



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
А, 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 (гAAV), 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.



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:
14.12.2016Registration 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 PABLIK UELFER
FAUNDEJSHN (KR)****(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 mucopolipidosis type II (ML II) or mucopolipidosis 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 mucopolipidosis type II (ML II) or mucopolipidosis 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.

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 составления: 9 декабря 2016 г., размер: 21 кБ).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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 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 ферментативной активности, обнаружены у пациентов с MLII. Муколипидоз II является высоко прогрессирующим, 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 трансплантацию 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 транскриптов, обеспечивает возможность 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 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 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 аденоассоциированного вируса (гAAV), 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. В некоторых вариантах осуществления 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 интрон. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой интрон 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 гAAV содержит два ITR.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу гAAV, содержащую вектор на основе гAAV согласно любому из вышеприведенных 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 гAAV2/HBoV1. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит один или несколько ITR и капсид, полученные из одного и того же серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит один или несколько ITR, полученных из серотипа AAV, отличного от такового для капсида вирусных частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид AAV8, и где вектор содержит ITR AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV получена с помощью трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей вектор на основе гAAV, и нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементы гер 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 аденовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV получена с помощью клетки-

продуцента AAV, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вектор на основе gAAV, 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 аденовирус, вирус простого герпеса или бакуловир. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую любые частицы gAAV, 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 gAAV, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ лечения муколипидоза типа II (ML II) или муколипидоза типа III (ML III) у млекопитающего,

 20 включающий введение млекопитающему эффективного количества частиц gAAV, где частицы gAAV содержат вектор на основе gAAV, где вектор на основе gAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазу (GNPTAB), и по меньшей мере один ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления настоящее 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 gAAV, где частицы gAAV содержат вектор на основе gAAV, где вектор на основе gAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюкозамин-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 настоящее 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 gAAV, где

 35 частицы gAAV содержат вектор на основе gAAV, где вектор на основе gAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазу (GNPTAB), и по меньшей мере один ITR AAV, где экспрессия GNPTAB предупреждает снижение веса тела. В некоторых вариантах осуществления настоящее 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 gAAV, где частицы gAAV содержат вектор на основе gAAV, где вектор на основе gAAV 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 настоящее 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 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, 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 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 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, 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 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 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. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ 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.

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
10 приблизительно 80% идентична 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. В некоторых вариантах
15 осуществления 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 интрон. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой интрон MVM. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит
20 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,
25 AAV2R471A, AAV DJ, AAV козы, AAV крупного рогатого скота или AAV мыши. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV 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, 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 gAAV2/HBoV1. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько ITR и капсид, полученные из одного и того же серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько ITR, полученных из серотипа AAV, отличного от такового для капсида
35 вирусных частиц gAAV. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV8, и где вектор содержит ITR AAV2.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных вариантов осуществления частица gAAV получена с помощью трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей вектор на основе gAAV, и нуклеиновой кислотой, кодирующей
40 функциональные элементы гер 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
45 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 аденовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус. В некоторых

вариантах осуществления частица гAAV получена с помощью клетки-продуцента AAV, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вектор на основе гAAV, 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 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 аденовирус, вирус простого герпеса или бакуловир.

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.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов гAAV вводят внутривенно, внутрибрюшинно, внутриартериально, внутримышечно, подкожно или внутripеченочно. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят в более чем одно местоположение. В некоторых вариантах осуществления введение повторяют. В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы гAAV 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 гAAV, 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 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 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 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, 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.

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 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 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-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазы (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 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 геном, кодирующим репортер и/или селективируемый маркер. В некоторых вариантах осуществления селективируемый 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 селективируемый маркер. В некоторых вариантах осуществления
15 селективируемый 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
40 по GNPTAB мышей.

ФИГ. 1В представляет собой Саузерн-блоттинг, показывающий мышинные клоны 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
45 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).

5 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
10 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-5D показана активность лизосомальных ферментов в сыворотке мышей дикого типа (незакрашенные кружки) и КО (закрашенные кружки), как отмечено.

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

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
20 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
25 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
30 (* $p < 0,05$, критерий множественного сравнения Даннета). (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
35 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
40 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 с AAV-GNPTAB приводило к статистически значимому увеличению отношения BMD (после/до Tx) у гомозиготных
45 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 P определяли с помощью анализов с двусторонним непарным t-критерием. Данные представлены в виде среднего значения \pm 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. (\dagger ; $p < 0,05$, \ddagger ; $p < 0,02$ 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
 отношения BMD по сравнению с другими мышами (**; $P < 0,02$). (ФИГ. 11С): через 32
 15 недели после лечения наблюдали значительные различия отношения BMD у мышей,
 получавших лечение с GNPTAB. (#; $p < 0,05$, **; $p < 0,02$). Значения P определяли с помощью
 анализов с двусторонним непарным t-критерием. Данные представлены в виде среднего
 значения \pm 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. (\dagger ; $p < 0,02$ 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 P определяли с помощью
 анализов с двусторонним непарным t-критерием. Данные представлены в виде среднего
 значения \pm SEM.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

30 В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает 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. 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.

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
 40 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 rAAV, частицы rAAV 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 нуклеиновой 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 нуклеиновой кислоты может включать в себя полимер из синтетических субъединиц, таких как фосфорамидаты, и, таким образом, может представлять собой

олигодезоксинуклеозидный фосфорамидат (P-NH₂) или смешанный фосфорамидатно-фосфодиэфирный олигомер. Кроме того, двухцепочечную нуклеиновую кислоту можно получить из одноцепочечного полинуклеотидного продукта химического синтеза посредством либо синтеза комплементарной цепи и отжига цепей в соответствующих условиях, либо посредством синтеза комплементарной цепи de novo с использованием ДНК-полимеразы с соответствующим праймером.

Термины "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков, и не ограничены минимальной длиной. Такие полимеры из аминокислотных остатков могут содержать природные или неприродные 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, сиамирование, 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 полученными с помощью сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, 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 последовательностей (т. е. последовательность нуклеиновой кислоты, не происходящую от вируса). В случае векторов на основе рекомбинантного AAV, рекомбинантную нуклеиновую кислоту фланкируют с помощью по меньшей мере одной, например двух, последовательностей инвертированных концевых повторов (ITR).

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

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

"Гетерологичный" означает полученный из объекта, генотипически отличающегося 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). 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 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", используемые в отношении вирусного титра, относятся к числу вирионов, содержащих ДНК-геном рекомбинантного ААV, 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) 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 ААV, как измерено с помощью анализа центров инфекции, также 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 ААV, которые приводят к получению функционального трансгенного продукта, 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 коротким последовательностям, встречающимся на концах вирусных геномов, которые имеют противоположную ориентацию.

Последовательность "инвертированного концевого повтора (ITR) ААV", термин, хорошо известный из уровня техники, обозначает последовательность из примерно 145 нуклеотидов, которая присутствует на обоих концах нативного одностороннего генома ААV. Крайние 125 нуклеотидов ITR могут присутствовать в любой из двух альтернативных ориентаций, что обуславливает гетерогенность между различными геномами ААV и между двумя концами одного генома ААV. Крайние 125 нуклеотидов также содержат несколько более коротких областей самокомплементарности

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

"Последовательность концевой разрешенности" или "trs" представляет собой последовательность в D-области ITR AAV, которая отщепляется белками гер AAV в ходе репликации вирусной ДНК. Мутантная последовательность концевой разрешенности устойчива к отщеплению белками гер AAV. "Функциональными элементами помощника AAV" называют функциональные 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 генотоксичные средства.

"Функциональными элементами помощника AAV" называют функциональные 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 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 аденовирусы, герпесвирусы, поксвирусы, такие как вирус осповакцины, и бакуловирус. Аденовирусы охватывают множество различных подгрупп, однако наиболее широко применяется аденовирус 5 типа подгруппы C (Ad5). Многочисленные аденовирусы человека, млекопитающих, отличных от человека, и птиц, известны и доступны из депозитариев, таких как ATCC. Вирусы семейства герпесвирусов, которые также доступны из депозитариев, таких как ATCC, включают, например, вирусы простого герпеса (HSV), вирусы Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловирусы (CMV) и вирусы псевдобешенства (PRV). Бакуловирусы, доступные из депозитариев, включают вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica*.

