



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.11.05

(21) Номер заявки

201690842

(22) Дата подачи заявки

2014.10.24

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)

(54) ПСЕВДОТИПИРОВАННЫЙ ВЕКТОР НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА AAV-5 ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 13190141.5

(32) 2013.10.24

(33) EP

(43) 2016.10.31

(86) PCT/NL2014/050737

(87) WO 2015/060722 2015.04.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЮНИКБЮРЕ АйПи Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Блитс Бас (NL)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) A.S. REDDY ET AL.: "Bone Marrow Transplantation Augments the Effect of Brain- and Spinal Cord-Directed Adeno-Associated Virus 2/5 Gene Therapy by Altering Inflammation in the Murine Model of Globoid-Cell Leukodystrophy", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 31, no. 27, 6 July 2011 (2011-07-06), pages 9945-9957, XP055099621, ISSN: 0270-6474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1802-11.2011, page 3, paragraph 2d

LIN ET AL.: "AAV2/5 vector expressing galactocerebrosidase ameliorates CNS disease in the murine model of globoid-cell leukodystrophy more efficiently than AAV2", MOLECULAR THERAPY, SEPTEMBER 2005, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 12, no. 3, 29 June 2005 (2005-06-29), pages 422-430, XP005472376, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/J.YMTHE.2005.04.019, the whole document

LUCY VULCHANOVA ET AL.: "Differential adeno-associated virus mediated gene transfer to sensory neurons following intrathecal delivery by direct lumbar puncture", MOLECULAR PAIN, vol. 6, no. 1, 28 May 2010 (2010-05-28), pages 31-39, XP055099564, ISSN: 1744-8069, DOI: 10.1186/1744-8069-6-31, cited in the application, the whole document

G. WATSON ET AL.: "Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPS I mice", GENE THERAPY, JUNE 2006, vol. 13, no. 11, 16 February 2006 (2006-02-16), pages 917-925, XP055074794, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/sj.gt.3302735, the whole document

STEVEN JAMES GRAY: "Gene therapy and neurodevelopmental disorders", NEUROPHARMACOLOGY, JUNE 2006, vol. 68, 27 June 2012 (2012-06-27), pages 136-142, XP055099736, ISSN: 0028-3908, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.024, the whole document

TENENBAUM L. ET AL.: "Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system", JOURNAL OF GENE MEDICINE, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 6, Suppl 1, 10 February 2004 (2004-02-10), pages S212-S222, XP002715192, ISSN: 1099-498X, DOI: 10.1002/JGM.506, the whole document

S.J. GRAY ET AL.: "Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates", GENE THERAPY, vol. 20AAV9//AAV2/5 cisterna magna ou lumber sister, no. 4, 10 January 2013 (2013-01-10), pages 450-459, XP055099533, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2012.101, the whole document

US-A1-2004258671

MATTHEW R.J. MASON ET AL.: "Comparison of AAV Serotypes for Gene Delivery to Dorsal Root Ganglion Neurons", MOLECULAR THERAPY, APRIL 2010, vol. 18, no. 4, 23 February 2010 (2010-02-23), pages 715-724, XP055099555, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2010.19, the whole document

B. STOREK ET AL.: "Sensory neuron targeting by self-complementary AAV8 via lumbar puncture for chronic pain", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 105, no. 3, 22 January 2008 (2008-01-22), pages 1055-1060, XP055099588, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0708003105, cited in the application, the whole document

BLITS B. ET AL.: "Adeno-associated viral vector (AAV)-mediated gene transfer in the red nucleus of the adult rat brain: Comparative analysis of the transduction properties of seven AAV serotypes and lentiviral vectors", JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 185, no. 2, 15 January 2010 (2010-01-15), pages 257-263, XP026819079, ISSN: 0165-0270 [retrieved on 2009-10-20] cited in the application, paragraph [02.1]

DARSHONG LIN ET AL.: "Central Nervous System-directed AAV2/5-Mediated Gene Therapy Synergizes with Bone Marrow Transplantation in the Murine Model of Globoid-cell Leukodystrophy", MOLECULAR THERAPY, vol. 15, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 44-52, XP055099624, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/sj.mt.6300026, the whole document

STOREK BENJAMIN ET AL.: "Intrathecal long-term gene expression by self-complementary adeno-associated virus type 1 suitable for chronic pain studies in rats", MOLECULAR PAIN, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 2, no. 1, 30 January 2006 (2006-01-30), page 4, XP021019474, ISSN: 1744-8069, DOI: 10.1186/1744-8069-2-4, the whole document

FEDERICI T. ET AL.: "Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in

pigs", GENE THERAPY, 2012 NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 19, 15 September 2011 (2011-09-15), pages 852-859, XP002711717, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/GT.2011.130 [retrieved on 2011-09-15] the whole document

US-A1-2013225666

ABDELWAHED CHARTO ET AL.: "A next step in adeno-associated virus-mediated gene therapy for neurological diseases: regulation and targeting", BRITISH JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY, JULY 2012, vol. 76, no. 2, 18 January 2013 (2013-01-18),

pages 217-232, XP055165696, ISSN: 0306-5251, DOI: 10.1111/bcp.12065, the whole document

DAR-SHONG LIN ET AL.: "CNS-targeted AAV5 gene transfer results in global dispersal of vector and prevention of morphological and function deterioration in CNS of globoid cell leukodystrophy mouse model", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 103, no. 4, 6 May 2011 (2011-05-06), pages 367-377, XP028249738, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2011.05.005 [retrieved on 2011-05-12] the whole document

-
- (57) Изобретение относится к способам лечения нарушений, затрагивающих двигательную функцию, как, например, двигательная функция, нарушенная вследствие болезни, травмы головного и/или спинного мозга с применением генотерапевтического вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащего капсидные белки аденоассоциированного вируса серотипа 5 (AAV5) и продукт гена, представляющий интерес, фланкированный инвертированными концевыми повторами ITR AAV. В частности, генотерапевтический вектор по изобретению вводится путем инъекции в цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) предпочтительно путем люмбальной инъекции и/или инъекции в мостомозжечковую цистерну cisterna magna.

036394 B1

036394 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области вирусологии и генной терапии. В частности, изобретение относится к способу лечения или профилактики неврологических заболеваний у млекопитающих, преимущественно у человека.

Уровень техники изобретения

Центральная нервная система (ЦНС) представляет собой сложную систему, включающую в себя головной и спинной мозг позвоночного. Периферическая нервная система является частью нервной системы за пределами головного и спинного мозга. Спинной мозг проводит сенсорные импульсы от периферической нервной системы в головной мозг и двигательные импульсы от головного мозга к различным эффекторам.

Генная терапия с применением вирусных векторов уже рассматривалась в отношении доставки терапевтических агентов для лечения различных расстройств, связанных с ЦНС. Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) обладают рядом преимуществ, включающих низкую токсичность и иммуногенность, а также длительную экспрессию трансгенов в ЦНС (Kaplitt et al. (1994) *Nat Genet* 8:148-154; Bartlett et al. (1998) *Hum Gene Ther* 9:1181-1186; Passini et al. (2002) *J Neurosci* 22:6437-6446). В связи с этим, AAV еще больше изучаются для генной терапии ЦНС.

Многие заболевания ЦНС, например боковой амиотрофический склероз (ALS, также известный как болезнь двигательных нейронов (MND)), поражает как корковые, так и спинальные двигательные нейроны, которые распределены по всей широкой области в ЦНС. Во многих случаях представляется, что вирусные векторы, введенные в ЦНС, трансдуцируют клетки поблизости от места введения, но не на широкую область, как это необходимо. Кроме того, инъекция в мозг является хирургической инвазивной операцией с соблюдением заботы о безопасности. Некоторые исследования проводятся с целью оценки генной терапии при помощи люмбальной пункции. Недостатки, описанные в данной области техники, представляющие перенос генов посредством люмбальной пункции, привели к неудаче в трансдукции нейрональной ткани, но только трансдуцированных менингеальных фибробластов, за исключением случаев интрапаренхиматозного введения (Finegold (1999) *Hum Gene Ther* 10:1251-1257; Milligan (2005) *Eur J Neurosci* 21:2136-2148; Milligan (2005) *Mol Pain* 1:9; Milligan (2006) *Pain* 126:294-308), приводящего к экспрессии трансгена в течение менее двух недель (Milligan (2005) *Eur J Neurosci* 21:2136-2148; Milligan (2005) *Mol Pain* 1:9; Lin (2002) *Neurosci Lett* 317:1-4; Lin (2002) *Gene Ther* 9:1247-1253), требуют многократных введений (Milligan (2006) *Pain* 126:294-308) или премедикации (Vulchanova (2010) *Molecular Pain* 6:31).

Storek и соавторы (Storek (2008) *PNAS* 105 (3): 1055-1060) показали, что не смогли обнаружить экспрессию трансгена с обычным одноцепочечным рекомбинантным аденовирусным вектором gAAV2 и, в связи с чем, они проверили ряд модификаций рекомбинантного аденовирусного вектора gAAV: псевдотипированного с капсидами различных серотипов и двухцепочечного, самокомплементарного gAAV. В частности, Storek и др. обнаружили, что самокомплементарный вектор AAV8 эффективно и избирательно трансдуцирует первичные сенсорные нейроны в ганглиях дорсальных корешков, но не головного мозга, в результате интратекального введения и устанавливает длительную экспрессию гена после введения одного вектора.

Таким образом, по-прежнему, сохраняется потребность в данной области техники в отношении способов переноса генов, которые могут быть применены в лечении или профилактике неврологических заболеваний у млекопитающих. В особенности, существует необходимость в способах переноса генов, чтобы трансдуцировать нейрональную ткань, которая не подвержена одному или более недостаткам, указанным выше.

Описание изобретения

Краткое описание изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для применения в качестве лекарственного средства у субъекта, относящегося к млекопитающему, преимущественно человека, где генотерапевтический вектор содержит капсидные белки AAV серотипа 5 и продукт гена, представляющий интерес, фланкированный инвертированными концевыми повторами (ITR) аденовируса AAV, и где генотерапевтический вектор вводится путем интратекального люмбального введения.

В предпочтительном варианте осуществления интратекальное люмбальное введение осуществляется в положении, выбранном из группы, состоящей из L4-L5, L3-L4, L1-L2 и L2-L3.

В предпочтительном варианте осуществления генотерапевтический вектор AAV представляет собой одноцепочечный генотерапевтический вектор AAV или мономерный дуплексный вектор.

В предпочтительном варианте осуществления продукт гена представляет интерес для применения в лечении или профилактике состояния, выбранного из группы, которая включает боковой амиотрофический склероз (ALS), спинальную мышечную атрофию (SMA), боль, хорею Гентингтона, болезнь Альцгеймера, болезнь Тея-Сакса, атаксию Фридрейха, атаксию телеангиэктазию, спиноцеребеллярную атаксию 1, 2 и 3 типов, болезнь Нимана-Пика А, В и С, дофамин-чувствительную дистонию, синдром ломкой хромосомы X, болезнь Краббе, гликогеноз типа 2 (болезнь Помпе), первичный боковой склероз, болезнь

Пелицеуса-Мерибахера, X-сцепленную аденолейкодистрофию, нейропатию гигантских аксонов, множественную системную атрофию (MSA), проксимальную миотоническую миопатию, нейрональный цероидный липофусциноз (болезнь Баттена) и рак.

В предпочтительном варианте осуществления, инвертированные концевые повторы ITR AAV представляют собой инвертированные концевые повторы ITR AAV серотипа 2.

В предпочтительном варианте осуществления, продукт гена, представляющий интерес, выбирают из группы, содержащей: аспартилглюкозаминидазу, альфа-галактозидазу А, пальмитоил протеин тиоэстеразу, трипептидилпептидазу, лизосомальный трансмембранный белок, продукты многих генов, переносчик цистеина, кислую церамидазу, кислую альфа-L-фукозидазу, защитный белок/катепсин А, кислую β-глюкозидазу, или глюкоцереброзидазу, кислую β-галактозидазу, идуронат-2-сульфатазу, α-L-идуридонидазу, галактоцереброзидазу, кислую α-маннозидазу, кислую β-маннозидазу, арилсульфатазу В, арилсульфатазу А, N-ацетилгалактозамин-6-сульфат сульфатазу, кислую β-галактозидазу, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу, кислую сфингомиелиназу, NPC-1, кислую α-глюкозидазу, β-гексозаминидазу В, гепаран-N-сульфатазу, α-N-ацетилглюкозаминидазу, ацетил-СоА:α-глюкозаминид N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазу, α-N-ацетилгалактозаминидазу, α-N-ацетилгалактозаминидазу, α-нейраминидазу, β-глюкуронидазу, β-гексозаминидазу А, кислую липазу, нейротрофические факторы, такие как, нейротрофический ростовой фактор (NGF), нейротрофин-3 (NT-3), нейротрофин-4/5 (NT-4/5), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), церебральный дофаминовый нейротрофический фактор (CDNF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) и инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) и микроРНК для пониженной регуляции дефектного гена.

В предпочтительном варианте осуществления, продукт гена, представляющий интерес, функционально связан с контрольными элементами экспрессии, включающими промотор, который обеспечивает достаточную экспрессию продукта гена, представляющего интерес, для достижения терапевтического эффекта, где промотор предпочтительно выбран из группы, состоящей из промотора цитомегаловируса (CMV), фосфоглицераткиназы (PGK), промотора CAG (комбинация раннего энхансерного элемента цитомегаловируса и промотора куриного β-актина), промотора глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), промотора синапсина-1, нейронспецифической энolahзы (NSE) и индуцируемые промоторы, такие как, ген-переключатель или промотор, полученный из tet-оперона.

В предпочтительном варианте осуществления генотерапевтический вектор дополнительно вводится в мостомозжечковую цистерну (Cisterna magna) перед, одновременно или после интратекального люмбального введения.

В предпочтительном варианте осуществления 2×10^{13} 2×10^{15} , более предпочтительно 8×10^{13} - 6×10^{14} геномных копий на 1 кг массы тела вводятся субъекту.

В предпочтительном варианте осуществления субъект не подвергается внутривенной премедикации маннитолом перед интратекальным люмбальным введением генотерапевтического вектора AAV.

В предпочтительном варианте осуществления генотерапевтический вектор AAV не является самокомплементарным генным вектором.

Определения

"Конструкция нуклеиновой кислоты" определяется как молекула нуклеиновой кислоты, которая выделена из гена природного происхождения или, который был модифицирован для включения в него фрагментов нуклеиновых кислот, которые объединены или помещены друг с другом таким способом, который не существовал бы в иной форме в природе. Молекула нуклеиновой кислоты представлена нуклеотидной последовательностью. В некоторых случаях, нуклеотидная последовательность, входящая в состав конструкции нуклеиновой кислоты, функционально связана с одной или несколькими контролирующими последовательностями, которые управляют продукцией или экспрессией указанного пептида или полипептида в клетке или у субъекта.

Термин "гомологичный", когда используют для обозначения связи между определенной (рекомбинантной) нуклеиновой кислотой или молекулой полипептида и определенного организма-хозяина или клетки-хозяина, понимается как то, что в природе нуклеиновая кислота или молекула полипептида продуцируется клеткой-хозяином или организмами одного вида. Термин "гетерологичный" может быть использован для указания того, что в природе нуклеиновая кислота или молекула полипептида продуцируется посредством клетки-хозяина или организмов разных видов.

