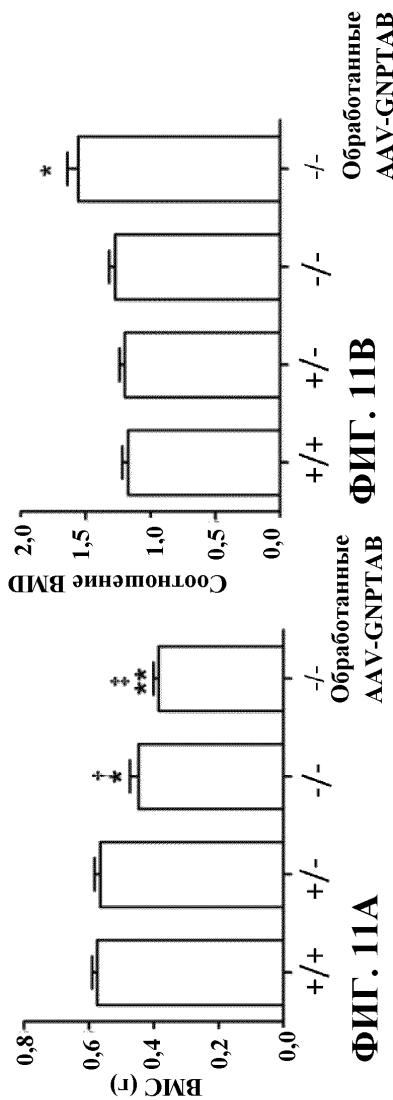
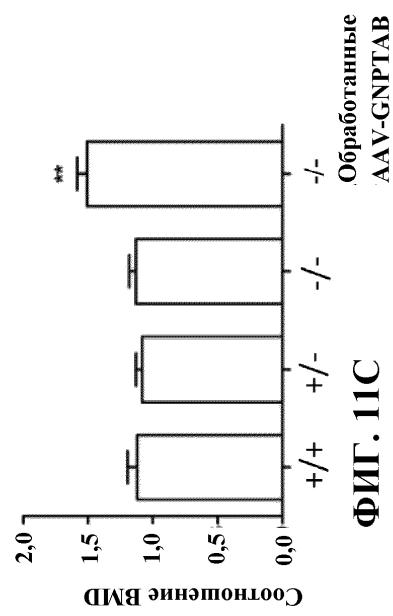
10/13



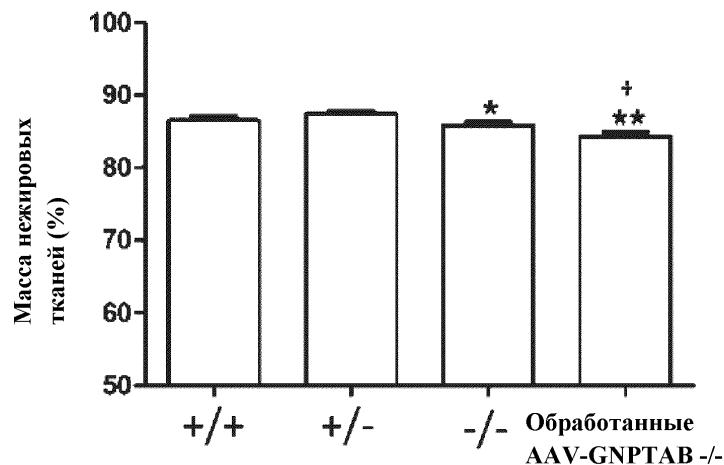
11/13



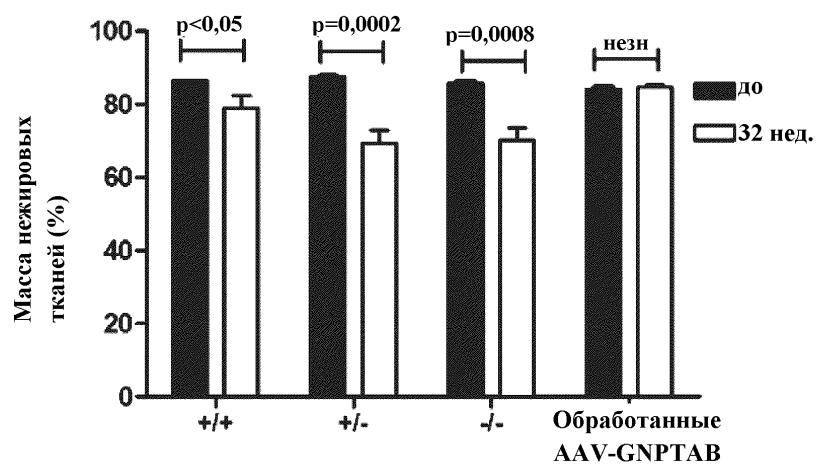
12/13

**ФИГ. 11Б**

13/13



ФИГ. 12А



ФИГ. 12В