Термин "процентная (%) идентичность последовательностей" относительно эталонной полипептидной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты 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 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 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 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 данной аминокислотной последовательности В, с ней или в сравнении с ней), рассчитывается следующим образом: $100 \times \frac{X}{Y}$, 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 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 нуклеиновой кислоты, свойственная данной последовательности нуклеиновой кислоты С, в отношении данной последовательности нуклеиновой кислоты D, с ней или в сравнении с ней (что в качестве альтернативы можно перефразировать как данная последовательность нуклеиновой кислоты С, которая характеризуется или обладает определенной % идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты в отношении данной последовательности нуклеиновой кислоты D, с ней или в сравнении с ней), рассчитывается следующим образом: $100 \times \frac{W}{Z}$, 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 принимать во внимание, что если длина последовательности нуклеиновой кислоты С не равна длине последовательности нуклеиновой кислоты D, то % идентичность последовательности нуклеиновой кислоты С в отношении D не будет равна % идентичности последовательности нуклеиновой кислоты D в отношении С.

Термин "выделенная" молекула (например, нуклеиновая кислота или белок) или 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 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 нуклеиновой кислоты, такой как терапевтический полипептид или терапевтическая нуклеиновая 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 нуклеиновой кислоты, кодирующей GNPTAB, составляет приблизительно 4,7 т.о. В некоторых вариантах осуществления размер нуклеиновой кислоты, кодирующей GNPTAB, составляет менее чем приблизительно 4,7 т.о. В некоторых вариантах осуществления вариант (например, усеченная) GNPTAB содержит альфа- и бета-субъединицы. В некоторых вариантах осуществления вариант 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 вариант 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 norvegicus*), и NP_001038233 (*Danio rerio*).

"Муколипидоз типа II" (термины MLII, ML-II, и ML типа II могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо) и "муколипидоз типа III" (термины MLIII, ML-III и ML типа III могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо) относятся к классу заболеваний, вызванных мутациями в гене GNPTAB. Оба заболевания являются аутомно-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 интрон 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 взаимозаменяемо. Используемый в данном документе термин "ранний энхансер CMV/промотор бета-актина курицы (CAG)" может использоваться взаимозаменяемо.

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, частицах 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, кодирующим 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 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 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 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 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 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления GNPTAB представляет собой усеченный 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 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 вариант 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 (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 транстиретаина (TTR), промотор ТК, тетрациклин-чувствительный 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 цитомегаловируса (CMV), соединенный с промотором β -актина курицы (CBA). В некоторых вариантах осуществления промотор содержит модифицированный или усеченный промотор CBA. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит укороченный энхансер CMV.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит интрон. Например, в некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой химерный интрон, полученный из бета-актина курицы и бета-глобина кролика. В некоторых вариантах осуществления интрон представляет собой интрон мелкого вируса мышей (MVM).

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 рА ТК HSV.

Не желая ограничиваться теорией, вследствие большого размера кодирующей последовательности GNPTAB может быть выгодно минимизировать размер других элементов вектора на основе гAAV (например, промотора, энхансера, интрона, 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 гAAV. Способы получения укороченного варианта 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 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 гAAV по настоящему изобретению может включать в себя модифицированный, усеченный и/или укороченный энхансер CMV/промотор CBA, например, как описано в данном документе. Аналогичные способы можно использовать для идентификации укороченных вариантов интрона, которые сохраняют надлежащие уровни транскрипции, стабильности mRNA и/или сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV по настоящему изобретению может включать в себя укороченный интрон, как описано в данном документе. Аналогичные 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 гAAV по настоящему изобретению может включать в себя укороченную последовательность поли(A), как описано в данном документе. В 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, интрон, сигнал поли(А) и/или точку начала репликации.

IV. Вирусные частицы и способы получения вирусных частиц

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к частицам гAAV, 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 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 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 осуществления 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.

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 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 gAAV2/HBoV1, или капсида AAV, описанного в патенте США №8283151 или в Международной публикации №WO/2003/042397. В дополнительных вариантах осуществления частица gAAV 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, больной ткани) используются различные серотипы AAV. Частица gAAV может содержать белки вируса и нуклеиновые кислоты вируса одного и того же серотипа или смешанного серотипа. Например, частица gAAV может содержать один или несколько ITR и капсид, полученные из одного и того же серотипа AAV, или частица gAAV может содержать один или несколько ITR, полученных из серотипа AAV, отличного от такового для капсида частиц gAAV. В определенных вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV8 и один или несколько (например, 2) ITR AAV2.

Получение частиц AAV

Из уровня техники известны многочисленные способы получения векторов на основе gAAV, в том числе трансфекция, стабильное продуцирование клеточной линии и системы 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 gAAV для получения вирусных частиц gAAV необходимы: 1) подходящие 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 gAAV. В некоторых вариантах 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 типа или мутантным аденовирусом (таким как термочувствительный аденовирус), вирусом герпеса (HSV), бакуловирусом или плазмидной конструкцией, обеспечивающей функциональные элементы помощника. В некоторых вариантах осуществления продукты 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 gAAV, при условии, что продукты гена гер могут обеспечивать возможность репликации и упаковки генома gAAV. Для получения векторов на основе gAAV можно применять подходящие среды, известные из уровня техники. Эти среды включают без ограничения среды, производимые Hyclone Laboratories и JRH, в том числе

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 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 аденовирусом или HSV. В некоторых вариантах осуществления функциональные элементы помощника AAV представлены бакуловиром, 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 аденовирусной плазмидой-помощником, можно ввести путем трансфекции (например, с использованием способа с фосфатом кальция) в линию клеток (например, клеток НЕК-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 сар AAV, и нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы вируса-помощника AAV, при этом трансфекция 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 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 для получения гAAV, который можно затем размножать в производственном биореакторе и инфицировать вирусом-помощником (например, аденовирусом или HSV), чтобы инициировать продукцию гAAV. Затем вирус можно собрать, аденовирус можно инактивировать (например, действием тепла) и/или удалить, а частицы гAAV можно очистить. В связи с этим, в некоторых вариантах осуществления частица гAAV была получена с помощью линии клеток-продуцентов, содержащих одну или несколько из нуклеиновой кислоты, кодирующей вектор на основе гAAV, нуклеиновой кислоты, кодирующей гер и сар 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 увеличенным в размере геномом по сравнению со способом тройной трансфекции.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая гены гер и сар AAV, и/или геном гAAV стабильно поддерживаются в линии клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую гены гер и сар 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, сар AAV и геном гAAV вводят в клетку в той же плазмиде. В других вариантах осуществления гер AAV, сар 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, плазида (-ы) может(могут) реплицироваться при делении клетки, или плазида(-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 плазида(-ы) может(могут) содержать селективируемый маркер (например, маркер резистентности к антибиотику), который позволяет отбирать клетки, поддерживающие плазмиду. Селективируемые
- 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, микроинъекцию, 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 сар AAV, и/или геном гAAV стабильно интегрированы в геном линии клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую гены гер и сар 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, сар AAV и геном гAAV вводят в клетку в той же
- 25 плазмиде. В других вариантах осуществления гер AAV, сар AAV и геном гAAV вводят в клетку в разных плазмидах. В некоторых вариантах осуществления плазида(-ы) может(могут) содержать селективируемый 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 селективируемого маркера) можно использовать для отбора клеток, которые интегрировали нуклеиновую кислоту, содержащую селективируемый маркер (а также гены сар 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 сар 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 суспензии. Как известно из уровня техники, субстратзависимые клетки, как правило, не способны расти в суспензии без субстрата, такого как гранулы-микроносители. Адаптация линии клеток к росту в суспензии может включать, например, 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 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.

В некоторых аспектах предусмотрен способ получения любой частицы гAAV, раскрываемой в данном документе, предусматривающий: (а) культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых получают частицы гAAV, 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 репликации и/или заключении в капсид; (ii) провектор на основе гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе, фланкированный по меньшей мере одним ITR AAV, и (iii) функциональный элемент помощника AAV; и (b) извлечение частиц гAAV, получаемых в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления указанный по меньшей мере один ITR AAV выбран из группы, состоящей из ITR серотипов 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 и т. п. Например, в некоторых вариантах осуществления серотип AAV представляет собой AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10 или AAVrh10. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая 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, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, капсида AAV козы, химерного AAV1/AAV2, AAV крупного рогатого скота или AAV мыши, гAAV2/HBoV1 или их мутантов. В некоторых вариантах осуществления белок, участвующий в заключении в капсид, представляет собой белок капсида AAV8. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид AAV8 и рекомбинантный геном, содержащий ITR AAV2 и нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический трансген/нуклеиновую кислоту (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую GNPTAB).

Подходящие культуральные среды для получения гAAV 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 гAAV 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, зависящие от прикрепления, которые можно культивировать в подходящих сосудах для культур, 10 зависящих от прикрепления, как например, в роллерных флаконах, на фильтрах из полых волокон, на микроносителях и в биореакторах со слоем носителя или псевдооживленным слоем. Культуры для получения векторов на основе гAAV также могут включать клетки-хозяева, приспособленные к суспензионному росту, такие как клетки HeLa, 293 и SF-9, которые можно культивировать разнообразными способами, 15 в том числе, например, во флаконах 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 контаминанты, в том числе контаминанты из культуры для продуцирования или контаминанты 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 DHC, модульный фильтр Millipore Millistak+ HC марки A1HC и 0,2 мкм фильтр Opticarb XL10 с гидрофильной 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, катионообменной 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.

