

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293313 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.02(22) Дата подачи заявки  
2021.05.14(51) Int. Cl. *A61K 38/46* (2006.01)  
*A61P 3/00* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01)  
*A61P 21/00* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)

## (54) КОМПОЗИЦИИ, ПОЛЕЗНЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПОМПЕ

(31) 63/024,941; 63/109,677; 63/180,379

(32) 2020.05.14; 2020.11.04; 2021.04.27

(33) US

(86) PCT/US2021/032451

(87) WO 2021/231863 2021.11.18

(71) Заявитель:

ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ

ЮНИВЕРСИТИ ОФ

ПЕНСИЛЬВАНИЯ; АМИКУС

ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Уилсон Джеймс М., Ордо Жюльетт,

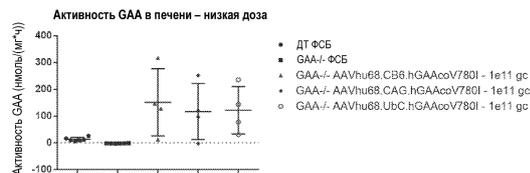
До Хунг В., Готшалль Рассел, Таск

Стивен (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлен способ снижения прогрессирования аномальной патологии мышц и/или обращения аномальной патологии мышц у пациента, причем у пациента было диагностировано заболевание Помпе или подозревается наличие заболевания Помпе. Способ включает введение пациенту рекомбинантного ААВ (рААВ), содержащего капсид ААВ и векторный геном, упакованный в него, при этом векторный геном содержит (а) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) промотор; (с) нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный слитой белок, содержащий сигнальный пептид и пептид vIGF2, слитый с кислотой α-глюкозидазой человека (hGAA); (d) полиА и (е) 3'-ITR. Также представлена фармацевтическая композиция, содержащая рААВ, описанный в данном документе, для применения в лечении пациента, у которого есть или подозревается наличие заболевания Помпе.



A1

202293313

202293313

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576340EA/032

### КОМПОЗИЦИИ, ПОЛЕЗНЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПОМПЕ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Болезнь Помпе, также известная как гликогеноз типа II, представляет собой лизосомную болезнь накопления, вызываемую мутациями в гене кислой  $\alpha$ -гликозидазы (GAA), приводящими к накоплению гликогена в сердце (кардиомиопатия), мышцах и двигательных нейронах (нервно-мышечное заболевание). При классической инфантильной болезни Помпе, тяжелая потеря активности GAA вызывает мультисистемное и раннее накопление гликогена, особенно в сердце и мышцах, и смерть в первые годы жизни от сердечно-дыхательной недостаточности. Инфантильная болезнь Помпе также характеризуется выраженным накоплением гликогена в нейронах (особенно двигательных нейронах) и глиальных клетках. Действующий стандарт лечения, заместительная ферментная терапия (ЗФТ), имеет неоптимальную эффективность для коррекции мышц и не может проходить через гематоэнцефалический барьер, что приводит к прогрессирующему неврологическому ухудшению у длительно живущих пациентов с классической инфантильной болезнью Помпе. Пациенты, получающие ЗФТ, которые живут дольше благодаря кардиокоррекции, демонстрируют новое естественное течение заболевания с прогрессирующим неврологическим фенотипом. Кроме того, рекомбинантная человеческая GAA является высокоиммуногенной и должна вводиться в очень больших количествах из-за плохого усвоения скелетными мышцами.

Существует несколько неудовлетворенных потребностей при лечении болезни Помпе, включая потребность в коррекции ЦНС-компонента заболевания, потребность в улучшении мышечной коррекции и потребность в альтернативе существующей ЗФТ, которая была бы более эффективной, менее иммуногенной и/или более удобной.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте в данном документе представлен способ снижения прогрессирования аномальной мышечной патологии и/или обращения аномальной мышечной патологии у пациента, при этом у пациента диагностирована болезнь Помпе или подозревается наличие болезни Помпе, причем способ включает введение пациенту рекомбинантного AAV (rAAV), содержащего капсид AAV и векторный геном, упакованный в него, при этом векторный геном содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) промотор; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный слитый белок, содержащий сигнальный пептид и пептид vIGF2, слитый с кислой  $\alpha$ -гликозидазой человека (hGAA), при этом последовательность, кодирующая химерный слитый белок, функционально связана с регуляторными последовательностями, которые направляют его экспрессию, и содержит SEQ ID №: 7 или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, которая кодирует аминокислоты с 1 по 982 SEQ ID №: 6; (d) полиА; и (e) 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор представляет собой

конститутивный промотор, необязательно промотор СAG или промотор СВ7. В некоторых вариантах осуществления изобретения аномальная мышечная патология характеризуется одним или более из: i) повышенной доли мышечных клеток с центральным ядром; ii) атрофией мышечных волокон, iii) анизоцитозом в клетках мышечных волокон, iv) аутофагическим разрастанием, v) вакуолизацией и vi) слабостью. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента наблюдается болезнь Помпе с поздним началом. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента наблюдается болезнь Помпе с началом в детском возрасте. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторный геном дополнительно содержит по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь или по меньшей мере восемь целевых последовательностей miR, при этом необязательно каждая из целевых последовательностей miR специфична к miR-183. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAB представляет собой капсид AAVhu68. В некоторых вариантах осуществления изобретения pAAB вводят внутривенно и/или интратекально. В некоторых вариантах осуществления изобретения pAAB вводят пациенту посредством двух путей введения, необязательно при этом два пути представляют собой внутривенное введение и введение в большую цистерну (ICM).

В одном аспекте в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный AAB (pAAB), содержащий капсид AAB и векторный геном, упакованный в нее, при этом векторный геном содержит: (a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR); (b) промотор; (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный слитой белок, содержащий сигнальный пептид и пептид vIGF2, слитый с кислой  $\alpha$ -глюкозидазой человека (hGAA), при этом последовательность, кодирующая химерный слитой белок, функционально связана с регуляторными последовательностями, которые направляют его экспрессию, и содержит SEQ ID №: 7 или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, которая кодирует аминокислоты с 1 по 982 SEQ ID №: 6; (d) полиА; и (e) 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор представляет собой конститутивный промотор, необязательно промотор СAG или промотор СВ7. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторный геном содержит по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь или по меньшей мере восемь целевых последовательностей miR, при этом необязательно каждая из целевых последовательностей miR специфична к miR-183. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAB представляет собой капсид AAVhu68. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция составлена для внутривенной и/или интратекальной доставки.