"Контролирующая экспрессию последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию нуклеотидной последовательности, с которой она функционально связана. Контролирующая экспрессию последовательность является "функционально связанной" с нуклеотидной последовательностью, в тех случаях, когда контролирующая экспрессию последовательность контролирует и регулирует транскрипцию и/или трансляцию этой нуклеотидной последовательности. Соответственно контролирующая экспрессию последовательность может включать промоторы, энхансеры, участки внутренней посадки рибосомы (IRES), терминаторы транскрипции, иницирующий кодон перед геном, кодирующим белок, сигналы сплайсинга для интронов и стоп-кодона. Термин "кон-

тролирующая экспрессию последовательность" предусматривает включение, как минимум, одной последовательности, присутствие которой предназначено оказывать влияние на экспрессию, а также может включать дополнительные полезные элементы. Например, лидерные последовательности и последовательности партнера по слиянию представляют собой контролирующие экспрессию последовательности. Данный термин может также включать конструирование последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы нежелательные, потенциальные иницирующие кодоны внутри и снаружи рамки были удалены из последовательности. Он также может включать конструирование последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы нежелательные, потенциальные участки сплайсинга были удалены. Сюда относятся последовательности или полиаденилированные последовательности (pA), направляющие присоединение поли-(A) хвоста, т.е. цепи, содержащей остаток аденина, к 3'-концу мРНК, которые могут называться поли(A) последовательности. Она также может предназначаться для повышения стабильности мРНК. Контролирующие экспрессию последовательности, оказывающие влияние на стабильность транскрипции и трансляции, например промоторы, а также последовательности, которые осуществляют трансляцию, например, последовательности Kozak, пригодные для использования в клетках насекомых, хорошо известны специалистам в данной области техники. Контролирующие экспрессию последовательности могут быть такого рода, чтобы модулировать нуклеотидную последовательность, с которой они функционально связаны, благодаря чему достигаются более низкие или более высокие уровни экспрессии.

Используемый в данном контексте термин "промотор" или "регулирующая транскрипцию последовательность" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, функция которого состоит в контроле транскрипции одной или нескольких кодирующих последовательностей, и который расположен выше сайта инициации транскрипции кодирующей последовательности относительно направления транскрипции, и структурно определяется наличием сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, в том числе, но не ограничиваясь ими, сайтами связывания транскрипционных факторов, сайтами связывания белка-активатора и репрессора, и любыми другими последовательностями нуклеотидов, известных специалистам в данной области техники, напрямую или опосредованно регулирующих уровень транскрипции с промотора, включая, например, аттенуаторы или энхансеры, в том числе сайленсеры. Термин "конститутивный" промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве тканей в наиболее физиологических и связанных с развитием условиях. Термин "индуцируемый" промотор представляет собой промотор, который регулируется в процессе развития и физиологически, например, посредством применения химического индуктора. Термин "тканеспецифичный" промотор активен только в специфических типах тканей или клеток.

Термин "3'-UTR" или "3'-нетранслируемая последовательность" (также часто называется как 3'-нетранслируемая область, или 3'-конец) относится к последовательности нуклеиновой кислоты, расположенной ниже последовательности, кодирующей ген, которая содержит, к примеру, сайт терминации транскрипции и (в большинстве, но не во всех эукариотических мРНК) сигнал полиаденилирования (как, например, AAUAAA или варианты этого). После окончания транскрипции, транскрипт мРНК может быть расщеплен ниже сигнала полиаденилирования и добавлен поли(A) хвост, который участвует в транспорте мРНК в цитоплазму (где осуществляется процесс трансляции).

Термин "вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты (как правило, ДНК или РНК), которая служит для передачи клонированной нуклеотидной последовательности (т.е. ДНК или РНК) в клетку-хозяина. Три основных типов векторов включают плазмиды, фаги и вирусы. Предпочтителен вектор, представляющий собой вирус. Векторы, содержащие и промотор, и сайт для клонирования, внутри которых может быть функционально связанный полинуклеотид, хорошо известны в данной области техники. Подобные векторы способны транскрибировать РНК в условиях *in vitro* или *in vivo*, и являться коммерчески доступными из таких источников, как Stratagene (La Jolla, Calif.) и Promega Biotech (Madison, Wis.). С целью оптимизации экспрессии и/или транскрипции *in vitro*, может явиться необходимым удаление, добавление или изменение 5'- и/или 3'-нетранслируемых участков клонов, чтобы исключить лишние, потенциально несоответствующие альтернативные кодоны инициации трансляции или другие последовательности, которые способны препятствовать или снижать экспрессию, либо на уровне транскрипции, либо трансляции. В другом варианте, консенсусные сайты связывания рибосомы могут вмещать непосредственно 5' иницирующий кодон для усиления экспрессии.

Термин "вирусный вектор" относится к вектору, содержащему некоторые или все из нижеперечисленных: вирусные гены, кодирующие продукт гена, контролирующие последовательности и последовательности, необходимые для упаковки вируса. Термин "парвовирусный вектор" определяется как рекомбинантно произведенный парвовирус или парвовирусная частица, которая содержит полинуклеотид для доставки в клетку-хозяина в условиях *in vivo*, *ex vivo* либо *in vitro*. Примеры парвовирусных векторов включают, например, аденоассоциированные вирусные векторы. В настоящем описании, векторная конструкция на основе парвовируса относится к полинуклеотиду, содержащему геном вируса или часть его, а также трансген.

Используемый в данном контексте термин "промотор" или "регулирующая транскрипцию последо-

вательность" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, функция которого состоит в контроле транскрипции одной или нескольких кодирующих последовательностей, и который расположен выше сайта инициации транскрипции кодирующей последовательности относительно направления транскрипции, и структурно определяется наличием сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, в том числе, но не ограничиваясь ими, сайтами связывания транскрипционных факторов, сайтами связывания белка-активатора и репрессора, и любыми другими последовательностями нуклеотидов, известных специалистам в данной области техники, напрямую или опосредованно регулирующих уровень транскрипции с промотора. Термин "конститутивный" промотор представляет собой промотор, который активен в большинстве тканей в наиболее физиологических и связанных с развитием условиях. Термин "индуцируемый" промотор представляет собой промотор, который регулируется в процессе развития и физиологически, например, посредством применения химического индуктора. Термин "тканеспецифичный" промотор активен только в специфических типах тканей или клеток.

Промотор может представлять собой любую подходящую промоторную последовательность, которая проявляет транскрипционную активность в клетке, включая мутантные, укороченные и гибридные промоторы, и быть получен из генов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды, либо гомологичные (нативные), либо гетерологичные (чужеродные) для клетки.

Промотор может являться промотором исходно связанным с кодирующей последовательностью, чтобы быть экспрессированным. Промотор также может являться конститутивным или индуцируемым промотором чужеродным для кодирующей последовательности, чтобы быть экспрессированным. Примерами соответствующих промоторов для применения в клетках млекопитающих являются, например, описанные у Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Примеры соответствующих промоторов для использования в клетках дрожжей включают, например, гликолитические промоторы.

Термин "фланкированная" относительно последовательности, которая является фланкированной другим элементом(ми) в данном описании указывает на наличие одного или нескольких фланкирующих элементов выше и/или ниже, т.е. с 5'- и/или 3'-конца относительно последовательности. Термин "фланкированная" не предназначен для указания последовательностей, которые являются обязательно перекрывающимися. Например, могут существовать вставочные последовательности между нуклеиновой кислотой, кодирующей трансген, и фланкирующим элементом.

Последовательность, которая "фланкирована" двумя другими элементами (например, инвертированными концевыми повторами ITR), указывает на то, что один элемент расположен с 5'-конца относительно последовательности, а другой расположен с 3'-конца относительно последовательности; вместе с тем, могут существовать вставочные последовательности между ними. В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность по п.(i), фланкирована по обе стороны нуклеотидными последовательностями инвертированного концевого повтора парвовируса.

Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота", используемые в данном описании равноценно, относятся к полимерной форме нуклеотидов разной длины либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Соответственно данный термин включает, но не ограничиваясь ими, одно-, двух- или полицепочечные ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, ДНК-РНК, гибриды, или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, модифицированные химическим или изохимическим способом, искусственно созданные или дериватизированные нуклеотидные основания. "Олигонуклеотид", как правило, относится к полинуклеотидам из примерно от 5 до 100 нуклеотидов одно- или двухцепочечной ДНК. Тем не менее, для целей настоящего изобретения, не существует верхнего предела длины олигонуклеотида. Олигонуклеотиды также известны, как олигомеры или олиги, могут быть выделены из генов или синтезированы химическими способами, известными в данной области техники.

Используемые в настоящем описании термины "лечение", "подвергающийся лечению" и т.п., относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может являться профилактическим относительно полного или частичного предупреждения заболевания или его симптомов, и/или являться терапевтическим в отношении частичного или полного излечения от болезни и/или побочного действия, вызванного болезнью. Термин "лечение", используемый в настоящем описании, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, преимущественно у человека, и включает:

- (a) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может иметь к нему предрасположенность, но которое еще не было установлено, как имеющееся;
- (b) подавление болезни, т.е. прекращение ее развития; а также
- (c) ослабление болезни, т.е. факторов регрессии заболевания.

"Идентичность последовательностей" и "подобие последовательностей" может определяться посредством выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием глобального или локального алгоритмов выравнивания, в зависимости от длины этих последовательностей. Последовательности одинаковой длины выравниваются преимущественно с применением

алгоритмов глобального выравнивания (например, Needleman Wunsch), который выравнивает последовательности оптимально по всей длине, в то время как последовательности, в основном разных длин, выравниваются преимущественно с помощью алгоритма локального выравнивания (например, Smith Waterman). После этого последовательности могут называться "идентичными в большой степени" или "подобными по существу", когда они (в случае оптимально выровненных с помощью, например, программ GAP или BESTFIT с использованием стандартных параметров) разделят, по меньшей мере, определенный минимальный процент идентичности последовательности (как определено ниже). Программа GAP использует алгоритм глобального выравнивания Needleman и Wunsch для выравнивания двух последовательностей по всей их длине (полная длина), доводя до максимума количество совпадений и сводя к минимуму количество разрывов. Глобальное выравнивание используется соответствующим образом для определения идентичности последовательности, когда две последовательности имеют одинаковые длины. Как правило, используются стандартные параметры GAP, со штрафом за открытие разрыва=50 (нуклеотидов)/8 (белков) и штрафом за продолжение разрыва=3 (нуклеотида)/2 (белка). Для нуклеотидов используется стандартная матрица замен nwsgapdna, а для белков стандартной матрицей замен является Blossum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS, 89, 915-919). Выравнивание последовательностей и подсчет процента идентичности последовательностей может быть определен с помощью компьютерных программ, таких как GCG Wisconsin Package, Version 10.3, доступных от Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA, либо с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом, таких как программа "needle" (с применением алгоритма глобального выравнивания Needleman Wunsch) или "water" (с использованием алгоритма локального выравнивания Smith Waterman) в EmbossWIN версии 2.10.0, применив те же параметры, что и для вышеуказанного GAP, либо используя стандартные настройки (для "needle" и для "water", а также для белка и выравниваний ДНК, штраф за открытие разрыва по стандартным настройкам Gap равен 10.0 и штраф за продолжение разрыва по стандартным настройкам равен 0,5; стандартной матрицей замен для белков является Blossum62, а для ДНК DNFull). В случае, когда последовательности имеют, по существу, различные длины, локальные выравнивания, в числе которых использование алгоритма Smith Waterman, являются предпочтительными. В другом варианте процент сходства или идентичности может быть определен с помощью функции поиска в зависимости от общедоступных баз данных с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т.д.

Подробное описание изобретения

Доставка гена в ЦНС до настоящего времени была затруднена размером и сложностью организации ЦНС. Экспрессия трансгена, следующая за однократной инъекцией в паренхиму мозга, представляется локальной и остается, главным образом, ограниченной областью введения инъекции. С применением цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) в качестве способа доставки вирусного вектора, может быть охвачена широкая область. Настоящее исследование показывает, что с помощью вектора на основе аденоассоциированного вируса AAV-5, представляется возможным достижение данной цели трансдукции на более широкую область в ЦНС. Лечение хорошо переносилось, без каких-либо неблагоприятных клинических признаков и не наблюдалось очевидной гибели нейронов. Нейрональные и глиальные клетки трансдуцировали с помощью универсального промотора CAG, однако, экспрессии трансгена за пределами ЦНС не наблюдалось. Используя специфичные клеточные промоторы, такие как промотор GFAP или промотор синапсина-1, можно управлять экспрессией в специфичной популяции клеток. Нами было показано, что области коры головного мозга, мозжечка и субвентрикулярная зона экспрессировали трансген нейрональных и глиальных клеток. В спинном мозге, преобладала трансдукция двигательного нейрона наряду с трансдукцией нейронов в ганглиях дорсальных корешков. Полученные результаты показывают, что способ ЦНС-опосредованной доставки может быть использован для доставки генов при генотерапевтическом подходе. Показания, по которым такой подход был бы полезен, могут быть: заболевания двигательных нейронов, симптомы, связанные с сенсорными расстройствами и рядом других неврологических нарушений.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для использования в качестве лекарственного средства у субъекта, относящегося к млекопитающим.

Предпочтительно то, что генотерапевтический вектор содержит капсидные белки AAV серотипа 5 и представляющий интерес продукт гена, фланкированный инвертированными концевыми повторами ITR AAV. Более предпочтительным, что генотерапевтический вектор вводят в цереброспинальную жидкость (ЦСЖ), преимущественно путем интратекального введения и/или введения в cisterna magna, еще более предпочтительно путем люмбального введения и/или введения в cisterna magna. Настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору AAV, как указано выше, для применения в качестве лекарственного средства. Другими словами, данное изобретение предлагает генотерапевтический вектор AAV по настоящему изобретению для применения в качестве способа лечения человека или животного организма посредством препарата. Настоящее изобретение дополнительно относится к генотерапевтическому вектору AAV, как определено в настоящем описании, для применения при лечении нарушений, таких как, например, болезнь двигательных нейронов, симптомов, связанных с сенсорными расстройствами, и

рядом других заболеваний нервной системы. В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к генотерапевтическому вектору AAV по настоящему изобретению для применения в изготовлении лекарственного средства при использовании в качестве способа лечения нарушения, как, например, нарушения, дополнительно указанного в настоящем описании.

Вирусы семейства Parvoviridae (парвовирусы) представляют собой небольшие ДНК-содержащие вирусы животных. Семейство Parvoviridae может подразделяться на два подсемейства: Parvovirinae, которые инфицируют позвоночных животных, и Densovirinae, которые поражают насекомых. Члены подсемейства Parvovirinae именуется в настоящем описании как парвовирусы и включают род Dependovirus. Как можно сделать вывод из названия их рода, члены Dependovirus являются уникальными тем, что им, как правило, необходимо коинфицирование с хелперным вирусом, таким как аденовирус или вирус герпеса для продуцирования инфекции в клеточной культуре. Род Dependovirus включает AAV, который, в большинстве случаев, инфицирует людей (например, серотипы 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, и 6) или приматов (например, серотипы 1 и 4), а также родственные вирусы, которые инфицируют других теплокровных животных, (такие как, аденоассоциированные вирусы крупного рогатого скота, собаки, лошади и овцы). Более подробная информация о парвовирусах и других членах семейства Parvoviridae описана в Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication", Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996).

Геномная организация всех известных серотипов AAV является очень сходной. Геном AAV представлен линейной, одноцепочечной молекулой ДНК, которая составляет примерно менее 5000 нуклеотидов (nt) в длину. Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности для репликации неструктурных (Rep) и структурных (VP) белков. Белки VP (VP1, -2 и -3) образуют капсид. Терминальные 145 нуклеотидов являются самокомплементарными и организованы таким образом, что может быть образован энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий T-образную шпильку. Подобные шпильчатые структуры выполняют функцию точки начала репликации вирусной ДНК, выступая в качестве праймеров для клеточного комплекса ДНК-полимеразы. После инфицирования AAV дикого типа (wt) в клетках млекопитающих экспрессируются гены Rep (т.е. Rep78 и Rep52) с промотора P5 и промотора P19 соответственно, и оба белка Rep играют роль в репликации вирусного генома. Процесс сплайсинга в открытой рамке считывания Rep (Rep ORF) приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (т.е. Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Между тем, было показано, что несплайсированной мРНК, кодирующей белки Rep78 и Rep52, в клетках млекопитающих, достаточно для производства AAV вектора. Вместе с тем, и в клетках насекомых достаточно белков Rep78 и Rep52 для производства AAV вектора.