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 мышинной 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, тугоухость 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

10 результатом более слабых мутаций с потерей функции в GNPTAB и, таким образом, 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 детства. 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 ЕС 3.2.1.52), бета-D-глюкуронидазу (код ЕС 3.2.1.31), бета-D-галактозидазу (код ЕС 3.2.1.23), альфа-L-фукозидазу (код ЕС 3.2.1.51) и альфа-D-маннозидазу (код ЕС 3.2.1.24). Для сравнения, эти активности в культивируемых фибробластах могут быть недостаточными. В некоторых вариантах осуществления

30 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 MLII. В некоторых вариантах осуществления у пациента, образец которого

35 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 путем секвенирования локуса GNPTAB (например, кодирующей последовательности,

40 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, Poenaru, 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 лечение MLII и/или MLIII может привести к увеличению прибавки роста, содержания минеральных веществ 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 gAAV можно контролировать по нескольким критериям, описанным в данном документе. Например, после лечения субъекта с применением способов по настоящему изобретению у субъекта можно 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.

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, полуколичественную ПЦР, вестерн-блоттинг, масс-спектрометрию, ELISA и т. д.

В некоторых вариантах осуществления активность одного или нескольких лизосомальных ферментов, в том числе без ограничения бета-D-гексозаминидазы (код ЕС 3.2.1.52), бета-D-глюкуронидазы (код ЕС 3.2.1.31), бета-D-галактозидазы (код ЕС 3.2.1.23), альфа-L-фукозидазы (код ЕС 3.2.1.51) и альфа-D-маннозидазы (код ЕС 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.

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 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 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).

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 мышинной

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).
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.

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, внутрикостный, внутриартериальный, интрацеребральный, внутримышечный, интратекальный, подкожный, интрацеребровентрикулярный, внутripеченочный 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.

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 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 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 введения, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления для лечения человека можно применять несколько векторов.

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 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 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 вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 80%, в некоторых вариантах 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 осуществления несколько 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 введения в педиатрии. 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 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, 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 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

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 система содержит один шприц. В некоторых вариантах осуществления система содержит два шприца. В некоторых вариантах осуществления система содержит три шприца. В некоторых вариантах осуществления система содержит четыре или более шприцев. 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 рН. 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 осуществления набор дополнительно обеспечивает циклоспорин, микофенолата мофетил и/или метилпреднизолон.

Частицы и/или композиции гAAV по настоящему изобретению можно дополнительно упаковать в наборы, включающие инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат устройство для доставки (например, любой тип парентерального введения, описанного в данном документе) композиций частиц гAAV. 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 осуществления инструкции по применению включают инструкции для введения млекопитающему (например, человеку) эффективного количества частиц гAAV, 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.

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 (например, было удалено от экзона 12 до экзона 20) можно осуществлять путем гомологичной рекомбинации с заменяющим вектором, содержащим репортерный или селективируемый 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 (+/+), 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 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 селективируемый маркер. В некоторых вариантах осуществления селективируемый маркер придает резистентность к неомицину. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой млекопитающее (например, грызуна, кролика, кошку, собаку, свинью, обезьяну). В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой грызуна (например, мышшь, крысу, хомяка, морскую свинку). В некоторых вариантах осуществления животное является иммунокомпетентным или иммунодефицитным. В некоторых вариантах осуществления животная модель предусматривает генетически модифицированное животное. Другие мышинные модели ML II представлены в Gelfman et al., (Invest. Ophtham. 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 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 осуществления средство 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 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.

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 нарушение накопления, вызванное дефицитом N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы (GNPTAB). Признаками данного заболевания являются наличие многочисленных тел включения в цитоплазме фибробластов, отсутствие мукополисахаридурии, увеличение активности лизосомальных ферментов в сыворотке и снижение активности GlcNAc-фосфотрансферазы. Для изучения патологии ML типа II разработали и охарактеризовали нокаутную (KO) по GNPTAB мышь.

Способы

Создание конструкций AAV2/8-GNPTAB

Кодирующую последовательность GNPTAB мыши амплифицировали и кодон-оптимизировали для экспрессии у мышей с помощью Genescript (Пискавказ, Нью-Джерси, США). Из-за большого размера кДНК GNPTAB и ограниченной емкости AAV кДНК не помещается ни в какие доступные векторы. Поэтому разработали новую кассету экспрессии, которая содержала укороченные версии энхансера CMV и промотора бета-актина курицы, а также очень маленький интрон. 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 частиц/мл. Для этих исследований применяли укороченные последовательности энхансера и промотора.

Животные

Мутантных по GNPTAB мышей получали путем микроинъекции клонов 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 (-/-).

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).

Инъекции вектора

Одну билатеральную *i.v.* инъекцию PBS или AAV-GNPTAB осуществляли 6-недельным мышам GNPTAB KO. 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.

Ауксология

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

Гистология

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 M 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 ТЕМ или гематоксилина и эозина (H&E).

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 812. Полутонкие серийные срезы нарезали при 2,5 мкм (Leica ultracut UCT), окрашивали толудиновым синим и наблюдали в световой микроскоп. Наблюдение с помощью трансмиссионной электронной микроскопии осуществляли с использованием микроскопа Mirgagni (FEI).

Анализ лизосомальных ферментов

Кровь отбирали, и образцы центрифугировали 15 мин. (8000 × 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.

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 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.

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.

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 подтверждали с помощью анализа Саузерн-блот.

Обширный фенотипический анализ осуществляли на животных дикого типа, гетерозиготных и гомозиготных животных. Мышей КО можно было визуально отличить от однопометников дикого типа (WT) по их небольшому размеру. Средний вес тела (ФИГ. 2А) и длина (ФИГ. 2В) у мышей КО были значительно снижены. В соответствии 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 КО хондроциты бедренной кости заметно гипертрофированы и полностью заполняют свои увеличенные лакуны (ФИГ. 3В). Цитоплазма гипертрофированного хондроцита растянута множеством микровакуолей, содержащих ограниченное количество мелкозернистого амфохромофильного материала. Было меньше связанного с фиксацией сжатия хондроцитов, которые заполняли увеличенные лакуны. Это контрастирует с 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 КО при исследовании методом световой микроскопии (Gelfman et al., 2007, Invest. Optham. Visual Sci. 48:5221-5228). Чтобы получить представление о лежащей в основе патологии, подчелюстную слюнную железу проанализировали с помощью электронной микроскопии (ЕМ).

Секреторные клетки как слизистого, так и серозного типа легко обнаруживались у мышей дикого типа (ФИГ. 4А-С). В отличие от этого, общая структура подчелюстной слюнной железы мышей КО была так сильно нарушена, что это сильно затрудняло идентификацию серозных клеток на срезах ЕМ (ФИГ. 4D-F). Секреторные клетки слизистого типа были заполнены крупными мембраносвязанными 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 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. 5A-5D показано, что по сравнению с мышами дикого типа мыши КО демонстрировали существенно повышенные уровни лизосомальных ферментов, таких как N-ацетилглюкозаминидаза (ФИГ. 5A), β -гексозаминидаза A (ФИГ. 5B), β -галактозидаза (ФИГ. 5C) и β -глюкуронидаза (ФИГ. 5D). 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 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.

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 инъецировали AAV-GNPTAB.

Как показано на ФИГ. 6A и 6B, 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 CBA и сигналом поли(A) BGH (ФИГ. 7A). Полноразмерный GNPTAB находился под управлением укороченного энхансера CMV/промотора CBA, как описано в данном документе. Количественный анализ ПЦР в реальном времени печени из мышей GNPTAB КО, которым инъецировали AAV2/8-GNPTAB, показал специфическую и высокую экспрессию AAV-GNPTAB. Как и ожидалось, в образцах контрольных однопометников какая-либо mRNA AAV-GNPTAB отсутствовала (ФИГ. 7B).

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

Затем оценивали эффективность ослабления фенотипа карликовости у мышей КО. Улучшение в отношении карликовости отмечали через 6 недель терапии у мышей КО, которым инъецировали AAV-GNPTAB, демонстрирующих увеличение размера тела (ФИГ. 9A, 9B 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
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
GNPTAB-нокаут (-/-)	76,09±2,483	1,04±0,012	1,09±0,015
GNPTAB-нокаут (-/-)+AAV-GNPTAB	75,10±1,964	1,07±0,009	1,11±0,017

Изображенные значения представляют собой среднее значение \pm 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
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
GNPTAB-нокаут (-/-)	0,050±0,002	1,156±0,011	1,157±0,012
GNPTAB-нокаут (-/-)+AAV-GNPTAB	0,048±0,001	1,219±0,013	1,236±0,044

Изображенные значения представляют собой среднее значение \pm 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 BMC (г/см ²)	BMC через 16 недель	BMC через 32 недели
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-нокаут (-/-)	0,448±0,027	1,272±0,044	1,228±0,049
GNPTAB-нокаут (-/-)+AAV-GNPTAB	0,386±0,016	1,560±0,080	1,551±0,096

Изображенные значения представляют собой среднее значение \pm 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.