В одном аспекте в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении пациента с болезнью Помпе, при этом лечение снижает прогрессирование аномальной мышечной патологии и/или обращает аномальную мышечную патологию у пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения

аномальная мышечная патология характеризуется одним или более из: i) повышенной доли мышечных клеток с центральным ядром; ii) атрофией мышечных волокон, iii) анизоцитозом в клетках мышечных волокон, iv) аутофагическим разрастанием, v) вакуолизацией и vi) слабостью. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента наблюдается болезнь Помпе с поздним началом. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента наблюдается болезнь Помпе с началом в детском возрасте. В некоторых вариантах осуществления изобретения рААВ вводят пациенту посредством двух путей введения, необязательно при этом два пути представляют собой внутривенное введение и введение в большую цистерну (ICM).

В одном аспекте фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, пригодна для введения пациенту после появления симптомов, у которого была диагностирована болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция пригодна для обращения аномальной мышечной патологии у пациента с болезнью Помпе после появления симптомов. В некоторых вариантах осуществления изобретения аномальная мышечная патология характеризуется одним или более из: i) повышенной доли мышечных клеток с центральным ядром; ii) атрофией мышечных волокон, iii) анизоцитозом в клетках мышечных волокон, iv) аутофагическим разрастанием, v) вакуолизацией и vi) слабостью. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция пригодна для применения в совместной терапии, которая необязательно характеризуется тем, что пациент дополнительно получает лечение бронхолитиком, ингибитором ацетилхолинэстеразы, тренировкой силы дыхательных мышц (ТДМ), заместительной ферментной терапией и/или терапией стимуляцией диафрагмального нерва.

В одном аспекте представлено применение фармацевтической композиции, включающей введение рААВ, описанного в данном документе, для лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом, представленной в данном документе, при этом лечение снижает прогрессирование аномальной мышечной патологии и/или обращает аномальную мышечную патологию у пациента.

Другие аспекты и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А и Фиг. 1В демонстрируют активность hGAA в печени мышей с болезнью Помпе (-/-) через четыре недели после внутривенного введения различных AAVhu68.hGAA, имеющих сконструированную кодирующую последовательность hGAAV780I под управлением промоторов CB6 (третья колонка), CAG (четвертая колонка) или UbC (последняя колонка). (Фиг. 1А) низкая доза ( $1 \times 10^{11}$  GC). (Фиг. 1В) высокая доза ( $1 \times 10^{12}$ ).

Фиг. 2А и Фиг. 2В демонстрируют активность hGAA в сердце мышей с болезнью Помпе (-/-) через четыре недели после внутривенного введения различных AAVhu68.hGAA, имеющих сконструированную кодирующую последовательность

hGAAV780I под управлением промоторов CB6 (третья колонка), CAG (четвертая колонка) или UbC (последняя колонка). (Фиг. 2А) низкая доза ( $1 \times 10^{11}$  GC). (Фиг. 2В) высокая доза ( $1 \times 10^{12}$ ).

Фиг. 3А и Фиг. 3В демонстрируют активность hGAA в скелетной мышце (четырёхглавой мышце) мышей с болезнью Помпе (-/-) через четыре недели после внутривенного введения различных AAVhu68.hGAA, имеющих сконструированную кодирующую последовательность hGAAV780I под управлением промоторов CB6 (третья колонка), CAG (четвертая колонка) или UbC (последняя колонка). (Фиг. 3А) низкая доза ( $1 \times 10^{11}$  GC). (Фиг. 3В) высокая доза ( $1 \times 10^{12}$ ).

Фиг. 4А и Фиг. 4В демонстрируют активность hGAA в головном мозге мышей с болезнью Помпе (-/-) через четыре недели после внутривенного введения различных AAVhu68.hGAA, имеющих сконструированную кодирующую последовательность hGAAV780I под управлением промоторов CB6 (третья колонка), CAG (четвертая колонка) или UbC (последняя колонка). (Фиг. 4А) низкая доза ( $1 \times 10^{11}$  GC). (Фиг. 4В) высокая доза ( $1 \times 10^{12}$ ). Вектор, экспрессируемый под действием CB7, обладает более низкой активностью в обеих дозах, в то время как векторы, экспрессируемые под промоторами CAG или UbC, обладают сопоставимой активностью при более высокой дозе.

Фиг. 5А - Фиг. 5Н демонстрируют гистологию сердца у мышей с болезнью Помпе (ШИК-окрашивание демонстрирует накопление гликогена) через четыре недели после введения AAVhu68.hGAA. Были получены и проанализированы векторы rAAVhu68, содержащие пять разных экспрессионных кассет hGAA. Контрольные мыши с болезнью Помпе (-/-) (Фиг. 5D) и мыши дикого типа (+/+) (Фиг. 5А) получали инъекции ФСБ. «hGAA» относится к эталонному природному ферменту (hGAAV780), кодируемому последовательностью дикого типа с нативным сигнальным пептидом (Фиг. 5B). «BiP-vIGF2.hGAAco» относится к сконструированной кодирующей последовательности эталонного белка hGAAV780, содержащего делецию первых 35 АК, и дополнительно имеющей сигнальный пептид BiP, слияние с вариантом IGF2 с низкой аффинностью к рецептору инсулина (Фиг. 5C). (Фиг. 5D) Изображение, полученное от контроля, пролеченного носителем. «hGAAcoV780I» относится к варианту hGAAV780I, кодируемому сконструированной последовательностью и содержащему нативный сигнальный пептид (Фиг. 5E). «BiP-vIGF2.hGAAcoV780I» относится к hGAAcoV780I, содержащему делецию первых 35 АК, и дополнительно имеющему сигнальный пептид BiP, слитый с вариантом IGF2 с низкой аффинностью к рецептору инсулина, и hGAAV780I, кодируемому сконструированной последовательностью (Фиг. 5F). «Sp7.Δ8.hGAAcoV780I» относится к варианту hGAAV780I с делецией первых 35 АК, кодируемому той же сконструированной последовательностью, что и предыдущий конструктор, но содержащему последовательности, кодирующие сигнальный пептид B2 химотрипсиногена вместо нативного сигнального пептида (Фиг. 5G). (Фиг. 5H) Слепая гистопатологическая полуквантитативная оценка тяжести. Сертифицированный министерством здравоохранения США ветеринарный патологоанатом проанализировал

слайды в слепом режиме и определил степень тяжести заболевания на основе накопления гликогена и аутофагии.