Термин "рекомбинантный парвовирусный или аденовирусный AAV вектор" (или "гAAV вектор") в настоящем описании относится к вектору, содержащему один или несколько полинуклеотидных последовательностей, продукт гена, гены или "трансгены", представляющие интерес, которые фланкированы, как минимум, одной парвовирусной или аденовирусной AAV последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR). Подобные гAAV векторы могут быть реплицированы и упакованы в инфекционные вирусные частицы, которые присутствуют в клетке-хозяине насекомого, экспрессирующей продукты генов гер и сар AAV (т.е. белки Rep и Cap AAV). В случае, если гAAV вектор встроен в крупную конструкцию нуклеиновой кислоты (например, в хромосому или в другой вектор, такой как плаزمид или бакуловирус, используемой для клонирования или трансфекции), то гAAV вектор, как правило, рассматривается в качестве "про-вектора", который может быть "восстановлен" путем репликации и инкапсулирования при наличии у AAV функций упаковки и необходимых хелперных функций. В предпочтительном варианте, продукт гена, представляющий интерес, фланкирован ITR AAV с обеих сторон. Любой ITR AAV может быть использован в конструкциях по настоящему изобретению, в том числе ITR из AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8 и/или AAV9. ITR из AAV2 являются наиболее предпочтительными. Примеры предпочтительных последовательностей ITR для применения в предпочтительных конструкциях нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, приведены в последовательностях SEQ ID NO: 1 (слева или выше ITR) и SEQ ID NO: 2 (справа или ниже ITR).

Аденоассоциированный вирус AAV способен инфицировать ряд клеток млекопитающих; см., для примера, Tratschin et al. (1985, Mol. Cell Biol. 5:3251-3260) и Grimm et al. (1999, Hum. Gene Ther. 10:2445-2450). Однако трансдукция AAV синовиальных фибробластов человека является значительно более эффективной, чем в аналогичных мышечных клетках, Jennings et al., Arthritis Res, 3:1 (2001), и клеточная тропность AAV различается среди серотипов; см., для примера, Davidson et al. (2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 3428-3432), где обсуждают различия между AAV2, AAV4 и AAV5 в отношении их тропности к клеткам ЦНС млекопитающих и эффективности трансдукции, а также Goncalves, 2005, Virol J. 2(1):43, где обсуждают подходы к изменению тропности AAV.

Генотерапевтический вектор AAV для применения по настоящему изобретению может быть создан либо в клетках млекопитающих, либо в клетках насекомых. Оба способа описаны в данной области техники. В качестве примера Grimm et al. (2003 Molecular Therapy 7(6): 839-850) раскрывает стратегию для создания векторов AAV в хелперном вирусе свободно и оптически управляемым способом, который основан на трансфекции только двух плазмид в клетки 293T. Они раскрывают способ создания гибридного AAV вектора, содержащего ITR AAV2 и капсидные белки AAV5. Данная ссылка полностью включена в

настоящем описании. Дополнительную информацию также можно найти в Blits et al. (2010) (*Journal of Neuroscience methods* 185(2):257-263). Термины "гибридный" и "псевдотипированный" используются равноценно в настоящем описании и для обозначения векторов, в которых белки Rep, ITR и/или капсидные белки принадлежат различным серотипам. Например, ITR и белки Rep принадлежат к серотипу AAV2, а капсидные белки к серотипу AAV5. Термин "химерный" используется в настоящем документе для описания одного гена, такого как, например, капсид, состоящего как минимум из двух последовательностей, которые получены из разных серотипов.

Серотип AAV5 может быть создан, например, в клетках млекопитающих в соответствии со следующим способом, но не ограничиваясь этим: векторный геном содержит кассету, экспрессирующую транскрипционный фланкированную двумя инвертированными концевыми повторами (ITR), полученными из AAV серотипа 2. Общая длина вирусного векторного генома не может превышать размер генома дикого типа 4,7 т.п.н. с целью поддержания эффективности упаковки. Один капсид состоит из 60 вирусных белков либо VP1 (62 кДа), VP2 (73 кДа), либо VP3 (87 кДа), в соотношении 1:1:10. Способ производства AAV векторов основан на трансфекции двух плазмид фосфатом кальция $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ в эмбриональные клетки почек человека (HEK293) в роллер-флаконах (площадь поверхности 850 cm^2) с последующей очисткой инкапсидированных векторных геномов при помощи методов фильтрации и хроматографии. Первая плазида представляет собой вирусную векторную плазмиду и содержит экспрессирующую конструкцию, которая фланкирована ITR AAV2. Вторая плазида является упаковывающей плазмидой и кодирует гены *rep* AAV типа 2 и *cap* AAV типа 5 нужного серотипа и ранние хелперные гены E2A, VA, E4 аденовируса (pDP5; нуклеотидная последовательность, раскрыта в SEQ ID NO:3). Геном, продуцирующий клеточную линию, содержит ген E1 аденовируса для обеспечения хелперных функций. После ко-трансфекции двумя плазмидами в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков Iscove's, (IMDM), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (FCS), клетки инкубируют в течение трех дней в бессывороточной среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), чтобы сделать возможной продукцию вектора. Продукция вектора в роллер-флаконах приводит в среднем к выходу 3×10^3 векторных геномов на клетку или 4×10^{11} векторных геномов на роллер-флакон (оцененных количественной ПЦР qPCR). Затем клеточную культуру лизируют буфером, содержащим Тритон X-100, и клеточный дебрис удаляют путем низкоскоростного центрифугирования. Отделенную от дебриса массу очищают афинной хроматографией с использованием AVB Sepharose и производят концентрирование и диафильтрацию в растворе PBS/5% сахарозы, используя половолоконный модуль 400 кДа (например, из Spectrum Laboratories).

В другом варианте генотерапевтический вектор AAV для применения по настоящему изобретению, может быть создан в клетках насекомых, как было ранее описано Urabe et al. (*Journal of Virology* 2006 80(4):1874-1885). В том числе модификации в последовательностях Rep и VP1, VP2 и VP3, раскрытые ранее, могут использоваться в настоящем изобретении, такие как, например, описанные в международных публикациях WO 2007/046703, WO 2007/148971, WO 2009/014445, WO 2009/104964 и/или WO 2011/112089.

Инвертированные концевые повторы ITR и последовательности Rep AAV, которые могут использоваться в настоящем изобретении для создания рекомбинантных векторов гAAV в клетках насекомых, могут быть получены из генома AAV любого серотипа. Как правило, серотипы AAV содержат геномные последовательности с существенной гомологией на уровнях аминокислоты и нуклеиновой кислоты. Данная особенность обеспечивает сходный набор генетических функций для получения вирионов, которые являются, по сути, конструктивно и функционально равноценными. В отношении геномной последовательности целого ряда серотипов AAV и общего представления геномного сходства рассматривается для примера GenBank Accession number U89790; GenBank Accession number J01901; GenBank Accession number AF043303; GenBank Accession number AF085716; Chiorini et al. (1997, *J. Vir.* 71: 6823-33); Srivastava et al. (1983, *J. Vir.* 45:555-64); Chiorini et al. (1999, *J. Vir.* 73:1309-1319); Rutledge et al. (1998, *J. Vir.* 72:309-319) и Wu et al. (2000, *J. Vir.* 74: 8635-47). Серотипы 1, 2, 3, 4 и 5 rAAV являются предпочтительным источником нуклеотидных последовательностей AAV для применения в контексте настоящего изобретения. Преимущественными для применения в контексте настоящего изобретения являются последовательности ITR AAV, полученные из AAV1, AAV2, и/или AAV5. Наиболее предпочтительными последовательностями ITR для применения по настоящему изобретению являются последовательности ITR AAV2. Подобным образом, последовательности, кодирующие Rep (Rep78/68 и Rep52/40), полученные из AAV1, AAV2 и/или AAV5, являются предпочтительными, и наиболее предпочтительны из AAV2.

Последовательности Rep и ITR AAV являются особенно консервативными среди большинства серотипов. Белки Rep78 ряда серотипов AAV являются, например, более чем на 89% идентичными, а общая схожесть нуклеотидной последовательности на уровне генома между AAV2, AAV3A, AAV3B и AAV6 составляет около 82% (Bantel-Schaal et al., 1999, *J. Virol.*, 73(2):939-947). Кроме того, последовательности Rep и ITR большинства серотипов AAV известны эффективностью перекрестной комплементарности (например, функционально замещают) соответствующим последовательностям из других серотипов при производстве AAV частиц в клетках млекопитающих. Патент US2003148506 описывает, что последовательности Rep и ITR AAV также эффективно перекрестно дополняют другие последовательности

сти Rep и ITR AAV в клетках насекомых.

Известно, что белки VP AAV определяют клеточную тропность вириона AAV. Последовательности, кодирующие белки VP, значительно менее консервативны, чем белки Rep и гены среди различных серотипов AAV. Последовательности, кодирующие вирусные белки (VP) VP1, VP2 и капсидные белки VP3 для применения в контексте по настоящему изобретению получены из AAV5. Наиболее предпочтительными белками VP1, VP2 и VP3 являются белки VP1, VP2 и VP3 серотипа AAV5. В другом варианте VP1, VP2 и VP3 представляют собой последовательности дикого типа AAV5, такие как показано, например, в SEQ ID NO:3 (нуклеотидная последовательность) и SEQ ID NO:4 (аминокислотная последовательность). Способность последовательностей Rep и ITR перекрестно дополнять соответствующие последовательности других серотипов создает возможность для получения псевдотипированных частиц гAAV, содержащих капсидные белки одного серотипа (например, AAV5) и последовательности ITR другого серотипа AAV (например, AAV2). Подобные псевдотипированные частицы гAAV являются частью настоящего изобретения. В настоящем описании псевдотипированная частица гAAV может рассматриваться в качестве типа "x/y", где "x" указывает происхождение последовательностей ITR, а "y" означает серотип капсида, например частица 2/5 гAAV имеет в своем составе последовательности ITR AAV2 и капсид AAV5.

Модифицированные последовательности "AAV" также могут быть применены в контексте настоящего изобретения, например, для создания гAAV векторов в клетках насекомых. Подобные модифицированные последовательности, например, включают последовательности, обладающие как минимум около 70%, как минимум около 75%, как минимум около 80%, как минимум около 85%, как минимум около 90%, как минимум около 95% или более идентичностью нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей (например, последовательность, имеющая примерно от 75 до 99% идентичности нуклеотидной последовательности) к последовательностям ITR, Rep или VP AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9 могут применяться вместо последовательностей ITR, Rep или VP дикого типа AAV.

Несмотря на сходство с другими серотипами AAV по многим аспектам, AAV5 отличается от других серотипов AAV человека и обезьяны больше, чем другие известные человеческие и обезьяньи серотипы. В свете вышесказанного, создание гAAV5 может отличаться от получения других серотипов в клетках насекомых. Поскольку способы по настоящему изобретению используются для получения гAAV5, является предпочтительным, что одна или несколько конструкций включают, в общей сложности, в случае более одной конструкции, нуклеотидную последовательность, содержащую ITR AAV5, нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, кодирующую Rep AAV5 (т.е. нуклеотидная последовательность содержит Rep7 8 AAV5) и/или последовательность, кодирующую Cap AAV5. Подобные последовательности ITR, Rep и Cap могут быть модифицированы по желанию для получения эффективной продукции гAAV5 или псевдотипированных векторов гAAV5 в клетках насекомых. Например, иницирующий кодон последовательностей Rep может быть модифицирован, сайты сплайсинга VP могут быть изменены или удалены и/или иницирующий кодон VP1 может быть модифицирован для улучшения продукции векторов гAAV5 в клетке насекомого, как это, например, показано в WO 2007/046703, WO 2007/148971 и/или WO 2009/014445. В настоящее изобретение также включены химерные капсиды AAV5, в которых, например, VP1 AAV5 частично или полностью заменен на VP1, полученный из AAV2, а VP2 и VP3 получены из AAV5 (Urabe et al., 2006; WO2000/028004). В таком химерном капсиде AAV5, по меньшей мере, VP3 должен относиться к AAV5 или быть полученным из AAV5, в то время как один или оба VP1 и VP2 могут относиться к другому серотипу AAV или быть полученными из другого серотипа AAV.

Предпочтительные аденовирусные векторы являются модифицированными, для того чтобы ослабить ответ организма, как рассмотрено Russell (2000, J. Gen. Virol 81: 2573-2604.), или как описано в патенте US20080008690, и Zaldumbide и Hoeben (Gene Therapy 2008: 239-246).

Предпочтительно, что белок Rep78, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 и/или аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 6 и белок Rep52, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, используются в настоящем изобретении.

"Инtrateкальное" введение применяется для обозначения инtrateкальной инъекции, т.е. введения внутрь цереброспинальной жидкости на любом уровне цереброспинальной оси, в том числе инъекции в желудочки мозга (см. также "Route of Administration". Data Standards Manual. Food and Drug Administration. Retrieved 11 March 2011). Это инъекция осуществляется через оболочку спинного мозга в субарахноидальное пространство таким образом, что достигает ЦСЖ. Данный способ введения является практически используемым, например, в спинальной анестезии, химиотерапии или для лечения болевого синдрома. Такой способ также применяется для введения лекарственных средств, которые направлены против определенных инфекций, в особенности постнейрохирургических. Вещество вводится посредством инtrateкальной инъекции, что позволяет избежать необходимости прохождения через гематоэнцефалический барьер. Лекарственные средства, доставленные инtrateкальным путем, часто не содержат каких-либо консервантов или других потенциально вредных неактивных компонентов, которые, в некоторых случаях, встречаются в лекарственных средствах для внутривенного введения.

Инtrateкальный способ доставки рассматривается как менее инвазивный, чем инфузия в саму ткань центральной нервной системы (ЦНС), поскольку инфузия в ЦНС требует сложной операции на головном мозге. Инtrateкальная доставка может быть выполнена без необходимости в специализированной группе нервных клеток для мозговых инъекций.