Таблица 4. Изменение процента массы нежировых тканей

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

Изображенные значения представляют собой среднее значение \pm SEM.

Таким образом, мышцы 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 C-концу, если не указано иное.

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)

MLFKLLQRQTYTCLSHRYGLYVCFLGVVTVIVSAFQFGEVVLEWSRDQYHVLFDSDYRDNIAGKSFQNRCLC
 LPMPIDVVYTWVNGTDLELLKELQQVREQMEEQKAMREILGKNTTEPTKKSEKQLECLLTHCIKVPMLV
 LDPALPANITLKDLPISLPSFHSASDIFNVAKPKNPSTNVSVVVFSDTKDVEDAHSGLLKGNRQTVWRG
 YLTIDKEVPGVLVMDLAFSLGFPPTFKETNQLKTKLPENLSSKVKLLQLYSEASVALLKLNPNKDFQEL
 NKQTKKNMTIDGKELTISPAYLLWDLAISQSKQDEDISASRFEDNEELRYSLSIERHAPWVRNIFIVT
 NGQIPSWNLNLDNPRVTIVTHQDVFRLNLSHLPTFSSPAIESHIEGLSQKFYIYLNDDVMFGKDVWDDF
 YSHSKGQKVYLTPVPNCAEGCPGSGWIKDGYCDKACNNSACDWDGGDCSGNSGGSRYIAGGGGTGSGIGVG
 QPWQFGGGINSVSYCNQGCANSWLADKFCQACNVLSGFDAGDCGQDHFHELYKVILLPNQTHYIIPKG
 ECLPYFSFAEVAKRGVEGAYSDNPIIRHASIANKWKTIHLIMHSGMNATTIHFNLTFQNTNDEEFKMQIT
 VEVDTRREGPKLNSTAQKGYENLVSPITLLPEAEILFEDIPKEKRFKPKRHDVNSTRRAQEEVKIPLVNI
 SLLPKDAQLSLNTLDLQLEHGDITLKGYNLSKSALLRSFLMNSQHAKIKNQAIITDETNDSLVAPQEKQV
 HKSILPNSLGVSERLQRLTFPAVSVKVNHDGQGNPPLDLETTARFRVETHQTIGGNVTKEKPPSLIV
 PLESQMTKEKKITGKEKENSMEENAENHIGVTEVLLGRKLQHYTDSYLGFLPWEKKKYFQDLLDEEESL
 KTQLAYFTDSKNTGRQLKDTFADSLRYVNKILNSKFGFTSRKVPAMPHMIDRIVMQELQDMFPPEEFDKT
 SFHKVRHSEDMQFAFSYFYLLMSAVQPLNISQVFDEVDTDQSGVLSIREIRTLATRIHELPLSLQDLTGL
 EHMLINCSKMLPADITQLNNIPPTQESYYDPNLPVTKSLVTNCKPVTDKIHKAYKDKNKYRFEIMGEEE
 IAFKMIRTNVSHVVGQLDDIRKNPRKFVCLNDNIDHNHDKDAQTVKAVLRDFYESMFPFPSQFELPREYRN
 RFLHMHELQEWRAIRDKLKFWTHCVLATLIMFTIFSFFAEQLIALKRKIFPRRRIHKEASPNRIRV

Последовательность белка GNPTAB мыши (SEQ ID NO:2)

MLLKLLQRQTYTCLSHRYGLYVCFVGVVVTIVSAFQFGEVVLEWSRDQYHVLFDSDYRDNIAGKSFQNRRLC
 LPMPIDVVYTWVNGTDLELLKELQQVREHMEEEQRAMRETLGKNTTEPTKKSEKQLECLLTHCIKVPMLV
 LDPPLPANCTLKDLPTLYPSFHAASDMFNVAKPNPSTNVSVVVFDTTKDVEDAHAGPFKGGSKQMVWRA
 YLTIDKEAPGLVLMQGLAFLSGFPPTFKETSQLKTKLPEKLSSKIKLLRLYSEASVALLKLNPKGFQEL
 NKQTKKNMTIDGKELTISPAYLLWDLAISQSKQDEDVSASRFEDNEELRYSLSIERHAPWVRNIFIVT
 5 NGQIPSWLNLNPRVTIVTHQDIFQNLSHLPTFSSPAIESHIHRIEGLSQKFIYLNDDVMFGKDVWPDDE
 YSHSKGQKVYLTPVPNCAEGCPGSGWIKDGYCDKACNNSACDWDGGDCSGNTAGNRFVAGGGGTGNIGAG
 QHWQFGGGINTISYCNQGCANSWLADKFCQACNVLSGCFDAGDCGQDHFHELYKVTLLPNQTHYVVPKG
 EYLSYFSFANIARRGVEGTYSNPIIRHASIANKWKT IHLIMHSGMNATTIYFNLTQANANDEEFKIQIA
 VEVDTREAPKLNSTTQKAYESLVSPVTPLPQADVPFEDVPKEKRFPKIRRHVDNATGRFQEEVKIPRVNI
 SLLPKAEQVRLSNLDLQLERGDITLKGYNLSKSALLRSFLGNSLDTKIKPQARTDETKGNLEVPQENPSH
 10 RRPHGFAHEHRSERWTAPAETVTVKGRDHANLPPPVLETNARLAQPTLGVTVSKENLSPLIVPPESHLPK
 EEEEDRAEGNAVVPKELVPGRRLQQNYPGFLPWEKKKYFQDLLDEEESLKTQLAYFTDSKHTGRQLKDTF
 ADSLRYVNKILNSKFGFTSRKVPAMPHMIDRIVMQELQDMFPEEFDKTSFHKVRHSEDMQFAFSYFYLL
 MSAVQPLNISQVFHEVDTDQSGVLSGREIRTLATRIHDLPLSLQDLTGLEHMLINCSKMLPANITQLNNI
 PPTQEAYYDPNLPVTKSLVTNCKPVTDKIHKAYKDKNKYRFEIMGEEIIAFKMIRTNVSHVVGQLDDIR
 KNPRKFVCLNDNIDHNHDKDARTVKAVLRDFYESMFPIPSQFELPREYRNRFHLMHLEQEWRAIRDKLKFW
 THCVLATLIIFTIFSFFAEQIIALKRKIFPRRIHKEASPDRIIV

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENZYME CORPORATION

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

<130> 159792012640

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/267,502

<151> 2015-12-15

<160> 2

<170> FastSEQ для Windows версии 4.0

<210> 1

<211> 1256

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<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

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

40 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 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	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 2 742 612 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	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					800
	Leu	Asn	Pro	Pro	Pro	Val	Leu	Glu	Thr	Asn	Ala	Arg	Leu	Ala	Gln	Pro
					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	Lys	Tyr	Phe	Gln
15	865					870					875					880
	Asp	Leu	Leu	Asp	Glu	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Thr	Gln	Leu	Ala	Tyr	Phe
				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					960
	Phe	His	Lys	Val	Arg	His	Ser	Glu	Asp	Met	Gln	Phe	Ala	Phe	Ser	Tyr
				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					1040
	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Gln	Leu	Asn	Asn	Ile	Pro	Pro	Thr	Gln	Glu	Ala
				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					1120
	Lys	Asn	Pro	Arg	Lys	Phe	Val	Cys	Leu	Asn	Asp	Asn	Ile	Asp	His	Asn
				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
	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		

15 (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
20 инвертированный концевой повтор (ITR) AAV, причем вектор содержит составной
промотор на основе энхансера CMV/промотора бета-актина курицы (CBA), причем:

- (i) промотор CBA представляет собой модифицированный промотор CBA,
необязательно усеченный промотор CBA, и/или
- (ii) энхансер CMV представляет собой укороченный энхансер CMV;
- 25 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
30 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
мышь.

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

- (a) интрон, необязательно интрон 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:

- 45 (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 мышь 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 gAAV, при этом частица gAAV необязательно содержит капсид AAV8 и ITR AAV2.

4. Частица gAAV по п. 3, где частица gAAV получена с помощью трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей вектор на основе gAAV, и нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементы гер и сар AAV, и обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы помощника AAV, где
10 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
15 необязательно представляет собой аденовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус.