Фиг. 6А - Фиг. 6Н демонстрируют результаты гистологии четырехглавой мышцы (ШИК-окрашивание) у мышей с болезнью Помпе через четыре недели после введения AAVhu68, кодирующего различные hGAA ( $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг). Контрольные мыши с болезнью Помпе (-/-) (Фиг. 6D) и мыши дикого типа (+/+) (Фиг. 6А) получали инъекции ФСБ. «hGAA» относится к эталонному природному ферменту (hGAAV780), кодируемому последовательностью дикого типа с нативным сигнальным пептидом (Фиг. 6B). «hGAAcoV780I» относится к варианту hGAAV780I, кодируемому сконструированной последовательностью и содержащему нативный сигнальный пептид (Фиг. 6E). «Sp7.Δ8.hGAAcoV780I» относится к варианту hGAAV780I с делецией первых 35 АК, кодируемому той же сконструированной последовательностью, что и предыдущий конструктор, но содержащему последовательности, кодирующие сигнальный пептид В2 химотрипсиногена вместо нативного сигнального пептида (Фиг. 6F). «BiP-vIGF2.hGAAco» относится к эталонному hGAAV780, содержащему делецию первых 35 АК, и дополнительно имеющему сигнальный пептид BiP, слияние с вариантом IGF2 с низкой аффинностью к рецептору инсулина, и кодируемому сконструированной последовательностью (Фиг. 6C). «BiP-vIGF2.hGAAcoV780I» относится к hGAAV780I, содержащему делецию первых 35 АК, и дополнительно имеющему сигнальный пептид BiP, слитый с вариантом IGF2 с низкой аффинностью к рецептору инсулина, и hGAAV780I, кодируемому сконструированной последовательностью (Фиг. 6G). (Фиг. 6H) Слепая гистопатологическая полуколичественная оценка тяжести. Сертифицированный министерством здравоохранения США ветеринарный патологоанатом проанализировал слайды в слепом режиме и определил степень тяжести заболевания на основе накопления гликогена и аутофагии. Оценка 0 означает отсутствие поражения; 1 означает поражение накоплением в среднем менее 9% мышечных волокон; 2 означает от 10 до 49%; 3 означает от 50 до 75%, и 4 означает от 76 до 100%.

Фиг. 7А - Фиг. 7Н демонстрируют результаты гистологии четырехглавой мышцы (окрашивание реагентом Шиффа-периодной кислотой (ШИК)) мышцей с болезнью Помпе через четыре недели после введения AAVhu68, кодирующего различные hGAA, при  $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг (т.е. в 10 раз более низкой дозе, чем на Фиг. 6А - Фиг. 6Н). Контрольные мыши с болезнью Помпе (-/-) (Фиг. 7D) и мыши дикого типа (+/+) (Фиг. 7А) получали инъекции ФСБ. «hGAA» относится к эталонному природному ферменту (hGAAV780), кодируемому последовательностью дикого типа с нативным сигнальным пептидом (Фиг. 7B). «hGAAcoV780I» относится к варианту hGAAV780I, кодируемому сконструированной последовательностью и содержащему нативный сигнальный пептид (Фиг. 7E). «Sp7.Δ8.hGAAcoV780I» относится к варианту hGAAV780I с делецией первых 35 АК, кодируемому той же сконструированной последовательностью, что и предыдущий конструктор, но содержащему последовательности, кодирующие сигнальный пептид В2 химотрипсиногена вместо нативного сигнального пептида (Фиг. 7F). «BiP-

vIGF2.hGAAco» относится к эталонному hGAAV780, содержащему делецию первых 35 АК, и дополнительно имеющему сигнальный пептид BiP, слияние с вариантом IGF2 с низкой аффинностью к рецептору инсулина, и кодируемому сконструированной последовательностью (Фиг. 7С). «BiP-vIGF2.hGAAcoV780I» относится к hGAAV780I, содержащему делецию первых 35 АК, и дополнительно имеющему сигнальный пептид BiP, слитый с вариантом IGF2 с низкой аффинностью к рецептору инсулина, и hGAAV780I, кодируемому сконструированной последовательностью (Фиг. 7G). (Фиг. 7H) Слепая гистопатологическая полуколичественная оценка тяжести. Сертифицированный министерством здравоохранения США ветеринарный патологоанатом проанализировал слайды в слепом режиме и определил степень тяжести заболевания на основе накопления гликогена и аутофагии. Оценка 0 означает отсутствие поражения; 1 означает поражение накоплением в среднем менее 9% мышечных волокон; 2 означает от 10 до 49%; 3 означает от 50 до 75%, и 4 означает от 76 до 100%.

Фиг. 8 демонстрирует результаты гистологии спинного мозга (окрашивание ШИК и люксолом прочным синим) для мышей с болезнью Помпе через четыре недели после введения ( $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг) AAVhu68, имеющего последовательность, кодирующую нативный hGAA или hGAAV780I, содержащие делецию первых 35 АК, и дополнительно имеющие сигнальный пептид BiP, слитый с вариантом IGF2 с низкой аффинностью к рецептору инсулина, и hGAAV780I, кодируемый сконструированной последовательностью («BiP-vIGF2.hGAAcoV780I»). Была проведена слепая гистопатологическая полуколичественная оценка тяжести по срезам спинного мозга.

Фиг. 9А - Фиг. 9С показывают активность hGAA в плазме и связывание с IGF2/CI-MPR. Мышам с болезнью Помпе вводили векторы, кодирующие hGAA дикого типа или BiP-vIGF2.hGAA в низкой дозе ( $2,5 \times 10^{12}$  GC). (Фиг. 9А, Фиг. 9В) Через четыре недели после внутривенного введения, в плазме были обнаружены высокие уровни активности hGAA дикого типа и сконструированного hGAA. (Фиг. 9С) сконструированный hGAA эффективно связывается с CI-MPR.

Фиг. 10 демонстрирует клиренс гликогена и рассасывание аутофагального накопления у мышей с болезнью Помпе через четыре недели после введения конструкторов AAVhu68 в дозе  $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг (низкая доза). Парафиновые срезы икроножных мышц окрашивали DAPI и антителами к LC3B.