Шейная область позвоночника известна как шейный отдел позвоночника Cervical Spine. Данная область состоит из семи позвонков, которые обозначаются сокращенно C1-C7 (сверху вниз). Эти позвонки защищают ствол головного мозга и спинной мозг, поддерживают черепную коробку, и позволяют совершать движения головы в широком диапазоне. Первый шейный позвонок (C1) называется Atlas (Атлант). Atlas имеет кольцеобразную форму и поддерживает черепную коробку. Второй шейный позвонок C2 называется Axis (эпистрофей). Он круглой формы с притуплённой зубовидной структурой (так называемый зубовидный отросток эпистрофея Odontoid Process или отросток второго шейного позвонка), который выступает вверх в Atlas. Совместно Atlas и Axis делают возможным вращение и поворот головы. Другие шейные позвонки (C3-C7) по форме в виде цилиндров с небольшими остистыми отростками (пальцевидные выступы), которые вытянуты от задней части позвонков. Ниже последнего шейного позвонка представлены 12 позвонков грудного отдела позвоночника Thoracic Spine. Они сокращенно обозначаются T1-T12 (сверху вниз). T1 является наименьшим, а T12 самым крупным грудным позвонком. Грудные позвонки больше, чем шейные и имеют более длинные остистые отростки. Дополнительно к более длинным остистым отросткам, прикрепляются ребра, что добавляет прочности грудному отделу позвоночника. Подобные конструкции делают грудной отдел позвоночника более стабильным, чем шейный или поясничный отделы. Кроме того, грудная клетка и система связок ограничивают диапазон движения грудного отдела позвоночника, и защищает многие жизненно важные органы. Поясничный отдел позвоночника Lumbar Spine состоит из 5 позвонков, сокращенно названных L1-L5 (по величине). Размер и форма каждого поясничного позвонка предназначены для того, чтобы нести большую часть веса тела. Каждый структурный элемент поясничного позвонка больше, объемнее и шире, чем соответствующие составные компоненты в шейном и грудном отделах. Для поясничного отдела позвоночника характерен больший диапазон движения, чем для грудного отдела, но меньший, чем для шейного отдела позвоночника. Фасеточные суставы поясничного отдела позвоночника позволяют совершать существенное сгибание и растяжение, однако ограничивают вращение. Крестцовый отдел позвоночника Sacrum расположен позади таза. Пять крестцовых позвонков, сокращенно названных S1-S5, сросшиеся в форму, близкую к треугольной, образуют крестец. Крестец помещается между двумя подвздошными костями таза, соединяя позвоночник с тазом. Последний поясничный позвонок (L5) сочленяется (подвижно) с крестцом. Непосредственно под крестцом находятся пять дополнительных позвонков, сочлененных друг с другом, формируя копчиковую кость Соссух (копчик).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения генотерапевтический вектор вводится люмбально. Более предпочтительно инtrateкальное люмбальное введение в положении, выбранном из группы, состоящей из L4-L5, L3-L4, L1-L2 и L2-L3. Еще более предпочтительно, чтобы генотерапевтический вектор был введен посредством инtrateкальной инъекции между L4 и L5. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения генотерапевтический вектор вводится только люмбально, т.е. не предусмотрено введения в других локализациях.

В другом варианте или в сочетании с ранее предпочтительным воплощением настоящего изобретения в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения генотерапевтический вектор вводится в мостомозжечковую цистерну cisterna magna. В одном из предпочтительных вариантов осуществления генотерапевтический вектор вводится только в cisterna magna, т.е. не предусмотрено введения в других локализациях. Более предпочтительно, чтобы введение в cisterna magna осуществлялось в сочетании с инtrateкальным введением, или другими словами, перед, одновременно или после инtrateкального введения.

В другом предпочтительном варианте осуществления, введение в cisterna magna осуществляется в сочетании с люмбальным введением, преимущественно в результате чего, введение в cisterna magna осуществляется перед, одновременно или после люмбального введения. Предпочтительно в настоящем воплощении изобретения, люмбальное введение осуществляется в инtrateкальном отделе.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления, генотерапевтический вектор вводится только в cisterna magna в сочетании с люмбальным введением, т.е. не предусмотрено введения в других локализациях, кроме как cisterna magna и люмбальный отдел. Преимущественно в настоящем воплощении изобретения, люмбальное введение осуществляется в инtrateкальном отделе.

"Cisterna magna" или "мостомозжечковая цистерна" является одним из трех основных расширений в субарахноидальное пространство между арахноидальной (паутинной) и мягкой мозговой оболочками из оболочек, покрывающих мозг. Расширения в совокупности именуется цистернами. Cisterna magna расположена между мозжечком и дорсальной поверхностью продолговатого мозга. Цереброспинальная жидкость образуется в четвертом желудочке, стекает в cisterna magna через боковые и срединные отверстия.

Комбинированное введение или введение "перед", "одновременно или после" инtrateкального введения, как используется в настоящем описании, означает, что введение в cisterna magna и инtrateкальное

введение совершаются в течение временного интервала, предпочтительно меньшего 2, 1 недели, 4 дней, 48, 24, 12, 6, 4, 2, 1 ч, 30, 20, 10 или 5 мин.

Рекомбинантные AAV векторы могут содержать либо одноцепочечную, либо двухцепочечную ДНК. Одноцепочечная ДНК (ssDNA) генома AAV должны быть переведена в двухцепочечную ДНК (dsDNA) до того, как произойдет экспрессия трансгена, который она кодирует. Данный этап можно обойти путем применения самокомплементарных векторов или мономерных дуплексных векторов, которые содержат инвертированный повтор векторного генома, который сложен в dsDNA без проведения необходимого синтеза ДНК или спаривания оснований между многовекторными геномами, тем самым повышая эффективность переноса гена, опосредованного AAV. Для обзора самокомплементарных AAV векторов, смотри, например, McCarty, D.M. *Molec. Ther.* (2008) 16:1648-1656. Так называемые самокомплементарные AAV векторы (WO2001/092551) содержат по меньшей мере один модифицированный ITR, предпочтительно модифицированный путем делеции сайта концевой разрешения (trs) и концептуально отличные от мономерных дуплексных AAV векторов, которые создают возможность быть продуцируемыми только за счет использования интактных ITR AAV (WO2011/122950). В предпочтительном варианте осуществления, самокомплементарные AAV векторы не входят в объем настоящего изобретения. Для сравнения, мономерный дуплексный вектор, как упоминалось выше, отличается по последовательности от самокомплементарного вектора, и может предпочтительно применяться в настоящем изобретении, поскольку относится к векторным геномам, которые помимо интактных последовательностей ITR составляют половину (1/2) от размера или менее чем размер AAV векторов дикого типа (т.е. 4,8 кб). Это является преимуществом, потому что многократные повторы (конкатемеры из 2, 4, 8 или многократно экспрессирующей единицы) могут быть встроены в AAV вектор, в результате чего получаются одно-, двух-, четырехмерные дуплексные векторы. Примером экспрессирующих единиц в подобных векторах могут быть векторы, содержащие короткие шпилечные РНК shRNA или микроРНК miRNA. В настоящем изобретении было показано, что широкая трансдукция ткани головного мозга может быть получена после люмбальной инъекции с использованием одноцепочечного генотерапевтического вектора AAV. Таким образом, предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является генотерапевтический вектор AAV, который представляет собой одноцепочечный генотерапевтический вектор AAV.

Генотерапевтический вектор AAV по настоящему изобретению успешно выполняет трансдукцию более широкой области в центральной нервной системе после интратекального люмбального введения. С использованием универсального промотора (CAG промотор) были трансдуцированы и нейрональные, и глиальные клетки в коре головного мозга, мозжечке и субвентрикулярной зоне. В дополнение к этому, в спинном мозге преобладала трансдукция двигательных нейронов так же, как трансдукция нейронов в ганглиях дорсальных корешков. Следовательно, способ лечения по настоящему изобретению может использоваться при лечении некоторых нарушений ЦНС. В предпочтительном варианте осуществления генотерапевтический вектор AAV в соответствии с настоящим изобретением содержит продукт гена, представляющий интерес, который может использоваться для лечения или профилактики состояния, выбранного из группы, состоящей из бокового амиотрофического склероза (ALS), спинальной мышечной атрофии (SMA), боли, лизосомных болезней накопления (LSD), хорей Гентингтона, болезни Альцгеймера, болезни Тея-Сакса, атаксии Фридрейха, атаксии телеангиэктазии, спиноцереbellарной атаксии 1, 2 и 3 типов, болезни Нимана-Пика А, В и С, дофамин-чувствительной дистонии, синдрома ломкой хромосомы X, болезни Краббе, гликогеноза типа 2 (болезнь Помпе), первичного бокового склероза, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, X-сцепленной адренолейкодистрофии, нейропатии гигантских аксонов, множественной системной атрофии (MSA), проксимальной миотонической миопатии, нейронального цероидного липофусциноза (болезнь Баттена) и различных форм рака ЦНС, таких как, например, первичная лимфома ЦНС, метастатические или вторичные опухоли головного мозга, первичные опухоли спинного мозга, рак ЦНС в том числе, для примера, глиобластома, астроцитиома, олигодендроглиома, эпендимома, менингиома, медуллобластома, ганглиоглиома, шваннома, краниофарингиома, хордома, неходжкинская лимфома ЦНС.

Группа метаболических нарушений, известных как лизосомные болезни накопления (LSD), включает более сорока генетических нарушений, многие из которых приводят к генетическим дефектам целого ряда лизосомальных гидролаз. Характерные лизосомные болезни накопления и связанные с ними нарушенные ферменты перечислены в табл. 1.

Таблица 1

Лизосомные болезни накопления	Нарушенный фермент
Аспартилглюкозаминурия	Аспартилглюкозаминидаза
Фабри	α -галактозидаза А
Болезнь Баттена*, ювенильная форма (CNL1)	Пальмитоил протеин тиоэстераза
Болезнь Баттена*, классическая поздняя ювенильная форма (CNL2)	Трипептидилпептидаза
Болезнь Баттена*, ювенильная форма (CNL3)	Лизосомальный трансмембранный белок
Болезнь Баттена*, другие формы (CNL4-CNL8)	Продукты многих генов
Цистиноз	Переносчик цистеина
Фарбера	Кислая церамидаза
Фукозидоз	Кислая α -L-фукозидаза
Галактозидосиалидоз	Защитный белок/катепсин А
Гоше 1, 2* и 3* типов	Кислая β -глюкозидаза или глюкоцереброзидаза
G _{M1} ганглиозидоз*	Кислая β -галактозидаза
Хантера*	Идуронат-2-сульфатаза
Гурлер-Шейе*	α -L-Идуронидаза
Краббе*	Галактоцереброзидаза
α -Маннозидоз*	Кислая α -маннозидаза
β -Маннозидоз*	Кислая β -маннозидаза
Марото-Лами	Арилсульфатаза В

Метахроматическая лейкодистрофия*	Арилсульфатаза А
Моркио тип А	N-Ацетилгалактозамин-6-сульфат сульфатаза
Моркио тип В	Кислая β -галактозидаза
Муколипидоз II/III*	N-Ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза
Ниманна-Пика тип А*, В	Кислая сфингомиелиназа
Ниманна-Пика тип С*	NPC-1
Помпе*	Кислая α -глюкозидаза
Сандхоффа*	β -Гексоаминидаза В
Санфилиппо тип А*	Гепаран N-сульфатаза
Санфилиппо тип В*	α -N-Ацетилглюкозаминидаза
Санфилиппо тип С*	Ацетил-СоА: α -глюкозаминид N-ацетилтрансфераза
Санфилиппо тип D*	N-Ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатаза
Болезнь Шиндлера*	α -N-Ацетилгалактозаминидаза
Шиндлера-Канзаки	α -N- Ацетилгалактозаминидаза
Сиалидоз	α -Нейроминидаза
Слая*	β -Глюкуронидаза
Тэя-Сакса*	β -Гексоминидаза А
Волмана*	Кислая липаза
* с поражением ЦНС	

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, продукт гена, представляющий интерес для применения в лечении или профилактике состояния, связанного с двигательными нейронами, и/или нейронами в ганглиях дорсальных корешков DRG. Эти заболевания включают, но, не ограничиваются ими, боль, боковой амиотрофический склероз (ALS), первичный боковой склероз (PLS), прогрессирующую мышечную атрофию (PMA), прогрессирующий бульбарный паралич (PBP) и псевдобульбарный паралич.

В деталях предпочтительного варианта воплощения генотерапевтический вектор AAV в соответствии с настоящим изобретением содержит продукт гена, представляющий интерес, который может применяться для лечения или профилактики состояния, выбранного из группы, состоящей из бокового амиотрофического склероза (ALS), спинальной мышечной атрофии (SMA), хореи Гентингтона, множественной системной атрофии (MSA) и лизосомных болезней накопления, выбранных из группы, состоящей из Фабри, болезни Баттена ювенильной формы (CNL3), Гоше 1, 2 и 3 типов, Хантера, Помпе, Санфилиппо типа А и В.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления продукт гена, представляющий интерес, выбирают из группы, состоящей из аспартилглюкозаминидазы, α -галактозидазы А, пальмитоил протеин тиоэстеразы, трипептидилпептидазы, лизосомального трансмембранного белка, продуктов многих генов, переносчика цистеина, кислой церамидазы, кислой α -L-фукозидазы, защитного белка/катепсина А, кислой β -глюкозидазы, или глюкоцереброзидазы, кислой β -галактозидазы, идуронат-2-сульфатазы, α -L-идуронидазы, галактоцереброзидазы, кислой α -маннозидазы, кислой β -маннозидазы, арилсульфатазы В, арилсульфатазы А, N-ацетилгалактозамин-6-сульфат сульфатазы, кислой β -галактозидазы, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы, кислой сфингомиелиназы, NPC-1, кислой α -глюкозидазы, β -гексоаминидазы В, гепаран-N-сульфатазы, α -N-ацетилглюкозаминидазы, ацетил-СоА: α -глюкозаминид N-ацетилтрансферазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, α -нейраминидазы, β -глюкуронидазы, β -гексоаминидазы А, кислой липазы, нейротрофических факторов, таких как, нейротрофический ростовой фактор (NGF), нейротрофин-3 (NT-3), нейротрофин-4/5 (NT-4/5), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), церебральный дофаминовый нейротрофический фактор (CDNF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) и инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1). Кроме того, могут также использоваться последовательности микроРНК для пониженной регуляции экспрессии определенных

генов, таких как, например, при лечении хорей Гентингтона.

Большинство из заболеваний, указанных в данном описании, за исключением хорей Гентингтона, можно лечить, в том числе, путем обеспечения скорректированного варианта поврежденного гена. Однако хорей Гентингтона требует пониженной регуляции определенного гена, т.е. гена хантингтина (также известного как HTT, HD и IT15), расположенного на 4 хромосоме у человека. Индивиды, страдающие от хорей Гентингтона, являются носителями гена HTT с более чем 36 тринуклеотидными CAG повторами на 5'-конце гена. Подходы к разработке терапии хорей Гентингтона, основанной на РНК-интерференции (RNAi), включают общий нокдаун гена HTT (обоих генов, мутантного и дикого типов), например, путем направленного действия на 1 экзон. Другие подходы, например, представляют собой аллель-специфическое подавление экспрессии (сайленсинг) только мутантного HTT путем направленного действия на CAG повторы в 1 экзоне гена HTT и аллель-специфическое ингибирование экспрессии мутантного гена HTT, например, путем направленного действия на однонуклеотидный полиморфизм SNP в 67 экзоне.