5. Частица gAAV по п. 3, где частица gAAV получена с помощью клетки-продуцента AAV, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вектор на основе gAAV, и нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональные элементы гер и сар AAV, и обеспечения нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональные элементы помощника AAV, где
20 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 собой
25 аденовирус, 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 gAAV по любому из пп. 3-5.

7. Способ лечения муколипидоза типа II (ML II) или муколипидоза типа III (ML III) у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества частицы gAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтической композиции по п.6, где
30 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, задержки в развитии общей и мелкой моторики, тугоухость, отсутствие мышечного
35 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, содержания минеральных веществ в костной ткани или минеральной плотности костной
40 ткани у млекопитающего с муколипидозом типа II (ML II) или муколипидозом типа III (ML III), включающий введение млекопитающему эффективного количества частиц gAAV, где частицы gAAV содержат вектор на основе gAAV, где вектор на основе gAAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюкозамин-1-
45 фосфаттрансферазу (GNPTAB), и по меньшей мере один ITR AAV, 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:

- (a) GNPTAB функционально связан с промотором;
- (b) GNPTAB представляет собой GNPTAB человека;
- (c) GNPTAB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1;
- (d) GNPTAB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1; и/или
- (e) 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.

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

- (a) составной промотор на основе энхансера CMV/промотора бета-актина курицы (CBA), где необязательно:
 - (i) промотор CBA представляет собой модифицированный промотор CBA, необязательно усеченный промотор CBA, и/или
 - (ii) энхансер CMV представляет собой укороченный энхансер CMV;
- (b) интрон, необязательно интрон MVM;
- (c) последовательность полиаденилирования, необязательно последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста; и/или
- (d) два ITR.

12. Способ по любому из пп. 7-11, где частица AAV содержит капсид, при этом частица гAAV 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 гAAV2/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 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 клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей вектор на основе гAAV, и нуклеиновой кислотой, кодирующей функциональные элементы гер и сар 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 аденовирус, 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 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 собой аденовирус, вирус простого герпеса или бакуловирус.

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

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

- (a) частицу rAAV вводят внутривенно, внутрибрюшинно, внутриартериально, внутримышечно, подкожно или внутripеченочно;
- (b) частицу rAAV вводят в более чем одно местоположение;
- (c) введение повторяют; и/или
- (d) вирусные частицы rAAV находятся в фармацевтической композиции.

17. 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.

18. Применение частицы rAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтической композиции по п. 6 для лечения ML II или ML III у млекопитающего, необязательно человека, необязательно с помощью способа по любому из пп. 7-16.

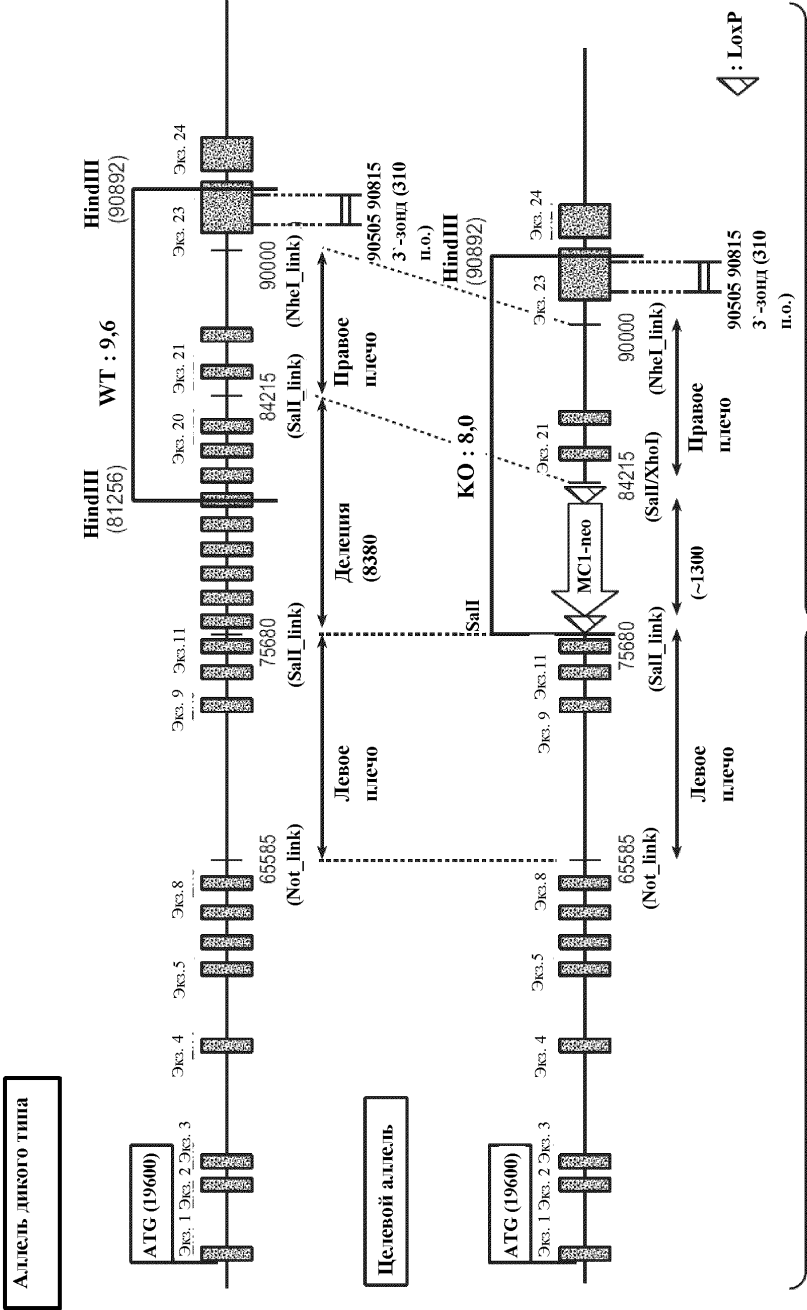
19. Применение частицы rAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтической композиции по п. 6 в получении лекарственного средства для уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов ML II или ML III у млекопитающего, необязательно человека, или замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов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

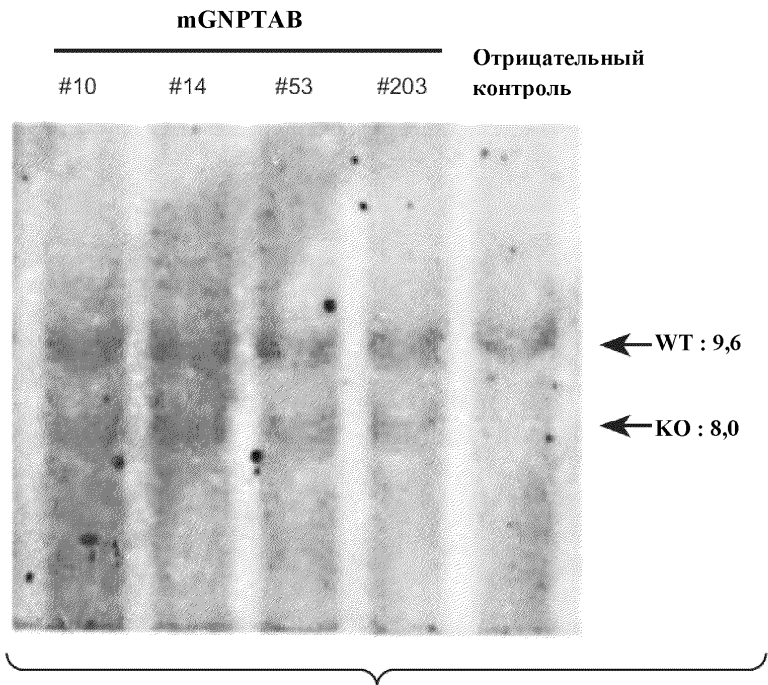
21. Набор для лечения ML II или ML III у млекопитающего, содержащий вектор на основе гAAV по п. 1 или 2, частицу гAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтическую композицию по п. 6, необязательно дополнительно содержащий один или несколько буферов или фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ 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 пп. 7-16, где набор содержит вектор на основе гAAV по п. 1 или 2, частицу гAAV по любому из пп. 3-5 или фармацевтическую композицию по п. 6.