Фиг. 11 изображает схематически конструктор BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmiR183.

Фиг. 12 показывает накопление гликогена (окрашивание ШИК, люксолом синим) в стволе головного мозга мышей с болезнью Помпе через четыре недели после внутривенного введения AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 (содержащего четыре копии последовательности ГЗК-нацеливающей последовательности, miR183) в высокой дозе (высокая доза:  $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг) или низкой дозе (низкая доза:  $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг). Стрелки указывают ШИК-положительное накопление в нейронах.

Фиг. 13 показывает накопление гликогена (окрашивание ШИК, люксолом синим) в спинном мозге мышей с болезнью Помпе через четыре недели после внутривенного

введения AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 в высокой дозе (высокая доза:  $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг) или низкой дозе (низкая доза:  $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг). Стрелки указывают ШИК-положительное накопление в нейронах.

Фиг. 14 показывает накопление гликогена (ШИК-окрашивание) в четырехглавой мышце мышей с болезнью Помпе через четыре недели после внутривенного введения AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 в высокой дозе (высокая доза:  $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг) или низкой дозе (низкая доза:  $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг).

Фиг. 15 показывает накопление гликогена (ШИК-окрашивание) в сердце мышей с болезнью Помпе через четыре недели после внутривенного введения AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 в высокой дозе (высокая доза:  $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг) или низкой дозе (низкая доза:  $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг).

Фиг. 16 показывает экспрессию маркера аутофагальных вакуолей LC3b в четырехглавой мышце мышей с болезнью Помпе через четыре недели после внутривенного введения AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 в высокой дозе (высокая доза:  $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг) или низкой дозе (низкая доза:  $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг).

Фиг. 17 демонстрирует репрезентативные изображения экспрессии hGAA (иммуногистохимия hGAA) в ГЗК шейного отдела макак-резусов через 35 дней после введения в большую цистерну AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I (слева) или AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 (справа) в высокой дозе, равной  $3 \times 10^{13}$  GC.

Фиг. 18 демонстрирует репрезентативные изображения экспрессии hGAA (иммуногистохимия к hGAA) в ГЗК поясничного отдела макак-резусов через 35 дней после введения в большую цистерну AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I (слева) или AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 (справа) в высокой дозе, равной  $3 \times 10^{13}$  GC.

Фиг. 19 демонстрирует репрезентативные изображения экспрессии hGAA (иммуногистохимия hGAA) в нижних двигательных нейронах спинного мозга макак-резусов через 35 дней после введения в большую цистерну AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I (слева) или AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 (справа) в высокой дозе, равной  $3 \times 10^{13}$  GC.

Фиг. 20 демонстрирует репрезентативные изображения экспрессии hGAA (иммуногистохимия hGAA) в сердце макак-резусов через 35 дней после введения в большую цистерну AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I (слева) или AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 (справа) в высокой дозе, равной  $3 \times 10^{13}$  GC.

Фиг. 21А - Фиг. 21С демонстрируют гистопатологическую оценку нейрональной дегенерации ГЗК и инфильтрации воспалительных клеток в ГЗК шейного сегмента (Фиг. 21А), грудного сегмента (Фиг. 21В) и поясничного сегмента (Фиг. 21С) у макак-резусов через 35 дней после введения ICM AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I или AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 в высокой дозе  $3 \times 10^{13}$  GC. Доставку

векторов AAVhu68 осуществляли инъекцией в общем объеме 1 мл стерильной искусственной СМЖ (носитель) в большую цистерну, под флюороскопическим контролем, как было описано ранее (Katz et al., Hum Gene Ther. Methods, 2018, 29:212-9). Сертифицированный министерством здравоохранения США ветеринарный патологоанатом в слепом режиме по отношению к группе, получавшей векторы, устанавливал степени тяжести, определенные как 0 для отсутствия поражения, 1 для минимального (<10%), 2 для умеренного (10-25%), 3 для среднего (25-50%), 4 для значительного (50-95%) и 5 для тяжелого (>95%). Каждая точка данных соответствует одному ГЗК. Проводилась оценка минимум пяти ГЗК на сегмент и на животное.

Фиг. 22А - Фиг. 22С демонстрируют уровни АСТ (Фиг. 22А), уровни АЛТ (Фиг. 22В) и количество тромбоцитов (Фиг. 22С) у макак-резусов после введения ICM AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I или AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 в высокой дозе  $3 \times 10^{13}$  GC.

Фиг. 23 показывает уровни активности hGAA в плазме у NHP (нечеловекообразные приматы), которым вводили в большую цистерну (ICM) AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I или AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 в высокой дозе, равной  $3 \times 10^{13}$  GC, в дни 0-35 после инъекции.

Фиг. 24А - Фиг. 24Г демонстрируют результаты определения скорости нервной проводимости в исходный момент времени и в день 35 у NHP, которым вводили (в большую цистерну,  $3 \times 10^{13}$  GC) AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I или AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183.

Фиг. 25А и Фиг. 25В изображают результаты долговременного наблюдения за массой тела после инъекции вектора (день 0) до 180 дней после инъекции у мышей с болезнью Помпе, которые получали лечение на поздней стадии заболевания в возрасте 7 месяцев и уже имели симптомы в начальный момент времени. Они получали AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I с использованием альтернативных путей введения и уровней доз: интрацеребровентрикулярно (ИЦВ) в высокой дозе (в.д.) ( $1 \times 10^{11}$  GC) или низкой дозе (н.д.) ( $5 \times 10^{10}$  GC), внутривенно (ВВ) в высокой дозе ( $5 \times 10^{13}$  GC/кг) или низкой дозе ( $1 \times 10^{13}$  GC/кг), и комбинацией ИЦВ и ВВ в низких дозах или высоких дозах. Изображены средние значения и стандартные отклонения. Статистический анализ для каждого момента времени проводили с использованием критерия Уилкоксона-Манна-Уитни между контрольными группами нокаут-ФСБ и другими группами. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

Фиг. 26 и Фиг. 27 изображают результаты долговременного наблюдения за силой схватывания относительно массы тела после инъекции вектора (день 0) до 180 дней после инъекции у мышей с болезнью Помпе, которые получали лечение на поздней стадии заболевания в возрасте 7 месяцев и уже имели симптомы в начальный момент времени. (Фиг. 26) Мыши получали AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I с помощью альтернативных путей введения и при различных уровнях доз: интрацеребровентрикулярно (ИЦВ) в высокой дозе (ИЦВ в.д.:  $1 \times 10^{11}$  GC), внутривенно