В предпочтительном варианте осуществления продукт гена, представляющий интерес, функционально связан с контрольными элементами экспрессии, включающими промотор, который обеспечивает адекватную экспрессию продукта гена, представляющего интерес для достижения терапевтического эффекта. Уровень экспрессии трансгена в эукариотических клетках определяется в значительной степени транскрипционным промотором в каскаде, экспрессирующей трансген. Промоторы, которые показывают продолжительную активность и являются специфичными для тканей и даже для клеток, применяются в некоторых вариантах воплощения. Неограничивающие примеры промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор цитомегаловируса (CMV) (Kaplit et al. (1994) *Nat. Genet.*, 8:148-164), CMV/промотор гена β 3-глобина человека (Mandel et al. (1998) *J. Neurosci.*, 18:4271-4284), промотор фосфолипидкиназы (PGK), промотор CAG (комбинация раннего энхансерного элемента цитомегаловируса и промотора куриного β -актина) (Klein et al. (2008) *Mol Ther* 16 (1):89-96; Shevtsova et al. (2004) *Exp Physiol* 90:53-59), промотор GFAP (Xu et al. (2001) *Gene Ther.*, 8:1323-1332; Lee et al. (2008) *Glia* 56:481-493), промотор синапсина-1 (Kuegler et al. (2001) *Mol Cell Neurosci* 17: 78-96; Drinkut et al. (2012) *Molecular Therapy* 20:534-543), промотор длиной 1,8-кб гена нейрон-специфической енолазы (NSE) (Klein et al. (1998) *Exp. Neurol.*, 150:183-194), промотор куриного β -актина (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene*, 79: 269-277) и промотор β -глюкуронидазы (GUSB) (Shipley et al. (1991) *Genetics*, 10:1009-1018). Для пролонгирования экспрессии могут дополнительно быть функционально связанными с трансгеном другие регуляторные элементы, такие как, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита древесного сурка (WPRE) (Donello и др. (1998) *J. Virol.*, 72, 5085-5092) или сайт полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH). Drinkut и соавторы применяли промотор глиального белка (GFAP) чтобы экспрессировать GDNF и показали, что это более эффективно, чем экспрессия с нейрон-специфичного промотора (Drinkut et al., 2012, ранее). В другом варианте или в дополнение к использованию специфичного промотора регулируемой экспрессии можно достигнуть с помощью регулирующих экспрессию элементов, таких как, например, система переключения генов Gene Switch system (Maddalena et al. (2013) *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2:e106) или производные тетрациклинового оперона (Gossen and Bujard (1992) *PNAS* 89:5547-5551).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения генотерапевтический вектор AAV содержит капсидные белки AAV5, ITR AAV2 и продукт гена, представляющий интерес, расположенный между ITR. Предпочтительно, что генотерапевтический вектор вводится путем люмбальной инъекции, по возможности, в сочетании с введением в *cisterna magna*. Предпочтительные продукты гена и заболевания, которые подлежат лечению (или в качестве лечения, или профилактики) с помощью данного генотерапевтического вектора AAV, выбраны из группы, состоящей из GDNF или IGF-1 для лечения ALS, GDNF или IGF-1 для лечения SMA, микроРНК для пониженной регуляции поврежденного гена (SMN), кодирующего белок, способствующий выживанию спинальных двигательных нейронов для лечения SMA, микроРНК для достижения аллель-специфической пониженной регуляции или пониженной регуляции обоих аллелей HTT для лечения хорей Гентингтона, GDNF для лечения хорей Гентингтона, GDNF для лечения MSA, α -галактозидаза А для лечения болезни Фабри, лизосомальный трансмембранный белок для лечения ювенильной формы болезни Баттена (CNL3), кислая β -глюкозидаза или глюкоцереброзидаза для лечения болезни Гоше 1, 2 и 3 типов, идуронат-2-сульфатаза для лечения болезни Хантера, кислая α -глюкозидаза для лечения болезни Помпе, гепаран-N-сульфатаза для лечения болезни Санфилиппо типа А и α -N-ацетилглюкозаминидаза для лечения болезни Санфилиппо типа В.

Терапевтически эффективное количество генотерапевтического вектора AAV или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть предложены пациенту в случае их необходимости.

Генотерапевтический вектор AAV по настоящему изобретению, как правило, будет включен в состав фармацевтической композиции, при необходимости в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем и/или адьювантом. Подобные композиции включают нуклеиновую кислоту, конструкцию нуклеиновой кислоты, парвовирусный вирион или фармацевтическую композицию в эф-

фективном количестве, достаточном для обеспечения желаемого терапевтического или профилактического эффекта, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Термин "эффективное количество" включает терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к эффективному количеству в дозах и к периодам необходимого времени, чтобы достичь желаемого терапевтического результата, такого как, оценка признаков нарушения. Терапевтически эффективное количество нуклеиновой кислоты, конструкции нуклеиновой кислоты, парвовирусного вириона или фармацевтической композиции может изменяться в зависимости от таких факторов, как статус заболевания, возраст, пол и вес объекта, а также от способности нуклеиновой кислоты, конструкции нуклеиновой кислоты, парвовирусного вириона или фармацевтической композиции вызвать желаемый ответ у исследуемого объекта. Для обеспечения оптимального терапевтического ответа режимы дозирования можно регулировать. Терапевтически эффективное количество, как правило, соответствует также тому, при котором любые токсические или причиняющие вред эффекты нуклеиновой кислоты, конструкции нуклеиновой кислоты, парвовирусного вириона или фармацевтической композиции значительно превышаются терапевтически благоприятными эффектами.

"Профилактически эффективное количество" относится к эффективному количеству в дозах и к периодам необходимого времени, чтобы достичь желаемого профилактического результата, такого как, предупреждение или ингибирование разнообразных состояний. Профилактическая доза может быть применена у субъектов до или на ранней стадии заболевания, а профилактически эффективное количество может быть больше или меньше, чем терапевтически эффективное количество в некоторых случаях.

В конкретных вариантах осуществления диапазон для терапевтически или профилактически эффективного количества генотерапевтического вектора AAV или фармацевтической композиции может составлять от 1×10^{13} и 1×10^{16} геномных копий (гк)/кг, предпочтительно 2×10^{13} - 2×10^{15} , более предпочтительнее 8×10^{13} - 6×10^{14} , еще более предпочтительнее около 2×10^{14} гк/кг массы тела субъекта. Следует отметить, что величины дозы могут изменяться в зависимости от тяжести состояния, которое подлежит уменьшению. Для любого конкретного субъекта, определенные режимы дозирования могут корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональной оценкой специалиста, назначающего или наблюдающего за введением композиций. Диапазоны доз, установленные в настоящем описании, являются только иллюстративными и не ограничивают диапазонов доз, которые могут быть выбраны практикующими врачами.

Предпочтительно, что объем для инфузии в ЦСЖ в организм ребенка составляет менее примерно 20 cc, а в организм взрослого человека менее примерно 30 cc. Для приматов 6 cc могут быть безопасно доставлены в ЦСЖ общим объемом 20-25 cc. В другом варианте, по меньшей мере, половину объема, предназначенного для инфузии, удаляют и заменяют генотерапевтическим вектором по настоящему изобретению, чтобы достигнуть максимума примерно 50% от замещенного объема.

В дополнение к этому, генотерапевтический вектор AAV по настоящему изобретению можно быть введен в концентрированной форме при помощи стандартных способов, известных в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь, центрифугированием в градиенте плотности (например, CsCl, иодиксанол), диализом, ультрацентрифугированием, ионообменной (IEX) хроматографией (например, анионы, катионы), гель-фильтрацией, аффинной хроматографией, тангенциальной поточной фильтрацией (TFF), колоночной фильтрацией (например, Centricon). Кроме того, занесенный вирус или удаление хелперного вируса можно применить для улучшения качества генотерапевтического вектора AAV, используемого в настоящем изобретении, как, например, описано в патенте WO 2013/036118.

Используемый в настоящем описании термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "эксципиент" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, оболочки, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и агенты, замедляющие абсорбцию и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных субстанций хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда любая стандартная среда или агент являются несовместимыми с активным соединением и/или местом инъекции, их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению рассматривается.

Дополнительные активные соединения также могут быть включены в фармацевтические композиции по настоящему изобретению. Руководство по совместному введению дополнительных терапевтических средств можно найти, например, в Compendium of Pharmaceutical and Specialties (CPS) Ассоциации канадских фармацевтов.

В качестве примера, указанного Vulchanova (2010 Molecular Pain 6:31), введение вирусного вектора путем прямой люмбальной пункции не приводит, как сообщается, к существенной трансдукции спинного мозга и нейронов DRG. В связи с чем, Vulchanova и др. предлагают провести премедикацию маннитолом для улучшения проникновения векторов AAV5 и AAV8 в паренхиму спинного мозга и клеточных тел нейронов DRG. Так, в частности, люмбальная инъекция AAV вектора мышам при дозе около 4×10^{12}

векторных геномов на 1 кг требует внутривенной премедикации маннитолом перед интратекальным люмбальным введением вектора для того, чтобы получить экспрессию репортерного гена зеленого флуоресцентного белка (GFP) в спинном мозге и отдельных разновидностях нейронов DRG.

Премедикация маннитолом имеет недостаток, поскольку маннитол известен как вызывающий побочные эффекты. В частности, побочные реакции в значительном большинстве случаев, описанные во время или после инфузии маннитола, включают застой в легких, нарушение водно-солевого баланса, ацидоз, потеря электролитов, сухость во рту, жажда, выраженный диурез, задержка мочи, отеки, головная боль, нарушение зрения, судороги, тошнота, рвота, ринит, боль в руке, некроз кожи, тромбоз, флебит, озноб, головокружение, крапивница, обезвоживание, гипотония, тахикардия, лихорадка и стенокардия (Mannitol IV FDA Prescribing Information).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения субъект не подвергается премедикации до введения генотерапевтического вектора AAV. Так, в частности, субъект не подвергается премедикации веществом, которое контролирует внутричерепное давление, и/или может привести к нарушению межклеточных плотных контактов между эндотелиальными клетками микроциркуляторной части сосудистого русла ЦНС и/или способствует доставке лекарственных средств, таких как химиотерапевтические препараты, в ЦНС. Более предпочтительно, что субъект не подвергается премедикации осмотическим веществом до введения генотерапевтических векторов AAV. Осмотические вещества включают, но не ограничиваются ими, мочевины, глицерин, сахара или сахарные спирты, такие как полиолы, наподобие маннитола, и гипертонический раствор NaCl. В частности, субъект не подвергается премедикации маннитолом, такой как внутривенная премедикация маннитолом перед интратекальным люмбальным введением генотерапевтического вектора AAV.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения субъект, относящийся к млекопитающим, включает, но не ограничивается ими, мышей, крыс, обезьян, сельскохозяйственных животных, животных для спорта, домашних животных и человека. Наиболее предпочтительно, что субъектом, относящимся к млекопитающим, является человек.

В дополнительном аспекте сущность изобретения относится к способу получения рекомбинантного парвовирусного (например, rAAV) вириона (содержащий рекомбинантный парвовирусный (rAAV) вектор, как приведено выше) в клетке насекомого.

Предпочтительно, что способ включает этапы, осуществляющие: (а) культивирование клетки насекомого, как приведено в настоящем описании в таких условиях, при которых продуцируется рекомбинантный парвовирусный (например, rAAV) вектор; и (б) извлечение рекомбинантного парвовирусного (например, rAAV) вектора. Под настоящим понимается, что рекомбинантный парвовирусный (rAAV) вектор, полученный предпочтительно данным способом, представляет собой инфекционный парвовирусный или AAV вирион, который содержит рекомбинантный парвовирусный (rAAV) вектор нуклеиновых кислот. Условия выращивания клеток насекомых в культуре, а также производство гетерологичных продуктов в клетках насекомых в культуре хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в указанной выше ссылке на молекулярную инженерию клеток насекомых. Предпочтительные способы и конструкции для производства rAAV вирионов по настоящему изобретению описаны, например, в патентах WO2007/046703 и WO2007/148971.

Предпочтительно, что способ создания рекомбинантных парвовирусных вирионов дополнительно включает стадию аффинной очистки рекомбинантного (содержащего вирионы) парвовирусного (rAAV) вектора с использованием антитела против AAV, преимущественно иммобилизованного антитела. Антитело против AAV является предпочтительно моноклональным антителом. Весьма подходящим антителом является одноцепочечное антитело верблюжьих или его фрагмент, как, например, полученное от верблюдов или лам (смотри, для примера, Muyltermans, 2001, 74: Biotechnol. 277-3 02). Антитело для аффинной очистки rAAV является предпочтительным антителом, которое специфически связывается с эпитопом капсидного белка AAV, в соответствии с чем эпитоп предпочтительным является эпитоп, который присутствует на капсидных белках более одного серотипа AAV. Например, антитело может быть индуцировано или отобрано на основании специфичного связывания с капсидом AAV2, но в то же время оно также может специфически связываться с капсидами AAV1, AAV3 и AAV5.

В настоящем описании и в формуле изобретения глагол "содержать" и его спряжения используется без ограничения смысла, который означает, что пункты, следующие за словом, включены, а пункты, не перечисленные конкретно, не исключены.

Все патенты и ссылки на литературу, приведенные в настоящем описании, включены в данное описание полностью посредством ссылки.

Следующие примеры предложены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены с целью ограничивать объем настоящего изобретения каким-либо образом.

Описание чертежей

Фиг. 1 - схематическое изображение генома AAV вектора. Экспрессирующая кассета, кодирующая GOI (ген или продукт гена, представляющий интерес), находится под контролем промотора CAG, предшествующий последовательности Kozak (gccaccatg ...) и полиаденилированный сигналом полиаденилирования BGN. По настоящим примерам GOI представляет собой зеленый флуоресцентный белок (GFP).

Данная кассета фланкирована двумя некодирующими последовательностями ITR. Используя рекомбинантные бакуловирусы для производства, экспрессирующую кассету упаковывают в капсид AAV-5.

Фиг. 2 - общее представление трансдукции головного мозга. Репрезентативные срезы А-Е взяты из головного мозга и окрашены GFP. Экспрессия наблюдается по всему мозгу.

Фиг. 3 - более высокое увеличение теменной зоны коры головного мозга. Наблюдается и нейрональная и глиальная трансдукции нескольких слоев в глубину.

Фиг. 4 - более высокое увеличение затылочной зоны коры головного мозга. Наблюдается и нейрональная и глиальная трансдукции нескольких слоев в глубину.

Фиг. 5 - более высокое увеличение мозжечка. Многие клетки GFP-положительны.

Фиг. 6 - трансдукция шейного отдела спинного мозга. В виде точек наблюдаются сенсорные волокна, оканчивающиеся в сером веществе, наряду с восходящими волокнами (а). Кроме того, наблюдаются GFP-положительные волокна двигательных нейронов (b), идущие из пула двигательных нейронов (с). В (d) некоторых глиальных клетках также наблюдается GFP-положительное окрашивание.

Фиг. 7 - трансдукция грудного отдела спинного мозга. Восходящие сенсорные волокна наблюдаются в задних столбах спинного мозга (а). Кроме того, наблюдаются GFP-положительные волокна двигательных нейронов (b), идущие из пула двигательных нейронов (с). Среди (d) некоторых волокон наблюдаются те, которые могут являться и нисходящими, и восходящими.

Фиг. 8 - трансдукция поясничного отдела спинного мозга. Очевидны сенсорные волокна, оканчивающиеся в сером веществе мозга (а). Кроме того, GFP-положительные двигательные нейроны присутствуют в дорсолатеральной части спинного мозга. Эти двигательные нейроны выпускают свои волокна в передний корешок, проходящий через вентральную часть спинного мозга (d).

Фиг. 9 - окрашенные GFP фрагменты DRG, докрашенные гематоксилином. Наблюдается трансдукция ганглиев дорсальных корешков вдоль спинного мозга. DRG из шейного (A, B), грудного (C, D) и поясничного (E, F) отделов также трансдуцированы. При большем увеличении (изображение справа, B, D, F) просматриваются волокна в корешке посредством экспрессии ими GFP. Практически все нейроны DRG трансдуцированы.

Фиг. 10 - двойное окрашивание мозжечка GFP и нейрональным маркером NeuN. Клетки волокон Бергмана (Bc) показывают экспрессию GFP, а на основании его морфологии можно наблюдать также клетки Пуркинье (Pc).

Фиг. 11 - двойное окрашивание коры головного мозга GFP и NeuN. Конец стрелки указывает на нейрон, который экспрессирует GFP в коре головного мозга.

Фиг. 12 - двойное окрашивание коры головного мозга GFP и маркером астроцитов GFAP. Стрелкой указан астроцит, экспрессирующий GFP. Конец стрелки указывает на клетку, которая имеет характерные признаки нейрона.

Фиг. 13 - гематоксилином эозином окрашены срезы головного мозга и мозжечка. Вверху слева - общее представление мозжечка. Вверху справа представлено более высокое увеличение молекулярного слоя мозжечка. Четко расположенные, представляющие собой крупные округлые нейроны (см. также вставка), клетки Пуркинье. Как правило, очевидных инфильтратов или отклонений от нормы не наблюдаются, что указывает на хорошую переносимость лечения.