ФИГ. 1А

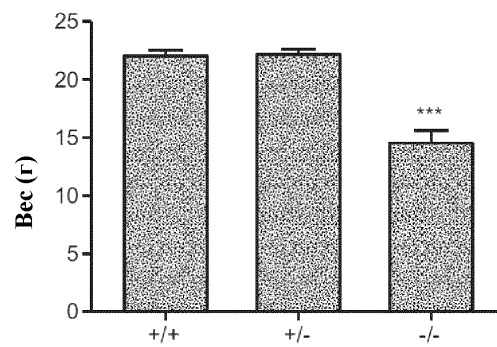
2/13



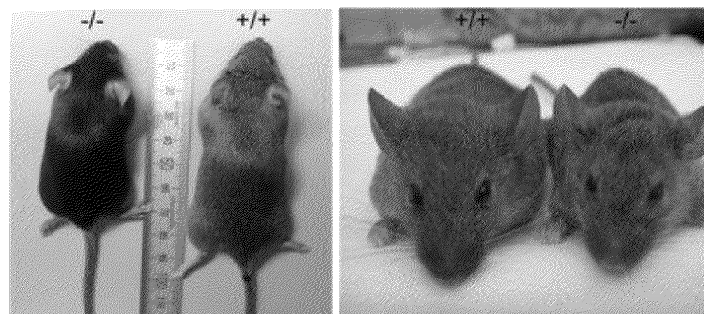
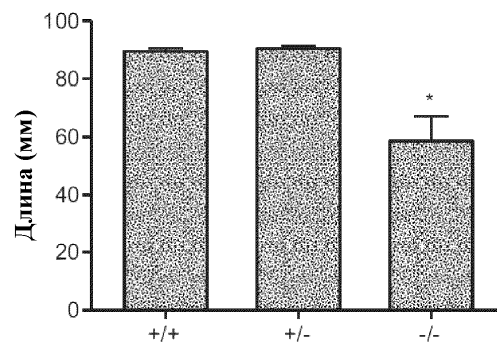
ФИГ. 1В

3/13

ФИГ. 2А

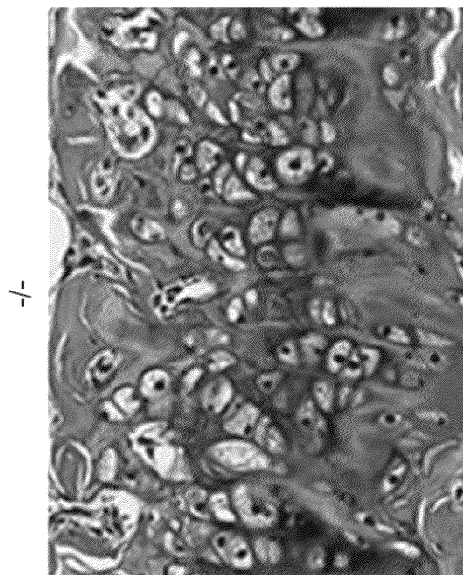


ФИГ. 2В



ФИГ. 2С

4/13

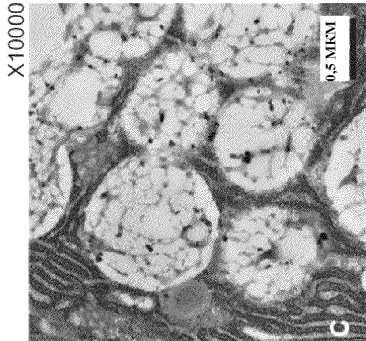


ФИГ. 3В



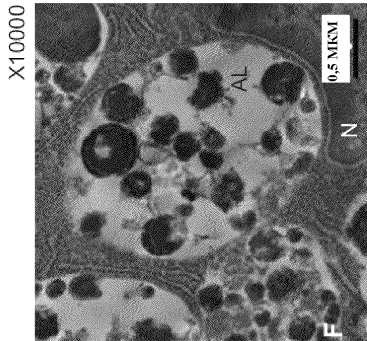
ФИГ. 3А

ФИГ. 4С



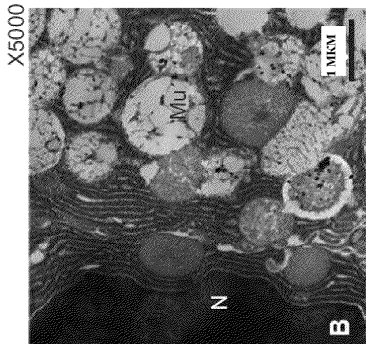
WT

ФИГ. 4F



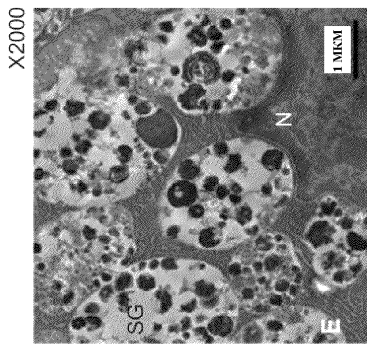
GNTPAВ -/-

ФИГ. 4В



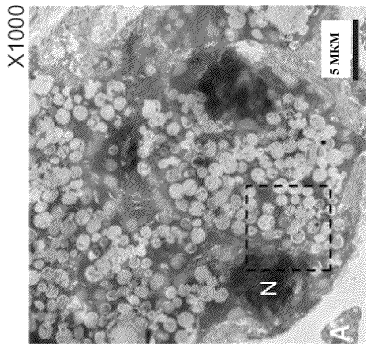
WT

ФИГ. 4Е



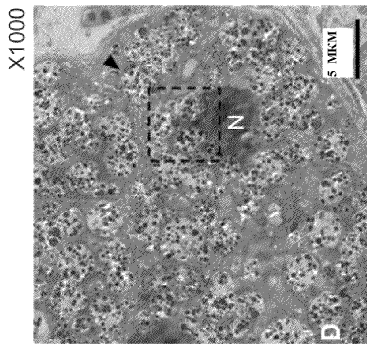
GNTPAВ -/-

ФИГ. 4А



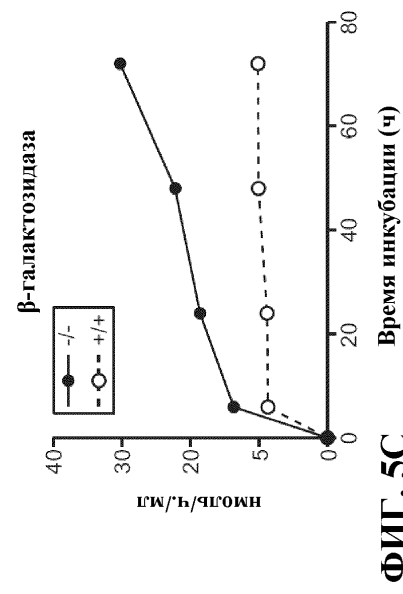
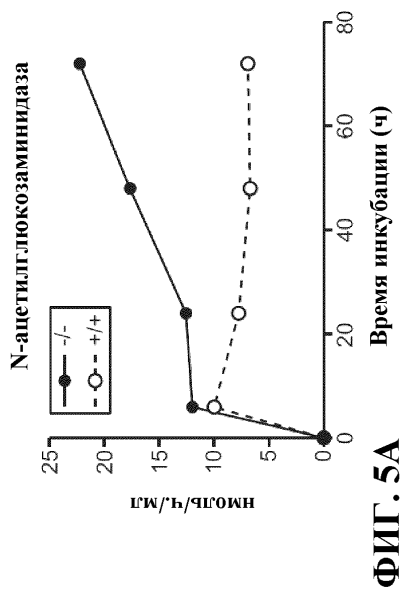
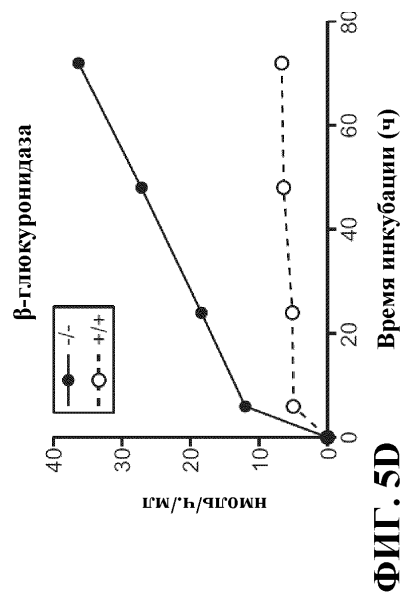
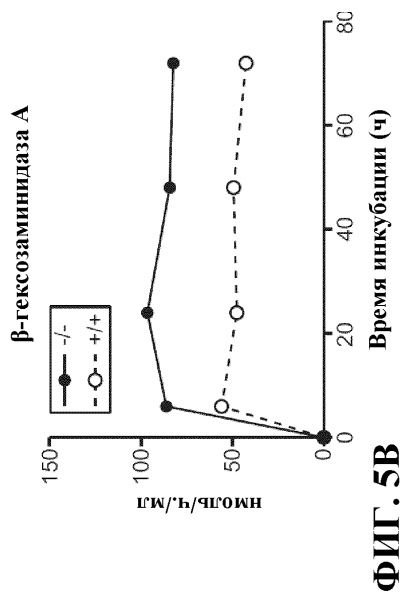
WT