(IV) в высокой дозе (ВВ в.д.:  $5 \times 10^{13}$  GC/кг) и комбинации высоких доз ИЦВ и ВВ и низких доз ИЦВ и ВВ. Силу схватывания измеряли в разные моменты времени с использованием измерителя силы схватывания (ИТС Life Science). Преобразователь в измерителе силы схватывания соединен с проволочной сеткой, соединенной с анодированной опорной пластиной. Животное держат за хвост и осторожно перемещают над сеткой, пока оно не ухватится за сетку четырьмя лапами. Проводят три измерения силы схватывания, и среднее значение этих показателей представляет собой силу схватывания животного в данный момент времени. (Фиг. 27) Результаты в день 180, демонстрирующие прирост эффекта ВВ+ИЦВ в.д. по сравнению с ВВ в.д. Значения величин нормируют по массе тела животного. N=4 самца и 4 самки на группу. Статистический анализ в каждый момент времени определяли с помощью 1-факторного ANOVA (Фиг. 26) или 2-факторного ANOVA (Фиг. 27), тест множественных сравнений post-hoc по сравнению с контрольной группой нокаут-ФСБ. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Фиг. 28 демонстрирует накопление гликогена в четырехглавых мышцах, сердце и спинном мозге мышей с болезнью Помпе, у которых уже проявились симптомы, после ИЦВ введения высокой дозы (высокая доза:  $1 \times 10^{11}$  GC) или низкой дозы (низкая доза:  $5 \times 10^{10}$  GC) AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.

Фиг. 29 демонстрирует накопление гликогена в четырехглавых мышцах, сердце и спинном мозге мышей с болезнью Помпе, у которых уже проявились симптомы, после ИЦВ введения высокой дозы (высокая доза:  $5 \times 10^{13}$  GC/кг) или низкой дозы (низкая доза:  $1 \times 10^{13}$  GC/кг) AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.

Фиг. 30А - Фиг. 30С демонстрируют активность hGAA в плазме мышей с болезнью Помпе, которым вводили вектор AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I ВВ, ИЦВ, или ВВ и ИЦВ (двойной путь введения) в день 30 (Фиг. 30А), день 60 (Фиг. 30В) и день 90 (Фиг. 30С).

Фиг. 31 демонстрирует схему исследования по оценке единственного (ВВ или в большую цистерну) и двойного путей введения (ВВ+в большую цистерну) у NHP.

Фиг. 32А - Фиг. 32Н демонстрирует детектирование hGAA (Фиг. 32А и Фиг. 32С - плазма; Фиг. 32В и Фиг. 32D - CSF) и активность hGAA (Фиг. 32Е и Фиг. 32G - плазма; Фиг. 32F и Фиг. 32Н - CSF) после ВВ введения или введения в мозговую цистерну AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.

Фиг. 33А - Фиг. 33F демонстрируют гистопатологическую оценку нейрональной дегенерации ГЗК и инфильтрации воспалительных клеток в шейном сегменте (Фиг. 33А), грудном сегменте (Фиг. 33В) и поясничного сегмента (Фиг. 33С) и аксонопатии спинного мозга в шейном сегменте (Фиг. 33D), грудном сегменте (Фиг. 33Е) и поясничном сегменте (Фиг. 33F) у макак-резусов после ВВ ( $1 \times 10^{13}$  GC/кг или  $5 \times 10^{13}$  GC/кг), введения в большую цистерну ( $1 \times 10^{13}$  GC или  $3 \times 10^{13}$  GC) или ВВ+в большую цистерну ( $5 \times 10^{13}$  GC/кг ВВ+ $3 \times 10^{13}$  GC в большую цистерну или  $1 \times 10^{14}$  GC/кг ВВ+ $1 \times 10^{13}$  GC в большую цистерну) AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I. Сертифицированный министерством

здравоохранения США ветеринарный патологоанатом в слепом режиме по отношению к группе, получавшей векторы, устанавливал степени тяжести, определенные как 0 для отсутствия поражения, 1 для минимального (<10%), 2 для умеренного (10-25%), 3 для среднего (25-50%), 4 для значительного (50-95%) и 5 для тяжелого (>95%).

Фиг. 34 демонстрирует активность GAA в плазме у макак-резусов после ВВ ( $1 \times 10^{13}$  GC/кг или  $5 \times 10^{13}$  GC/кг), в большую цистерну ( $1 \times 10^{13}$  GC или  $3 \times 10^{13}$  GC) или ВВ+в большую цистерну ( $5 \times 10^{13}$  GC/кг ВВ+ $3 \times 10^{13}$  GC в большую цистерну) AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.

Фиг. 35А - Фиг. 35D демонстрируют измерения активности GAA в печени и сердце (Фиг. 35А) и диафрагме, трицепсах и передней большеберцовой мышце (Фиг. 35В) у макак-резусов после ВВ ( $1 \times 10^{13}$  GC/кг или  $5 \times 10^{13}$  GC/кг), в большую цистерну ( $1 \times 10^{13}$  GC или  $3 \times 10^{13}$  GC) или ВВ+в большую цистерну ( $5 \times 10^{13}$  GC/кг ВВ+ $3 \times 10^{13}$  GC в большую цистерну) AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAA.coV780I.

Фиг. 36 демонстрирует титры антител к GAA в сыворотке у макак-резусов после ВВ ( $1 \times 10^{13}$  GC/кг или  $5 \times 10^{13}$  GC/кг), в большую цистерну ( $1 \times 10^{13}$  GC или  $3 \times 10^{13}$  GC) или ВВ+в большую цистерну ( $5 \times 10^{13}$  GC/кг ВВ+ $3 \times 10^{13}$  GC в большую цистерну) AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAA.coV780I.

Фиг. 37 демонстрирует репрезентативные изображения экспрессии hGAA (иммуногистохимия к hGAA) в четырехглавой мышце, сердце и спинном мозге макак-резусов после введения низкой дозы (IV-  $1 \times 10^{13}$  GC/кг, ICM-  $1 \times 10^{13}$  GC) AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.