Фиг. 14 - срезы поясничного отдела спинного мозга, окрашенные GFP, показывающие дозозависимую трансдукцию двигательных нейронов в поясничном отделе спинного мозга за счет наличия трансгена крупных нейронов в вентральном роге. Животным были введены либо 5E13 (A), 5E14 (C), либо 8E14 (E) геномных копий (ГК) в ЦСЖ. На большем увеличении показан вентральный рог, где расположены двигательные нейроны, изображенные на (B, D и F).

Примеры

Пример 1.

В настоящем эксперименте векторы AAV-5, кодирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP) под контролем промотора CAG, были интратекально введены в ЦСЖ приматам. Экспрессию трансгена исследовали через 4 недели после инъекции. Экспрессия GFP наблюдалась в двигательных нейронах и ганглиях дорсальных корешков (DRG) во всех отделах спинного мозга. Более того, в мозжечке были трансдуцированы множество клеток волокон Бергмана, а также некоторые клетки Пуркинье. В головном мозге кора также экспрессировала GFP и нейронами, и глией. Клетки вдоль субвентрикулярной зоны (SVZ) также были трансдуцированы. В целом, полученные результаты указывают на то, что использование такого способа введения охватывает широкую область ЦНС и генная терапия для ЦНС становится целесообразным выбором.

Пример 1.1. Материалы и методы.

1.1.1. Получение вектора.

Экспрессирующая кассета рекомбинантного gAAV серотипа 5 (gAAV-5) содержит кДНК человека с кДНК гена усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Экспрессия находится под контролем промотора CAG, комбинации раннего энхансерного элемента цитомегаловируса (CMV) и промотора куриного β -актина. Ген GFP предшествует последовательности Kozak и полиаденилирован сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHPA). Целая кассета фланкирована двумя некодирующими

инвертированными концевыми повторами AAV-2 (см. на фиг. 1). Рекомбинантные векторы AAV-5 были получены с использованием экспрессионной системы бакуловируса, подобной описанной ранее (Urabe et al., 2002, Unzu et al., 2011, рассмотренной у Kotin, 2011). Вкратце, три рекомбинантных бакуловируса, один из которых, кодирует REP для репликации и упаковки, другой кодирует CAP-5 для капсида AAV-5 и третий с экспрессирующей кассетой, были использованы для инфицирования клеток насекомых SF9. Очистку проводили с использованием аффинной среды AVB Sepharose high-performance (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Векторы титровали с помощью метода количественной ПЦП с применением комбинации зондов-праймеров, направленных против трансгена и титры экспрессировались в виде геномных копий на мл (гк/мл). Титр вектора соответствовал 1.4×10^{14} гк/мл.

1.1.2. Животные и коллекция тканей.

В настоящем исследовании использовали самцов яванских макаков *Macaca fascicularis* ~4 кг веса. Ежедневные наблюдения за здоровьем и периодические измерения веса тела записывали с целью оценки благополучия животных. Ветеринары сообщали об отсутствии отклонений от нормы на протяжении всего исследования. Все процедуры одобрены Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных Valley Biosystems (Sacramento, CA, USA). Перед началом процедуры, животных подвергали отрицательному тестированию на наличие нейтрализующих антител против AAV (смотри ниже). Для данной процедуры животным давали наркоз из смеси кетамина (Ketaset, 7 мг/кг) и дексмететомидина гидрохлорида (Dexdomitor, 0,015 мг/кг). После операции все животные получали внутримышечную дозу атипамезол гидрохлорида для выхода из наркоза (Antisedan, 0,15 мг/кг). Через месяц после введения AAV-5, животных вводили в глубокий наркоз и проводили транскардиальную перфузию раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) и 4% параформальдегидом (PFA) в PBS. Головной мозг и органы были собраны и обработаны для гистологического анализа.

Вкратце, головной мозг, а также шейный, грудной и поясничный отделы спинного мозга нарезали коронарными слоями в блоки размером 6 мм, после фиксировали в 4% PFA-PBS в течение ночи, и криопротектировали с помощью 30% (мас./об.) сахарозы на следующий день. Для гистологического окрашивания, был использован скользящий блок микротомы (Thermo Scientific Microm HM 450, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), чтобы нарезать блоки головного мозга на серийные срезы толщиной 40 мкм. Затем срезы помещали в раствор криопротектора до использования.

1.1.3. Доставка аденовирусного вектора AAV.

После введения наркоза голову животного помещали в стереотаксическую рамку и сгибали в положении лежа, а заднюю часть шеи обрабатывали повидон-йодом и спиртом. Шприц объемом 3 мл, присоединенный к 1-дюймовой игле 23-го калибра, устанавливали на микроманипулятор, и игла вручную направлялась в Cisterna magna. Люмбальный мешок был приближен подобным образом между позвонками на уровне L4 и L5 спинного мозга. Глубина проникновения проверялась путем аспирации небольшого объема цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) в шприц, который затем прикрепляли к микроманипулятору. Трехходовый запорный кран на шприце затем устанавливали таким образом, чтобы сделать возможным инфузию 3 мл вектора со скоростью 0,5 мл/мин при помощи насоса (3500 Medfusion, Strategic Applications, Libertyville, IL). После завершения инфузии установку промывали 0,2 мл физиологического раствора. Заключительным этапом, аспирировали небольшой объем спинномозговой жидкости, чтобы убедиться, что игла все еще находилась в Cisterna magna. После проверки иглу медленно удаляли. Таким образом, каждое животное получало по 3 мл в Cisterna magna и по 3 мл с помощью люмбального введения. В общей сложности было введено 6 мл 1.4×10^{14} геномных копий ГК/мл AAV-5-CAG-GFP.

Подобным образом, животные могут быть подвергнуты введению такого же количества и дозировки AAV-5-CAG-GFP, который вводится только посредством люмбальной инъекции между позвонками на уровне L4 и L5 спинного мозга (без инъекции в Cisterna magna). Путем люмбальной инъекции были введены следующие количества AAV-5-CAG-GFP: 5×10^{13} (стандартная доза), 5×10^{14} и 8×10^{14} ГК (высокая доза).

Стандартная доза для введения AAV составляет примерно 1×10^{12} ГК и 5×10^{13} ГК. Например, Vulchanova (ранее) использует 1×10^{11} ГК AAV-5 для мыши (20 г), что составляет 5×10^{12} геномных копий/кг. Для обезьяны весом 5 кг такая доза составляет 2.5×10^{13} ГК. Кроме того, Gray et al. (2013, Gene Therapy, 20, 450-459) использует 2×10^{12} ГК на одно животное весом 6 кг. Исходя из этого, вводимую дозу 5.0×10^{13} ГК можно считать стандартной дозой в данной области техники, а дозы 5.0×10^{14} и 8.4×10^{14} считаются высокой дозой.

Поскольку люмбальная инфузия синего красителя приводит к выявлению синего красителя цистернально, то не ожидается никаких различий в результатах, в случае если генотерапевтический вектор вводится только люмбально.

1.1.4. Иммуногистохимия.

Хромогенное и иммунофлюоресцентное окрашивание проводили на коронарных срезах толщиной 40 мкм по всей площади четырех чередующихся блоков размером 6 мм из префронтальной коры мозжечка и спинного мозга. Хромогенное окрашивание GFP проводили, как было описано ранее (Nadacsek et al., 2009). Вкратце, срезы промывали в PBS, блокировали эндогенную пероксидазную активность в растворе, содержащем 1% H_2O_2 -30% этанола в PBS, и промывали в PBST (PBS, содержащий 0,1% Tween

20). Далее срезы инкубировали в блокирующем растворе Background Sniper (BS966G; Biocare Medical, Concord, CA), а затем инкубировали в течение 2-4 ч при температуре 4°C с первичным антителом против GFP (антитела кролика против GFP, разведенные в соотношении 1:3000; rabbit anti-GFP, Millipore, Bedford, MA) в разбавителе Da Vinci Green (PD900; Biocare Medical). На следующий день после проведения промывки в PBST срезы инкубировали в Rabbit Mach 3 Polymer HRP (RP531L; Biocare Medical) для окрашивания GFP при температуре внешней среды и проявляли цвет 3,3-диаминобензидином (DAB) (DAB peroxidase substrate kit, SK-4100; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Затем срезы помещали на предметные стекла, дегидратировали и покрывали покровными стеклами с помощью Shandon-Mount (cat. No 1900333; Thermo Fisher Scientific).

Для оценки фенотипа GFP-положительных клеток было проведено двойное иммунофлуоресцентное окрашивание. Срезы головного мозга промывали PBST, блокировали в течение 60 мин в 20% нормальной лошадиной сыворотке (NHS; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), а затем инкубировали в течение ночи при 4°C с анти-GFP (кролика или мыши, разведенные в соотношении 1:200; Millipore) вместе с антителами, специфичными для микроглии (anti-Iba1, поликлональные антитела кролика, разведенные в соотношении 1:500; Biocare Medical), нейронов (анти-NeuN, моноклональные антитела мыши, разведенные в соотношении 1:300; Millipore), фиброзных астроцитов (анти-глиальный фибриллярный кислый белок [GFAP], моноклональные антитела мыши, разведенные в соотношении 1:500; Dako, Carpinteria, CA). Все антитела разводили в разбавителе Da Vinci Green (PD900; Biocare Medical). После инкубирования с первичными антителами срезы промывали в PBST; инкубировали со смесью соответствующих вторичных антител (антикроличьи, конъюгированные с FITC [разведенные в соотношении 1:200; Jackson ImmunoResearch] или анти-мышинные, конъюгированные с Alexa 488 [разведенные в соотношении 1:500; Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA] и анти-мышинные, конъюгированные с Alexa 555 [разведенные в соотношении 1:500; Molecular Probes/Invitrogen], либо анти-кроличьи, конъюгированные с Alexa 555 [разведенные в соотношении 1:500; Molecular Probes/Invitrogen]) в PBST в течение 2 ч при комнатной температуре; промывали в PBS и переносили во влажном виде на предметные стекла с матовым полем. Срезы закрепляли покровными стеклами с фиксированной средой, содержащей 4,6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI), для выявления всех ядер (Vectashield H-1200; Vector Laboratories).

1.1.5. Титр антитела против AAV5 у приматов.

Титр антител, направленных против капсида AAV, определяли в образцах крови с помощью ELISA перед введением вектора. Вкратце, раствор капсидов AAV5 в 1 мМ карбонатном буфере, содержащий 2E10 ГК/мл, распределяли в 96-луночный титровальный планшет и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день планшет промывали и блокировали 5%-ным раствором обезжиренного молока в PBST. Сыворотку разводили в диапазоне от 1:50 до 1:6400 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем лунки промывали PBST и инкубировали с вторичным анти-обезьяним антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) при комнатной температуре в течение 1 ч. Лунки снова промывали в PBST, а далее проявляли 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (TMB). Реакцию останавливали добавлением соляной кислоты и измеряли поглощение при длине волны 450 нм на планшетном ридере (Bevan et al., 2011).

1.1.6. Биораспределение AAV.

До введения препарата: образцы крови собирали от взрослых особей яванских макаков (*Macaca fascicularis*) для проведения скрининга и исследования в сыворотке крови титра анти-AAV-5 антител, клинической биохимии сыворотки и оценок общего анализа крови.

Инфузия цереброспинальной жидкости CSF.

Животных иммобилизовали кетамин (10 мг/кг) внутримышечно и медетомидином (15 мкг/кг) внутримышечно. Игла для спинномозговой пункции была помещена в люмбальную область, куда животному вводили однократную дозу (содержащую 5 мл в течение 5 мин) AAV5-CAG-GFP в спинномозговую жидкость. Три различных дозы были введены данным животным (в общей сложности 5E14, 5E13 и 5E12 геномных копий).

Сбор ткани.

Животных со спинномозговой инфузией подвергали эвтаназии через 8 недель после инфузии. Каждое животное вводили в глубокий наркоз кетамин (от 10 до 15 мг/кг, внутримышечно) и медетомидином (15 мкг/кг). Животным вводили раствор эвтаназии определенными дозами. После проверки уровня глубины наркоза (т.е. отсутствие ответа на сдавливание пальца стопы, "светового рефлекса" и челюстных звуков) выполняли транс-торакаотомию и проводили забор образца печени. Были собраны головной и спинной мозг, а биоптат ткани был взят для молекулярного анализа (Q-PCR). Остальную часть ткани сохранили в параформальдегиде для гистологических оценок.

Количественная ПЦР (Q-PCR).

Ткань исследовали стандартным методом количественной ПЦР с использованием праймеров, направленных против гена GFP. Результат показан в табл. 2.

1.2. Результаты.

Животные хорошо перенесли операцию. Не наблюдалось потери веса, а также не отмечалось вете-

ринаром никаких клинических признаков.

Были исследованы три различных дозы AAV: 5E13 ГК, 5E14 ГК и 8.4E14 ГК. В качестве стандартной дозы может рассматриваться доза 5E13 ГК, в то время как дозы 5E14 ГК и 8.4E14 ГК являются высокими.

Как показано на фиг. 14, введение стандартной дозы AAV5 (5E13 ГК) практически не привело к трансдукции, подтверждая общее мнение в данной области техники, что AAV5 плохо трансдуцирует только нервные клетки после интратекального введения. Как ни странно, более высокие дозы AAV5 привели к значительной трансдукции двигательных нейронов. На фиг. 14 показана возрастающая трансдукция двигательных нейронов при использовании более высокой дозы. В заднем роге также наблюдаются некоторые волокна, означая трансдукцию нейронов ганглиев дорсальных корешков спинного мозга. Тем не менее, преобладающим типом трансдуцированных клеток являются двигательные нейроны.

Более того, наличие AAV геномов определяли в спинном мозге, головном мозге и печени. В частности, наличие AAV в печени будет указывать на то, что произошло рассеивание AAV5 из центральной нервной системы в периферическую. Хорошо известно, что AAV векторы могут обнаруживаться в периферической нервной системе после введения в ЦНС. Например, Naurigot и др. (2013, J. Of Clin. Invest., 123:3254-3271) использует AAV9 для полной коррекции организма с помощью интракраниального введения, который при этом доставляется в печень. Интересно отметить, что в отличие от, например, AAV9 большинство частиц AAV5 остаются в пределах спинного мозга с распространением в головной мозг. Печень остается не пораженной AAV5 (табл. 2).

Таблица 2
Наличие частиц AAV после цереброспинальной инфузии

Доза Ткань	5E14
Спинной мозг	+++
Головной мозг	++
Печень	-

где +++=обширное наличие геномов AAV,
++=большое количество геномов AAV,
+=геномы присутствуют и
- не обнаружено присутствия геномов AAV.

Следующие результаты наблюдений получены из экспериментов, проведенных с 8.4E14 ГК: экспрессия GFP наблюдалась по всей ЦНС, включая головной мозг, мозжечок и спинной мозг. Экспрессия наблюдалась также и в нейрональных и глиальных клетках. В частности, экспрессия GFP наблюдалась преимущественно в двигательных нейронах. Vulchanova и др. также обнаружила экспериментально трансдукцию нейрональных клеток с AAV5, после предварительной обработки маннитолом. Тем не менее, Vulchanova и др. наблюдали значительно более высокую эффективность трансдукции нейронов ганглиев дорсальных корешков DRG (и их нейритов, выступающих в задний рог спинного мозга) по сравнению с двигательными нейронами. Таким образом, соотношение трансдуцированных двигательных нейронов к нейронам DRG предполагается в пользу нейронов DRG с маннитолом и для двигательных нейронов с высокой дозой AAV5, определяя введение высокой дозы AAV5, в особенности, приемлемым для лечения и/или предупреждения состояний, связанных с двигательными нейронами.