ФИГ. 4D

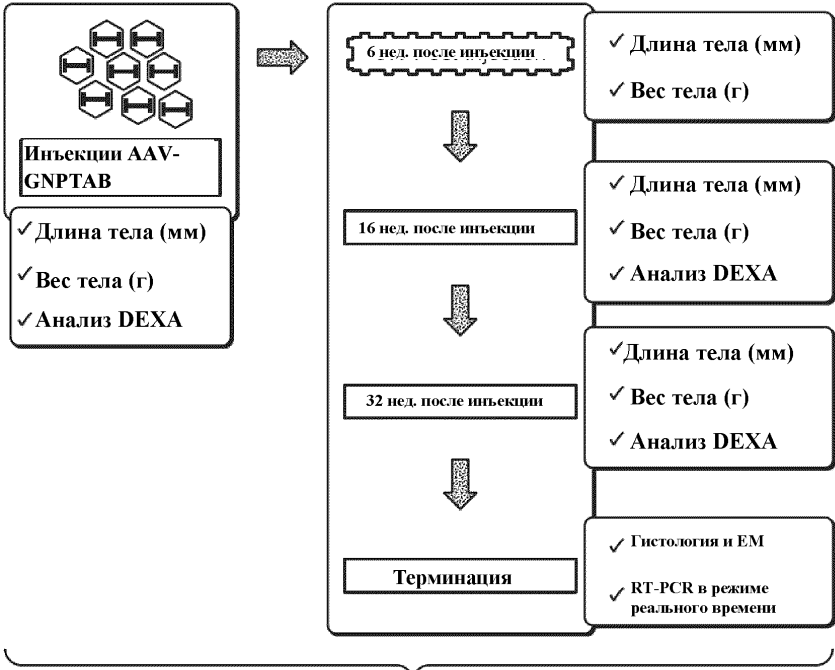


GNTPAВ -/-

6/13



7/13

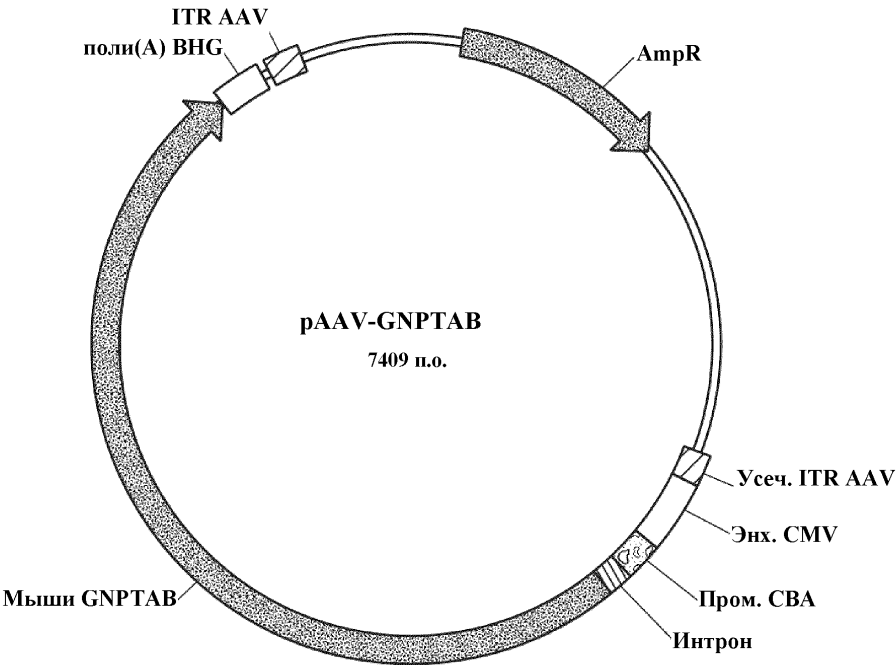


ФИГ. 6А

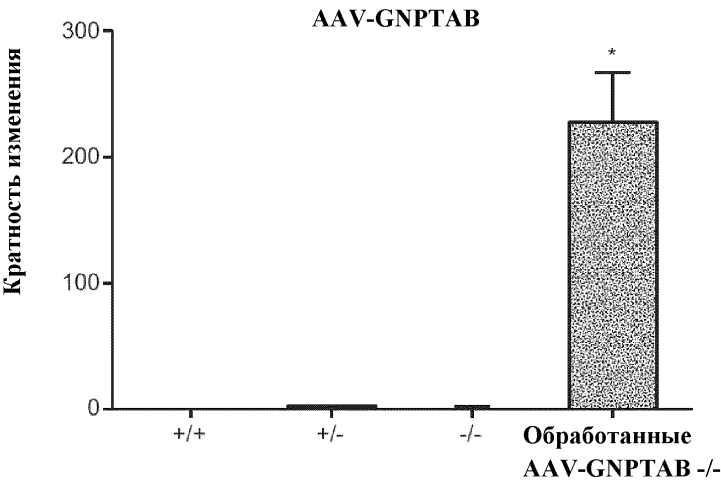
Животные	Обработка	Возраст при
Дикий тип (n=5)	PBS (плацебо)	Все мыши в 38 недель (долгосрочное лечение)
Тип гетеро (n=5)	PBS (плацебо)	
Тип КО (n=5)	PBS (плацебо)	
Тип КО (n=4)	3E11 капль. AAV-GNPTAB	