Фиг. 38 демонстрирует анализ активности GAA и накопления гликогена (ШИК-окрашивание) в четырехглавых мышцах и сердце мышей с болезнью Помпе через четыре недели после внутривенного введения BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 (AAV.hGAAeng) или hGAAV780I, кодируемого последовательностью дикого типа, содержащей природный сигнальный пептид (AAV.hGAAnat) в высокой дозе (высокая доза:  $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг).

Фиг. 39 демонстрирует анализ активности GAA и накопления гликогена (ШИК-окрашивание) в ЦНС мышей с болезнью Помпе через четыре недели после внутривенного введения BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 (AAV.hGAAeng) или hGAAV780I, кодируемого последовательностью дикого типа, содержащей природный сигнальный пептид (AAV.hGAAnat) в высокой дозе (высокая доза:  $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг).

Фиг. 40 демонстрирует иллюстративные изображения экспрессии hGAA (иммуногистохимия для hGAA) в четырехглавой мышце, сердце и спинном мозге мышей с болезнью Помпе через четыре недели после внутривенного введения BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4XmiR183 (IV  $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг).

Фиг. 41 демонстрирует исследовательский обзор для исследования, оценивающего лечение мышей с болезнью Помпе до появления симптомов (молодых), которое включает ВВ введение различных доз AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183.

Фиг. 42 демонстрирует иллюстративные иммунофлуоресцентные изображения

срезов четырехглавых мышц от молодых, ДТ, контрольных, GAA -/- мышей, которым вводили ФСБ, и мышей GAA -/-, которым вводили AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183. WGA (клеточная мембрана), DAPI (ядро) и антитело LC3b (аутофагосома).

Фиг. 43 демонстрирует количественное определение центральных ядер в четырехглавой мышце молодых мышей с болезнью Помпе, которым вводили AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183.

Фиг. 44 демонстрирует количественное определение повышения аутофагии после окрашивания LC3b в четырехглавой мышце молодых мышей с болезнью Помпе, которым вводили AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183.

Фиг. 45 демонстрирует количественное определение диаметра мышечных волокон в четырехглавой мышце молодых мышей с болезнью Помпе, которым вводили AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183.

Фиг. 46А - Фиг. 46F демонстрирует полуколичественную оценку лизосомной патологии накопления в мышцах (тяжесть вакуолизации) после ВВ введения различных доз AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183 в камбаловидной мышце (Фиг. 46А), диафрагме (Фиг. 46В), четырехглавых мышцах (Фиг. 46С), трицепсах (Фиг. 46D), икроножной мышце (Фиг. 46Е) и передней большеберцовой мышце (Фиг. 46F). Квадраты для самцов, кружки для самок. Статистика: однофакторный ANOVA (критерий Краскела-Уоллиса) после теста множественных сравнений post hoc Дана. Звездочки показывают значимость по сравнению с группой с болезнью Помпе GAA KO (вторая колонка). Оценка: доли мышечных волокон с вакуолями - 0:0%, 1:1 до 9%, 2:10 до 24%, 3:25 до 49%, 4:50 до 74% и 5:>5%.

Фиг. 47 представлен дизайн исследования для оценки путей введения ВВ, ИЦВ и ВВ+ИЦВ нокаутным мышам GAA с болезнью Помпе.

Фиг. 48 демонстрирует иллюстративные иммунофлуоресцентные изображения срезов четырехглавых мышц от контрольных, GAA -/- мышей ДТ в возрасте 6-7 месяцев, которым вводили ФСБ, и мышей GAA -/-, которым вводили AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183. WGA (клеточная мембрана), DAPI (ядро) и антитело LC3b (аутофагосома).

Фиг. 49 демонстрирует количественное определение центральных ядер в четырехглавой мышце мышей с болезнью Помпе, у которых уже появились симптомы, которым вводили AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183.

Фиг. 50 демонстрирует количественное определение повышения аутофагии после окрашивания LC3b ткани четырехглавой мышцы от мыши GAA KO после ВВ, ИЦВ и ВВ+ИЦВ введения AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.rBG.

Фиг. 51 демонстрирует распределение размера мышечных волокон у нокаутных мышей GAA с болезнью Помпе после ВВ, ИЦВ и ВВ+ИЦВ введения AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.rBG. Диаметр волокон распределяли на классы S=малый (<30 мкм), M=средний (30-50 мкм) и L=большой (> 50 мкм).

Фиг. 52 демонстрирует количественное определение двигательных нейронов, экспрессирующих hGAA, в сегментах спинного мозга после ВВ введения, введения в большую цистерну (ICM) или ВВ и в большую цистерну (ICM) вектора AAVhu68.CAG.BiP-IGF2-hGAAcoV780I нечеловекообразным приматам.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены композиции для доставки слитого белка, содержащего сигнальный пептид и пептид vIGF2, слитый с по меньшей мере активной частью фермента hGAA780I, пациентам с болезнью Помпе. Способы их изготовления и применения описаны в данном документе, включая схемы лечения пациентов такими композициями.

Используемый в данном документе термин «болезнь Помпе», которая также называется дефицитом мальтазы, болезнью накопления гликогена типа II (GSDII) или гликогенозом типа II, предназначен для обозначения генетического расстройства лизосомального накопления, характеризующегося полным отсутствием или частичным дефицитом лизосомального фермента кислой альфа-глюкозидазы (GAA), вызываемым мутациями гена GAA, который кодирует кислую  $\alpha$ -глюкозидазу. Этот термин включает, без ограничений, формы заболевания с ранним и поздним началом, включая, без ограничений, инфантильную, ювенильную, и болезнь Помпе у взрослых.

Следует понимать, что греческая буква «альфа» и символ « $\alpha$ » используются взаимозаменяемо в данном описании изобретения. Аналогично, греческая буква «дельта» и « $\Delta$ » используются взаимозаменяемо в данном описании изобретения.

Используемый в данном документе термин «кислая  $\alpha$ -глюкозидаза» или «GAA» относится к лизосомальному ферменту, который гидролизует  $\alpha$ -1,4 связи между D-глюкозными звеньями гликогена, мальтозы и изомальтозы. Альтернативные названия включают, без ограничений, лизосомальную  $\alpha$ -глюкозидазу (EC:3.2.1.20); глюкоамилазу; 1,4- $\alpha$ -D-глюкан-глюкогидролазу; амилоглюкозидазу; гамма-амилазу и экзо-1,4- $\alpha$ -глюкозидазу. Кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека кодируется геном GAA (NCBI (Национальный центр биотехнологической информации (National Centre for Biotechnology Information)) ID гена 2548), который был картирован на длинном плече хромосомы 17 (локус 17q25.2-q25.3). Консервативный гексапептид WIDMNE в аминокислотных остатках 516-521 необходим для активности белка кислой  $\alpha$ -глюкозидазы. Термин «hGAA» относится к кодирующей последовательности человеческой GAA.