Общее представление нескольких слоев мозга показало хорошую экспрессию по всему головному мозгу, преимущественно относящихся, расположенных в непосредственной близости от стенок желудочков (см. фиг. 2). В теменной коре показана экспрессия через несколько слоев коры. При этом были трансдуцированы отдельные астроциты (фиг. 3). То же самое относится и к затылочной части коры головного мозга (фиг. 4). В мозжечке, извилины его структуры были четко изображены посредством пограничной линии трансдуцированных клеток (фиг. 5). Кроме того, в этой части головного мозга, наблюдалась трансдукция как нейрональных, так и глиальных клеток.

В спинном мозге многие (если не все) двигательные нейроны трансдуцировали по всей длине спинного мозга (фиг. 6-8). Подобное наблюдение было сделано в отношении нейронов ганглиев дорсальных корешков DRG (фиг. 9). Они также были в значительной степени трансдуцированы, чтобы экспрессировать GFP. Для того чтобы определить клетки, которые экспрессировали трансген, проводили двойное окрашивание нейрональными и астроцитарными маркерами. С использованием специфического промотора CAG была достигнута как нейрональная, так и астроцитарная трансдукция (фиг. 10-12). Для того чтобы проверить, имела ли место потеря нейронов, проводили окрашивание гематоксилином и эозином на срезах мозжечка (фиг. 13). На основании сохраняющегося присутствия слоя клеток Пуркинье с помощью данного дифференцированного подхода нейротоксичность не исследовали.

1.3. Обсуждение.

Доставка гена в ЦНС все еще ограничена размером и сложностью организации ЦНС. После одно-

кратной инъекции в головной мозг экспрессия трансгена является очаговой и остается, главным образом, ограниченной участком инфузии. С применением цереброспинальной жидкости в качестве способа доставки вирусного вектора может быть охвачена широкая область. Данное исследование показывает, что с помощью вектора AAV-5 при относительно высокой дозе свыше 1×10^{14} ГК/кг, представляется возможным достижение цели трансдукции на широкой площади в ЦНС. Терапия переносится хорошо, поскольку никаких клинических признаков и очевидной потери нейронов обнаружено не было. Нейрональные и глиальные клетки трансдуцированы с применением специфичного промотора CAG. Используя клеточно-специфичные промоторы, такие как промотор GFAP или промотор синапсина-1, тот или иной способ контролировать экспрессию в определенной популяции. Мы обнаружили, что области коры головного мозга, мозжечка и субвентрикулярная зона показали экспрессию трансгена и в нейрональных и глиальных клетках. В спинном мозге преобладала трансдукция двигательных нейронов так же, как трансдукция нейронов в ганглиях дорсальных корешков. Полученные результаты показывают, что способ ЦНС-опосредованной доставки может быть применен, чтобы доставлять гены для генотерапевтического подхода. Симптомами, при которых такой подход может быть полезен, могут быть болезни двигательных нейронов, такие как боковой амиотрофический склероз (ALS), спинальная мышечная атрофия (SMA), или симптомы, связанные с сенсорными, такие как боль. Другие неврологические показания, при которых мог бы помочь такой подход, являются, в частности, хорей Гентингтона, болезнь Альцгеймера, болезнь Тея-Сакса, атаксия Фридрейха, атаксия телеангиэктазия, спиноцеребеллярная атаксия 1, 2 и 3 типов, болезнь Нимана-Пика А, В и С, дофамин-чувствительная дистония, синдром ломкой хромосомы X, болезнь Краббе, гликогеноз типа 2 (болезнь Помпе), первичный боковой склероз, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, X-сцепленная адренолейкодистрофия, нейропатия гигантских аксонов, множественная системная атрофия (MSA), проксимальная миотоническая миопатия, нейрональный цероидный липофуцинноз (болезнь Баттена).

Генетические нарушения, которые являются обуславливающими, широко известны и могут быть встроены в AAV(-5) вектор. Используя такую систему доставки в качестве терапевтического средства, можно было бы предположить, что такое средство изменяет генотип и, следовательно, хотелось бы надеяться, фенотип.

Кроме того, интратекальный способ доставки рассматривается как менее инвазивный, чем инфузия непосредственно, в ЦНС, поскольку операция на головном мозге требует сложного хирургического вмешательства. Интратекальный подход имеет также дополнительную ценность, что может быть выполнен без необходимости специализированной группы нервных клеток для инъекций головного мозга.

1.4. Ссылки.

Bantel-Schaal U¹, Delius H, Schmidt R, zur Hausen H. J Virol. 1999 Feb; 73(2):939-47. Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvoviruses.

Bartlett JS¹, Samulski RJ, McCown TJ. Hum Gene Ther. 1998 May 20; 9(8):1181-6. Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain.

Bevan AK, Duque S, Foust KD, Morales PR, Braun L, Schmelzer L, Chan CM, McCrate M, Chicoine LG, Coley BD, Porensky PN, Kolb SJ, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. Mol Ther. 2011 Nov; 19(11):1971-80.

Blits B¹, Derks S, Twisk J, Ehlert E, Prins J, Verhaagen J. J Neurosci Methods. 2010 Jan 15; 185(2):257-63. Adeno-associated viral vector (AAV)-mediated gene transfer in the red nucleus of the adult rat brain: comparative analysis of the transduction properties of seven AAV serotypes and lentiviral vectors.

Chiorini JA¹, Yang L, Liu Y, Safer B, Kotin RM. J Virol. 1997 Sep;71(9):6823-33. Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles.

Data Standards Manual. "Route of Administration". Food and Drug Administration. Retrieved 11 March 2011).

Davidson BL¹, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Mar 28; 97(7):3428-32. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system.

Donello JE¹, Loeb JE, Hope TJ. J Virol. 1998 Jun;72(6):5085-92. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element.

Drinkut A¹, Tereshchenko Y, Schulz JB, Bähr M, Kügler S. Mol

Ther. 2012 Mar; 20(3):534-43. Efficient gene therapy for Parkinson's disease using astrocytes as hosts for localized neurotrophic factor delivery.

Finegold AA¹, Mannes AJ, Iadarola MJ. Hum Gene Ther. 1999 May 1;10(7):1251-7. A paracrine paradigm for in vivo gene therapy in the central nervous system: treatment of chronic pain.

Goncalves, 2005, Virol J. 2(1):43 Tropism-modified adenoviral and adeno-associated viral vectors for gene therapy.

Gossen M¹, Bujard H. Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Jun 15;89(12):5547-51. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.

Gray SJ¹, Nagabhushan Kalburgi S, McCown TJ, Jude Samulski R. Gene Ther. 2013 Apr;20(4):450-9. doi: 10.1038/gt.2012.101. Epub 2013 Jan 10. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates.

Grimm D¹, Kleinschmidt JA. Hum Gene Ther. 1999 Oct 10;10(15):2445-50. Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use.

Grimm D¹, Kay MA, Kleinschmidt JA. Mol Ther. 2003 Jun;7(6):839-50. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6.

Hadaczek P¹, Forsayeth J, Mirek H, Munson K, Bringas J, Pivrotto P, McBride JL, Davidson BL, Bankiewicz KS. Hum Gene Ther. 2009 Mar; 20(3):225-37. Transduction of nonhuman primate brain with adeno-associated virus serotype 1: vector trafficking and immune response.

Jennings K¹, Miyamae T, Traister R, Marinov A, Katakura S, Sowders D, Trapnell B, Wilson JM, Gao G, Hirsch R. Mol Ther. 2005 Apr;11(4):600-7. Proteasome inhibition enhances AAV-mediated transgene expression in human synoviocytes in vitro and in vivo.

Kaplitt MG¹, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ. Nat Genet. 1994 Oct; 8(2):148-54. Long-

term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain.

Kenneth I. Berns, «Parvoviridae: The Viruses and Their Replication,» Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996).

Klein RL¹, Meyer EM, Peel AL, Zolotukhin S, Meyers C, Muzyczka N, King MA.), Exp Neurol. 1998 Apr;150(2):183-94. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors.

Klein RL¹, Dayton RD, Tatom JB, Henderson KM, Henning PP. Mol Ther. 2008 Jan; 16(1):89-96. Epub 2007 Oct 23. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method.

Kotin RM. Large-scale recombinant adeno-associated virus production. Hum Mol Genet. 2011 Apr 15;20(R1):R2-6.

Kügler S¹, Meyn L, Holzmüller H, Gerhardt E, Isenmann S, Schulz JB, Bähr M. Mol Cell Neurosci. 2001 Jan;17(1):78-96. Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors.

Lee Y¹, Messing A, Su M, Brenner M. Glia. 2008 Apr;56(5):481-93. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression.

Lin CR¹, Yang LC, Lee TH, Lee CT, Huang HT, Sun WZ, Cheng JT. Gene Ther. 2002 Sep;9(18):1247-53. Electroporation-mediated pain-killer gene therapy for mononeuropathic rats.

Lin CR¹, Tai MH, Cheng JT, Chou AK, Wang JJ, Tan PH, Marsala M, Yang LC. Neurosci Lett. 2002 Jan 4;317(1):1-4. Electroporation for direct spinal gene transfer in rats.

Maddalena et al.(2013) Molecular Therapy - Nucleic Acids 2:e106

Maddalena A¹, Tereshchenko J, Bähr M, Kügler S. Mol Ther Nucleic Acids. 2013 Jul 16;2:e106. Adeno-associated Virus-mediated, Mifepristone-regulated Transgene Expression in the Brain.

Mandel RJ¹, Rendahl KG, Spratt SK, Snyder RO, Cohen LK, Leff

SE. *J Neurosci.* 1998 Jun 1;18(11):4271-84. Characterization of intrastriatal recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer of human tyrosine hydroxylase and human GTP-cyclohydrolase I in a rat model of Parkinson's disease.

McCarty DM. *Mol Ther.* 2008 Oct;16(10):1648-56. Self-complementary AAV vectors; advances and applications.

Milligan ED¹, Langer SJ, Sloane EM, He L, Wieseler-Frank J, O'Connor K, Martin D, Forsayeth JR, Maier SF, Johnson K, Chavez RA, Leinwand LA, Watkins LR. *Eur J Neurosci.* 2005 Apr;21(8):2136-48. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10.

Milligan ED¹, Sloane EM, Langer SJ, Cruz PE, Chacur M, Spataro L, Wieseler-Frank J, Hammack SE, Maier SF, Flotte TR, Forsayeth JR, Leinwand LA, Chavez R, Watkins LR. *Mol Pain.* 2005 Feb 25;1:9. Controlling neuropathic pain by adeno-associated virus driven production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10.

Milligan ED¹, Sloane EM, Langer SJ, Hughes TS, Jekich BM, Frank MG, Mahoney JH, Levkoff LH, Maier SF, Cruz PE, Flotte TR, Johnson KW, Mahoney MM, Chavez RA, Leinwand LA, Watkins LR. *Pain.* 2006 Dec 15; 126(1-3):294-308. Repeated intrathecal injections of plasmid DNA encoding interleukin-10 produce prolonged reversal of neuropathic pain.

Miyazaki J¹, Takaki S, Araki K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K, Yamamura K. *Gene.* 1989 Jul 15;79(2):269-77. Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5.

Muyldermans S. *J Biotechnol.* 2001 Jun;74(4):277-302. Single domain camel antibodies: current status.

Passini MA¹, Lee EB, Heuer GG, Wolfe JH. *J Neurosci.* 2002 Aug 1; 22(15):6437-46. Distribution of a lysosomal enzyme in the adult brain by axonal transport and by cells of the rostral migratory stream.

Russell WC. *J Gen Virol.* 2000 Nov; 81(Pt 11):2573-604. Update on adenovirus and its vectors.

Rutledge EA¹, Halbert CL, Russell DW. *J Virol.* 1998 Jan;72(1):309-19. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2.

Sambrook and Russell (2001) «Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shevtsova Z¹, Malik JM, Michel U, Bähr M, Kügler S. *Exp Physiol.* 2005 Jan; 90(1):53-9. Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo.

Shipley JM¹, Miller RD, Wu BM, Grubb JH, Christensen SG, Kyle JW, Sly WS. *Genomics.* 1991 Aug; 10(4):1009-18. Analysis of the 5' flanking region of the human beta-glucuronidase gene.

Srivastava A, Lusby EW, Berns KI. *J Virol.* 1983 Feb; 45(2):555-64. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome.

Storek B¹, Reinhardt M, Wang C, Janssen WG, Harder NM, Banck MS, Morrison JH, Beutler AS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Jan 22; 105(3):1055-60. Sensory neuron targeting by self-complementary AAV8 via lumbar puncture for chronic pain.

Tratschin JD, Miller IL, Smith MG, Carter BJ. *Mol Cell Biol.* 1985 Nov; 5(11):3251-60. Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells.

Unzu C, Sampedro A, Mauleón I, Alegre M, Beattie SG, de Salamanca RE, Snapper J, Twisk J, Petry H, González-Asequinolaza G, Artieda J, Rodríguez-Pena MS, Prieto J, Fontanellas A. Sustained enzymatic correction by rAAV-mediated liver gene therapy protects against induced motor neuropathy in acute porphyria mice. *Mol Ther.* 2011 Feb; 19(2):243-50.

Urabe M¹, Nakakura T, Xin KQ, Obara Y, Mizukami H, Kume A, Kotin RM, Ozawa K. *J Virol.* 2006 Feb; 80(4):1874-85. Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells.

Urabe, M, Ding, C and Kotin, RM (2002). Insect cells as a factory to produce adeno associated virus type 2 vectors. *Hum*

Gene Ther 13: 1935-1943.

US20080008690: AAV virions with decreased immunoreactivity and uses therefor

Vulchanova L¹, Schuster DJ, Belur LR, Riedl MS, Podetz-Pedersen KM, Kitto KF, Wilcox GL, McIvor RS, Fairbanks CA. *Mol Pain*. 2010 May 28; 6:31. doi: 10.1186/1744-8069-6-31. Differential adeno-associated virus mediated gene transfer to sensory neurons following intrathecal delivery by direct lumbar puncture.

WO 2007/046703: Improved aav vectors produced in insect cells

WO 2007/148971: Vectors with modified initiation codon for the translation of aav-rep78 useful for production of aav in insect cells

WO 2009/014445: Baculoviral vectors comprising repeated coding sequences with differential codon biases

WO 2009/104964: Optimisation of expression of parvoviral rep and cap proteins in insect cells

WO 2011/112089: Mutated rep encoding sequences for use in aav production

WO 2013/036118: Removal of contaminating viruses from aav preparations

WO2001/092551: Duplexed parvovirus vectors

WO2011/122950: Monomeric duplex aav vectors

Wu P¹, Xiao W, Conlon T, Hughes J, Agbandje-McKenna M, Ferkol T, Flotte T, Muzyczka N. *J Virol*. 2000 Sep;74(18):8635-47. Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism.

Xu R¹, Janson CG, Mastakov M, Lawlor P, Young D, Mouravlev A, Fitzsimons H, Choi KL, Ma H, Dragunow M, Leone P, Chen Q, Dicker B, During MJ. *Gene Ther*. 2001 Sep;8(17):1323-32. Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes.

Zaldumbide A¹, Hoeber RC. *Gene Ther*. 2008 Feb;15(4):239-46. How not to be seen: immune-evasion strategies in gene therapy.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики неврологического нарушения, где способ включает введение примату интратекальным люмбальным путем генотерапевтического вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), где генотерапевтический вектор кодирует капсидные белки AAV серотипа 5 и содержит ген, кодирующий продукт, представляющий терапевтический интерес, фланкированный инвертированными концевыми повторами ITR AAV.

2. Способ по п.1, где интратекальное люмбальное введение осуществляют в положении, выбранном из группы, состоящей из L4 - L5, L3 - L4, L1 - L2 и L2 - L3.