ФИГ. 6В

8/13



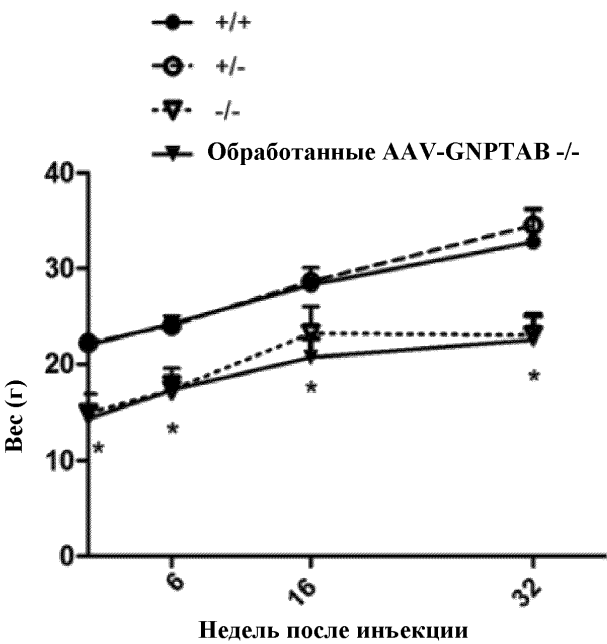
ФИГ. 7А



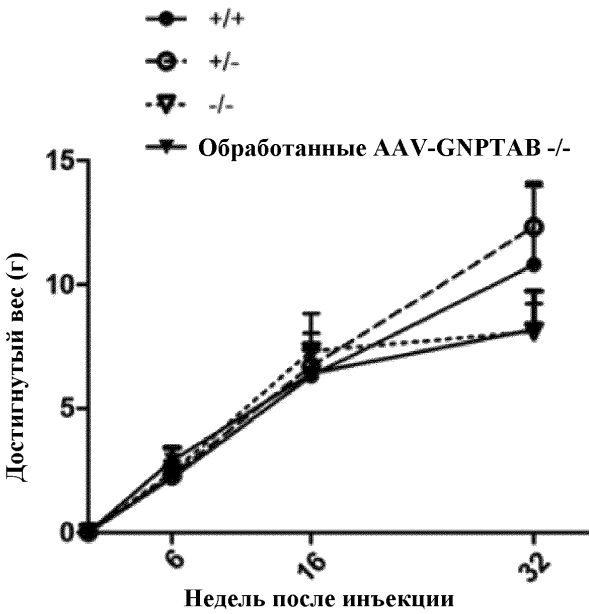
ФИГ. 7В

9/13

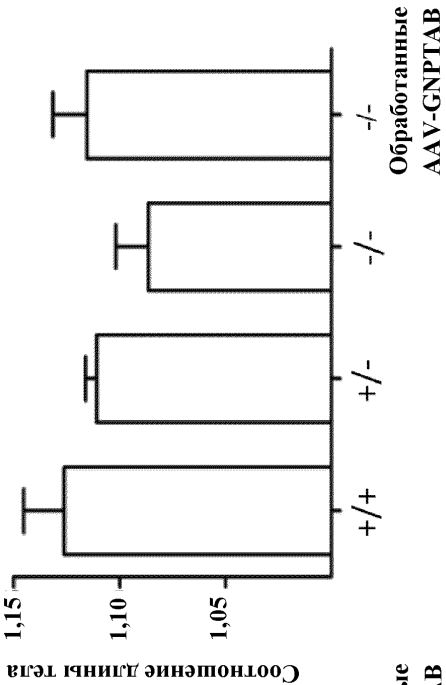
ФИГ. 8А



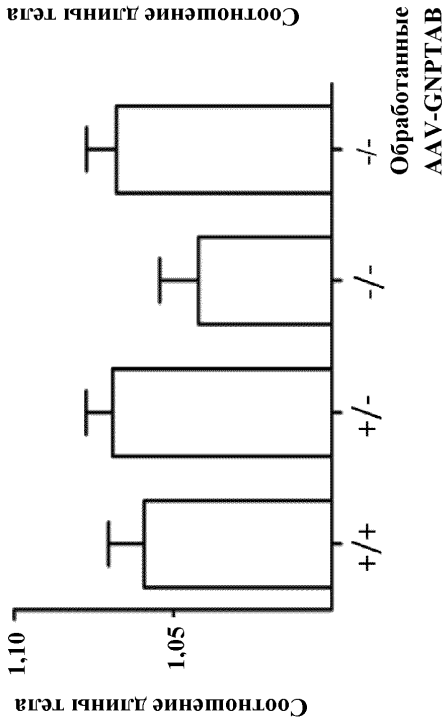
ФИГ. 8В



10/13

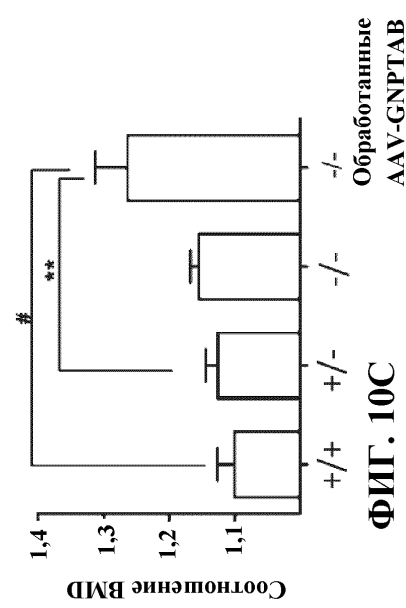
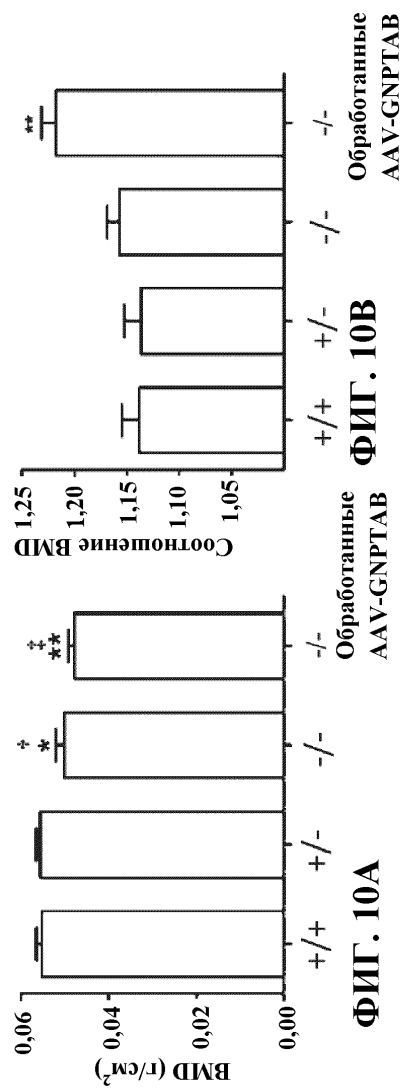


ФИГ. 9В

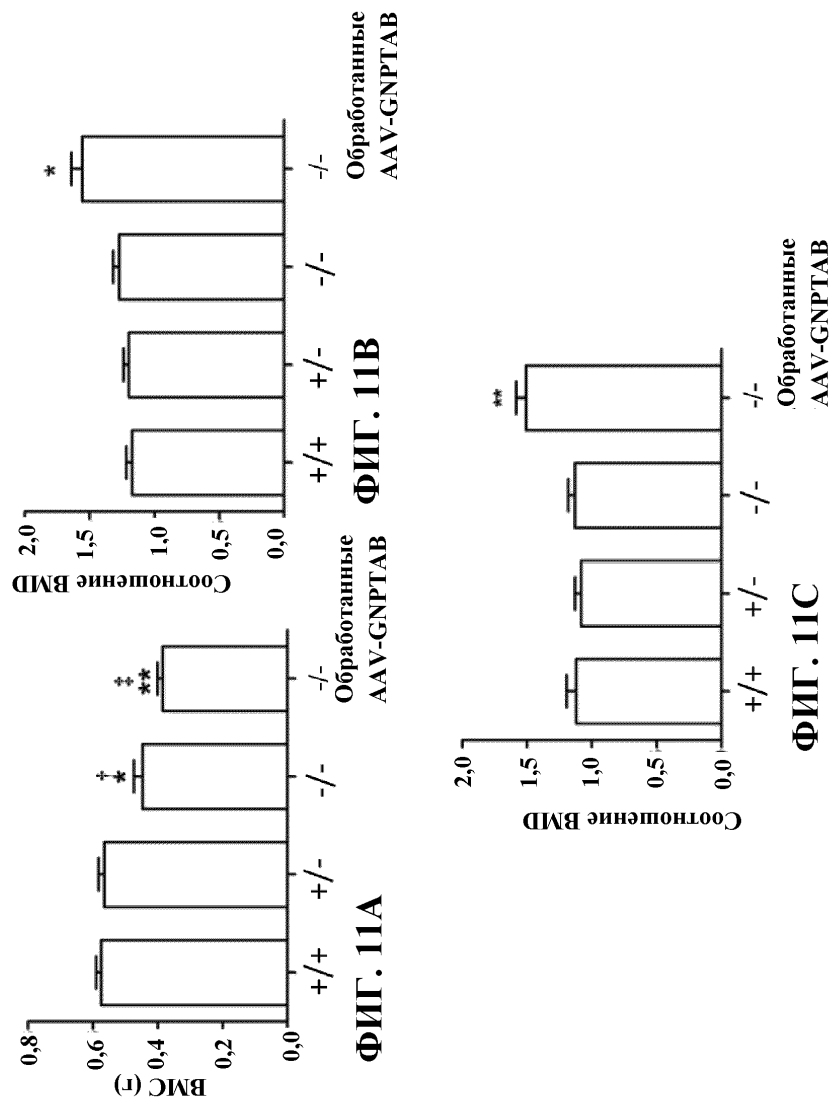


ФИГ. 9А

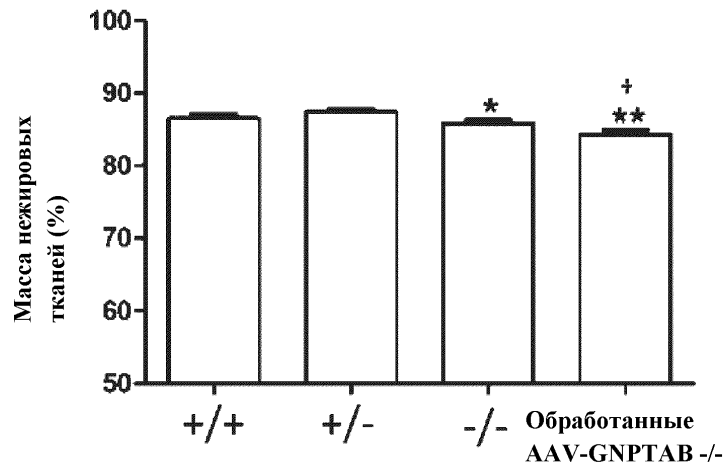
11/13



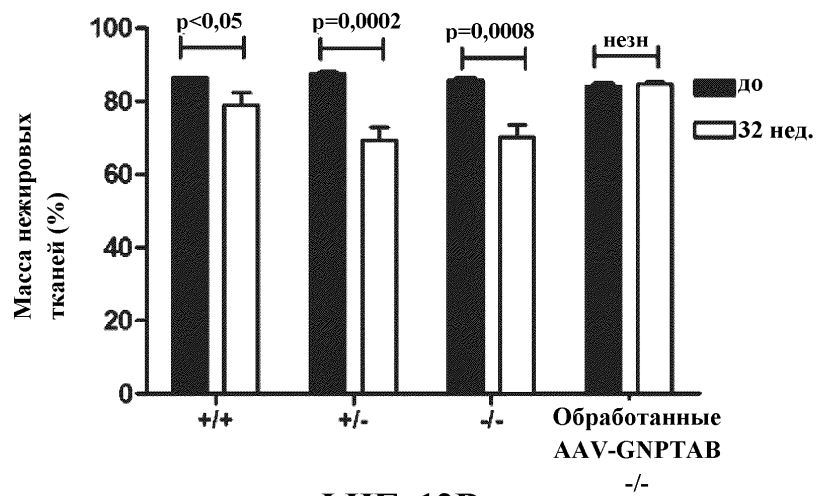
12/13



13/13



ФИГ. 12А



ФИГ. 12В