При использовании в данном документе, «pAAB.hGAA» относится к pAAB, имеющему капсид AAB, в который упакован геном вектора, содержащий, как минимум, кодирующую последовательность фермента GAA (например, вариант 780I, слитый белок, содержащий сигнальный пептид и пептид vIGF2, слитый с по меньшей мере активной частью фермента hGAA780I). rAAVhu68.hGAA или rAAVhu68.hGAA относятся к pAAB, в котором капсид AAB представляет собой капсид AAVhu68, как определено в данном документе.

Со ссылкой на нумерацию полноразмерной hGAA, в аминокислотных положениях 1-27 расположен сигнальный пептид. Кроме того, указанный фермент ассоциирован со

множеством зрелых белков, таких как зрелый белок в аминокислотных положениях 70-952, зрелый белок размером 76 кДа, расположенный в аминокислотных положениях 123-952, и зрелый белок размером 70 кДа в аминокислотных положениях 204-952. «Активный каталитический сайт» содержит гексапептид WIDMNE (аминокислотные остатки 516-521 SEQ ID №: 3). В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть выбран более длинный фрагмент, например, положения 516-616. Другие активные сайты включают лигандсвязывающие сайты, которые могут быть расположены в одной или нескольких из позиций 376, 404, 405, 441, 481, 516, 518, 519, 600, 613, 616, 649, 674.

Если не указано иное, термин «hGAA780I» или «hGAAV780I» относится к полноразмерному препробелку, имеющему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID №: 3. В некоторых случаях, термин hGAAco780I или hGAAcoV780I используется для обозначения сконструированной последовательности, кодирующей hGAA780I. По сравнению с эталонным белком hGAA, описанным в предыдущем абзаце, hGAA780I имеет изолейцин (Ile или I) в положении 780, где эталонный hGAA содержит валин (Val или V). Неожиданно было обнаружено, что такой hGAA780I имеет лучший эффект и улучшенный профиль безопасности по сравнению с последовательностью hGAA, имеющей валин в положении 780 (hGAAV780), которая была широко описана в литературе как «эталонная последовательность». Например, как показано на Фиг. 5А - Фиг. 5Н, эталонная последовательность hGAAV780 индуцирует токсичность (фиброзирующий кардиомиозит), не наблюдающуюся при такой же дозе фермента hGAA780I. Таким образом, использование hGAA780I может ослаблять или устранять фиброзирующий кардиомиозит у пациентов, получающих терапию hGAA. Положение сигнального пептида, зрелого белка, активных каталитических сайтов и сайтов связывания hGAA может быть определено на основании аналогичного положения в hGAA780I, представленной в SEQ ID №: 3, т.е. сигнальный пептид в аминокислотных положениях 1-27; зрелый белок в аминокислотных положениях 70-952; зрелый белок размером 76 кДа, расположенный в аминокислотных положениях 123-952, и зрелый белок размером 70 кДа в аминокислотных положениях 204-952; «активный каталитический сайт», содержащий гексапептид WIDMNE (SEQ ID №: 61) в аминокислотных положениях 516-521; другие активные сайты включают лиганд-связывающие сайты, которые могут быть расположены в одном или более из положений 376, 404..405, 441, 481, 516, 518..519, 600, 613, 616, 649, 674.

В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть выбран hGAA780I, который содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична hGAA780I, по меньшей мере на 97% идентична hGAA780I или по меньшей мере на 99% идентична hGAA780I SEQ ID №: 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается последовательность, которая является по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 99% идентичной зрелому белку hGAA780I SEQ ID №: 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность, имеющая от по меньшей мере 95% до по меньшей мере 99%

идентичности с hGAA780I, содержит последовательность активного каталитического сайта, сохраненную без каких-либо изменений. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность, имеющая от по меньшей мере 95% до по меньшей мере 99% идентичности с hGAA780I SEQ ID №: 3, характеризуется наличием улучшенного биологического эффекта и лучшего профиля безопасности, чем эталонный hGAAV780, при тестировании на соответствующих животных моделях. В некоторых вариантах осуществления изобретения анализ активности GAA может быть проведен, как было описано ранее (см., например, J. Hordeaux, et. al., *Acta Neuropathological Communications*, (2107) 5: 66) или с использованием других пригодных способов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент hGAA780I содержит модификации в других позициях аминокислотной последовательности hGAA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такой мутант hGAA780I может сохранять, как минимум, активный каталитический сайт: WIDMNE (SEQ ID №: 61) и аминокислоты в области 780I, как описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления изобретения представлен новый слитый белок hGAA780I, который содержит лидерный пептид, отличный от нативного сигнального пептида hGAA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такой экзогенный лидерный пептид предпочтительно имеет человеческое происхождение и может включать, например, лидерный пептид IL-2. Конкретные экзогенные сигнальные пептиды, применимые в определенных вариантах осуществления изобретения, включают аминокислоты 1-20 химотрипсиногена B2, сигнальный пептид альфа-1-антитрипсина человека, аминокислоты 1-25 идуронат-2-сульфатазы, и аминокислоты 1-23 ингибитора протеазы C1. См., например, WO2018046774. Другие сигнальные/лидерные пептиды могут нативно присутствовать, в частности, в иммуноглобулине (например, IgG), цитокине (например, IL-2, IL12, IL18 и т.п.), инсулине, альбумине,  $\beta$ -глюкуронидазе, щелочной протеазе, или секреторных сигнальных пептидах фибронектина. См., также, например, [signalpeptide.de/index.php?m=listspdb\\_mammalia](http://signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia).