3. Способ по п.1 или 2, где генотерапевтический вектор AAV представляет собой одноцепочечный генотерапевтический вектор AAV или мономерный дуплексный вектор.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный продукт гена, представляющий интерес, предназначен для применения в лечении или профилактике состояния, выбранного из группы, состоящей из бокового амиотрофического склероза (ALS), спинальной мышечной атрофии (SMA), боли, хореи Гентингтона, болезни Альцгеймера, болезни Тея-Сакса, атаксии Фридрейха, атаксии телеангиэктазии, спиноцеребеллярной атаксии 1, 2 и 3 типов, болезни Нимана-Пика А, В и С, дофамин-чувствительной дистонии, синдрома ломкой хромосомы X, болезни Краббе, гликогеноза типа 2 (болезнь Помпе), первичного бокового склероза, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, X-сцепленной адренолейкодистрофии, нейропатии гигантских аксонов, множественной системной атрофии (MSA), проксимальной миотонической миопатии, нейронального цероидного липофуциноза (болезнь Баттена) и рака.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где ITR AAV являются ITR AAV серотипа 2.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный продукт выбран из группы, состоящей из аспартилглюкозаминидазы, α -галактозидазы А, пальмитоил протеин тиоэстеразы, трипептидилпептидазы, лизосомального трансмембранного белка, продуктов многих генов, переносчика цистеина, кислой церамидазы, кислой α -L-фукозидазы, защитного белка/катепсина А, кислой β -глюкозидазы, или глюкоцереброзидазы, кислой β -галактозидазы, идуронат-2-сульфатазы, α -L-идурунидазы, галактоцереброзидазы, кислой α -маннозидазы, кислой β -маннозидазы, арилсульфатазы В, арилсульфатазы А, N-ацетилгалактозамин-6-сульфат сульфатазы, кислой β -галактозидазы, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы, кислой сфингомиелиназы, NPC-1, кислой α -глюкозидазы, β -гексозаминидазы В, гепаран-N-сульфатазы, α -N-ацетилглюкозаминидазы, ацетил-СоА: α -глюкозаминид N-ацетилтрансферазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, α -нейраминидазы, β -глюкуронидазы, β -гексозаминидазы А, кислой липазы, нейротрофических факторов, таких как нейротрофический ростовой фактор (NGF), нейротрофин-3 (NT-3), нейротрофин-4/5 (NT-4/5), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), церебральный дофаминовый нейротрофический фактор (CDNF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) и микроРНК для пониженной регуляции дефектного гена.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где ген, кодирующий продукт, представляющий терапевтический интерес, функционально связан с элементами, контролирующими экспрессию, включающими промотор, который обеспечивает экспрессию указанного гена, достаточную для достижения терапевтического эффекта, причем промотор предпочтительно выбран из промотора цитомегаловируса (CMV), фосфоглицераткиназы (PGK), промотора CAG (комбинация раннего энхансерного элемента цитомегаловируса и промотора куриного β -актина), промотора глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), промотора синапсина-1, нейронспецифической энлазы (NSE) и индуцируемого промотора, такого как ген-переключатель или промотор, полученный из tet-оперона.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где генотерапевтический вектор дополнительно вводят в Cisterna magna перед интратекальным люмбальным введением, одновременно с ним или после него.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, где субъекту вводят 2×10^{13} - 2×10^{15} геномных копий на 1 кг массы тела.

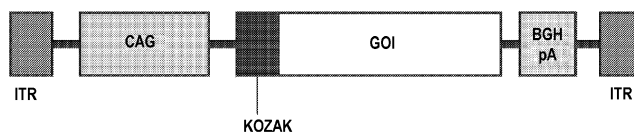
10. Способ по п.9, где вводят субъекту 8×10^{13} - 6×10^{14} геномных копий на 1 кг веса тела.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где субъекта не подвергают премедикации веществом, которое контролирует внутричерепное давление, и/или может приводить к нарушению межклеточных плотных контактов между эндотелиальными клетками микроциркуляторной части сосудистого русла ЦНС, и/или способствует доставке лекарственных средств, таких как химиотерапевтические препараты, в ЦНС.

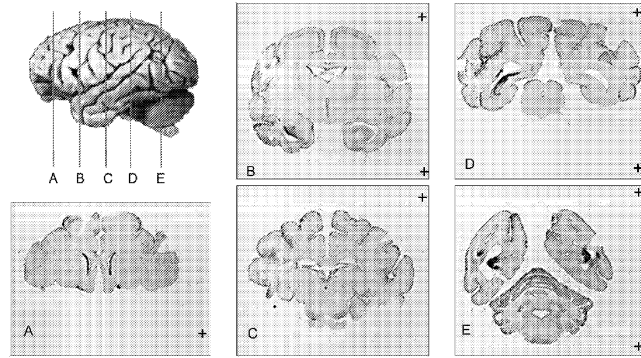
12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где субъекта не подвергают внутривенной премедикации маннитолом перед интратекальным люмбальным введением генотерапевтического вектора AAV.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где примат представляет собой человека.

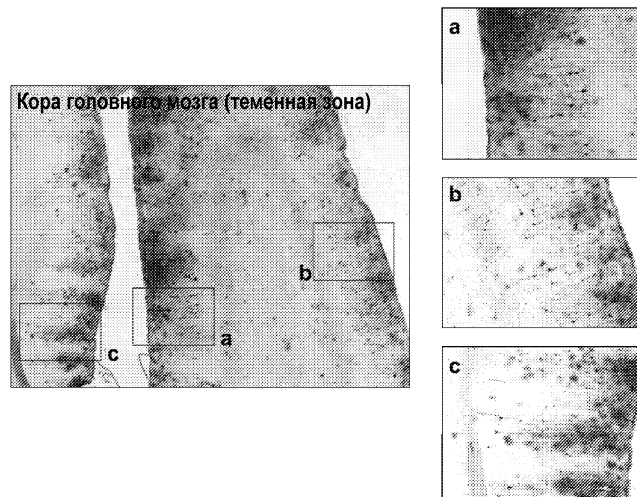
14. Способ по любому из предшествующих пунктов, где генотерапевтический вектор AAV не является самокомплементарным геномным вектором.



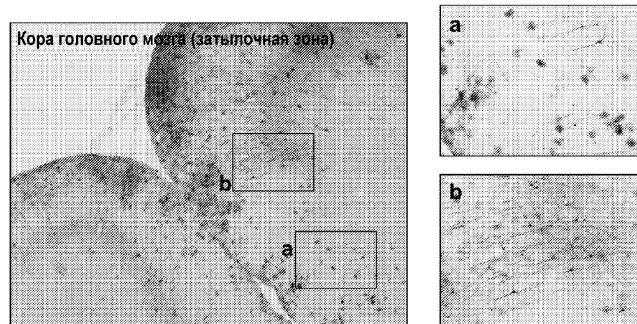
Фиг. 1



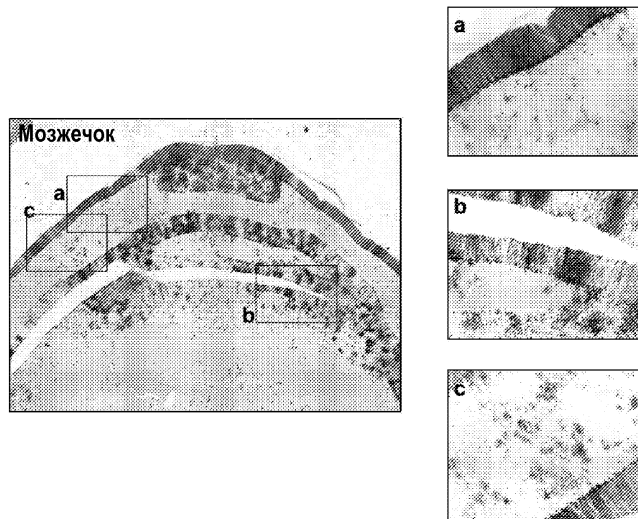
Фиг. 2



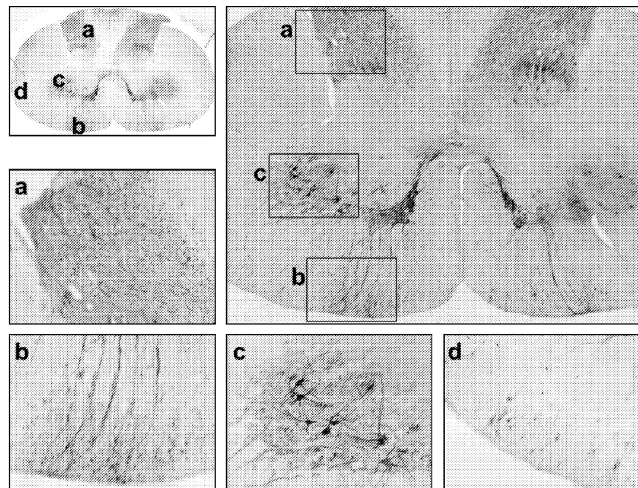
Фиг. 3



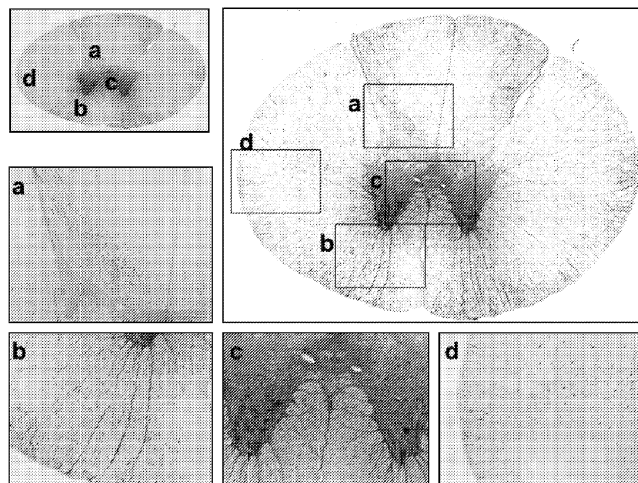
Фиг. 4



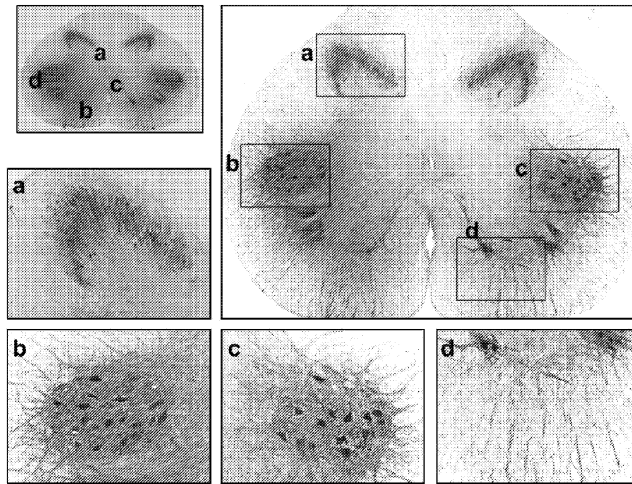
Фиг. 5



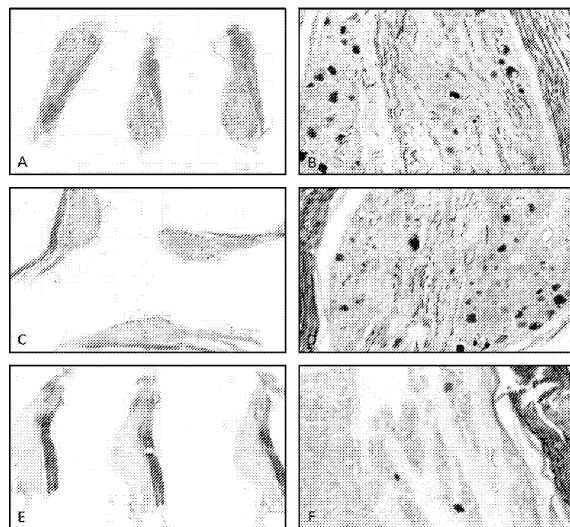
Фиг. 6



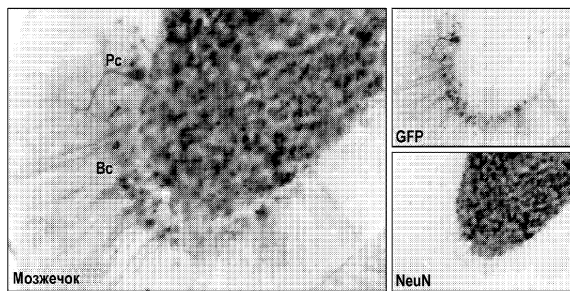
Фиг. 7



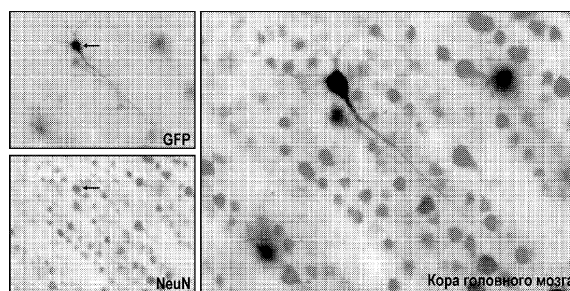
Фиг. 8



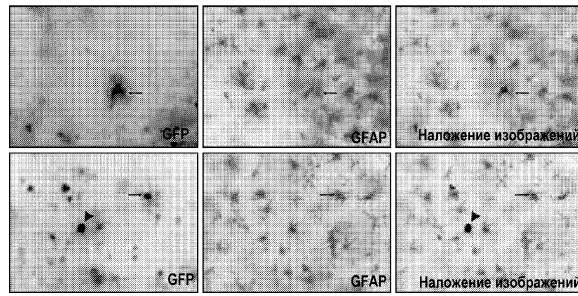
Фиг. 9



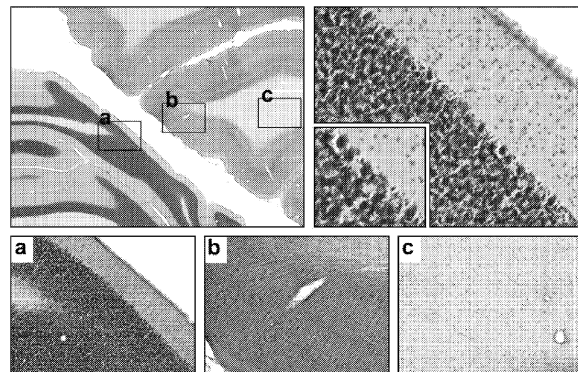
Фиг. 10



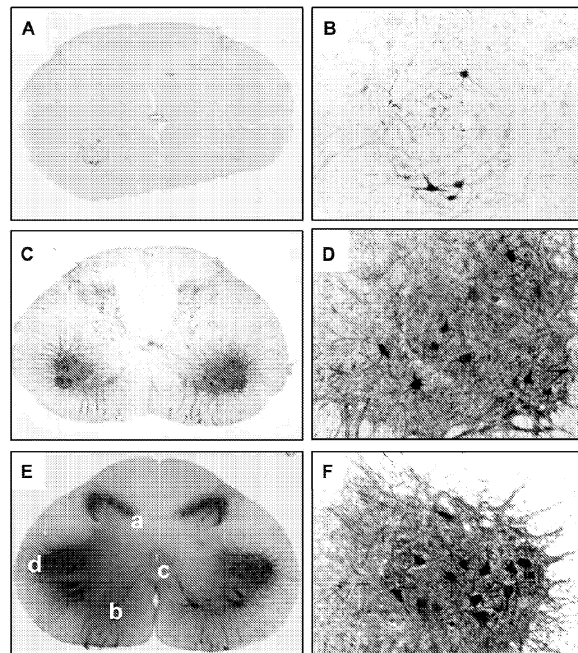
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14