Такой химерный hGAA780I может иметь экзогенный лидерный пептид вместо полного нативного сигнального пептида размером 27 АК. Необязательно, N-концевое усечение фермента hGAA780I может касаться только части сигнального пептида (например, делеция от примерно 2 до примерно 25 аминокислот, или промежуточных значений в указанном диапазоне), всего сигнального пептида или фрагмента большей длины, чем сигнальный пептид (например, до аминокислоты 70, по нумерации SEQ ID №: 3. Необязательно, такой фермент может содержать C-концевое усечение длиной около 5, 10, 15 или 20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается новый слитый белок, который содержит зрелый белок hGAA780I (АК 70-952), зрелый белок массой 70 кДа (АК 123-952) или зрелый белок массой 76 кДа (АК 204-952), связанный с партнером по слиянию. Необязательно, слитый белок дополнительно содержит сигнальный пептид, являющийся ненативным для hGAA. Дополнительно, необязательно,

один из этих вариантов осуществления изобретения может дополнительно содержать С-концевое усечение около 5, 10, 15 или 20 аминокислот в длину.

В некоторых вариантах осуществления изобретения слитый белок, содержащий белок hGAA780I, содержит по меньшей мере аминокислоты 204-890 из SEQ ID №: 3 (hGAA780I), или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей, которая содержит Ile в положении 780. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок hGAA780I содержит по меньшей мере аминокислоты 204-952 из SEQ ID №: 3, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей, которая содержит Ile в положении 780. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок hGAA780I содержит по меньшей мере аминокислоты 123-890 из SEQ ID №: 3, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей, которая содержит Ile в положении 780. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент hGAA780I содержит по меньшей мере аминокислоты 70-952 из SEQ ID №: 3, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей, которая содержит Ile в положении 780. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок hGAA780I содержит по меньшей мере аминокислоты 70-890 из SEQ ID №: 3, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей, которая содержит Ile в положении 780.

В некоторых вариантах осуществления изобретения слитый белок содержит сигнальную и лидерную последовательности и последовательность hGAA780I, идентичную по меньшей мере на 95%, идентичную по меньшей мере на 97% или идентичную по меньшей мере на 99% SEQ ID №: 7, не имеет изменений в активном сайте и/или не имеет изменений в аминокислотах 3-12 N-конца и/или С-конца по сравнению с активным сайтом. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, сконструированная экспрессионная кассета hGAA кодирует по меньшей мере фрагмент hGAA780I человека, состоящий из: T - Val(V) - P - Ile (780I) - Glu(E) - Ala(A) - Leu(L) (SEQ ID №: 62). В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированная экспрессионная кассета hGAA кодирует более длинный фрагмент hGAA780I человека: Gln (Q) - T - V - P - 780I - E - A - L - Gly (G) (SEQ ID №: 63). В некоторых вариантах осуществления изобретения сконструированная экспрессионная кассета hGAA кодирует фрагмент, соответствующий по меньшей мере последовательности: последовательность PLGT - Trp (W) - Tyr (Y) - Asp (D) - LQTVP - 780I - EALG - (Ser или S) - L - PPPPAA (SEQ ID №: 64). Аналогично, в предпочтительных вариантах осуществления изобретения в активном сайте связывания отсутствуют изменения аминокислот (AK 518-521 SEQ ID №: 3). В некоторых вариантах осуществления изобретения, сайты связывания в положениях 600, 616 и/или 674 остаются без изменений. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный слитый белок содержит сигнальный пептид, необязательный выступ vIGF+2GS, необязательный протеолитический пептид эндоплазматического ретикулума (ЭР) и вариант hGAA780I с делецией первых 35 аминокислот hGAA (т.е. без нативного сигнального пептида и аминокислот 28-35).

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается секретируемый сконструированный GAA, который содержит сигнальный пептид BiP, выступ IGF2+2GS и аминокислоты 61-952 hGAA 780I (с делецией аминокислот 1-60 hGAA780I). В некоторых вариантах осуществления изобретения, в данном документе предусматривается слитый белок, содержащий SEQ ID №: 6 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, слитый белок кодируется SEQ ID №: 7 или последовательностью, по меньшей мере на 95% идентичной ей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, слитый белок содержит последовательность SEQ ID №: 4 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, слитый белок содержит последовательность SEQ ID №: 5 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей.

*Компоненты слитых белков, предусматриваемых в данном документе, дополнительно описаны ниже.*

#### *Пептиды, связывающие CI-MPR*

В данном документе предусматриваются пептиды, которые связывают CI-MPR (например, пептиды vIGF2). Слитые белки, содержащие такие пептиды и белок hGAA780I, при экспрессии из вектора для генной терапии, нацеливают hGAA780I на нуждающиеся в нем клетки, увеличивает клеточное поглощение такими клетками и направляет субклеточную локализацию терапевтического белка (например, в лизосомы). В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид сливают с N-концом белка hGAA780I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид сливают с C-концом белка hGAA780I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид представляет собой пептид vIGF2. Некоторые пептиды vIGF2 сохраняют высокую аффинность связывания с CI-MPR, в то время как их аффинность к рецептору IGF1, рецептору инсулина и IGF-связывающим белкам (IGFBP) снижается или исчезает. Таким образом, некоторые варианты пептидов IGF2 являются значительно более селективными и имеют пониженные риски, связанные с безопасностью, по сравнению с IGF2 дикого типа. Пептиды vIGF2 в данном документе включают пептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID №: 46. Варианты пептидов IGF2 дополнительно включают пептиды с вариантами аминокислот в положениях 6, 26, 27, 43, 48, 49, 50, 54, 55 или 65 по сравнению с IGF2 дикого типа (SEQ ID №: 34). В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, имеющую одну или несколько замен из группы, состоящей из E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R и K65R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену E6R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену F26S. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену Y27L. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену V43L. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену F48T. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену R49S. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену S50I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену A54R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену L55R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену K65R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет последовательность, содержащую замену E6R, F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R и L55R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию одной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию двух аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию трех аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию четырех аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию четырех аминокислот и замену E6R, Y27L и K65R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию четырех аминокислот и замену E6R и Y27L. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию пяти аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию шести аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию семи аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид vIGF2 имеет N-концевую делецию семи аминокислот и замену Y27L и K65R.

Аминокислотные последовательности IGF2 (варианты остатков выделены подчеркиванием)		
Пептид	Последовательность	SEQ ID №:
Дикого типа	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASR VSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	32
F26S	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASR VSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	33
Y27L	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASR VSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	34
V43L	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASR VSRRSRGILEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	35

F48T	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASR VSRRSRGIVEECCTRSCDLALLETYCATPAKSE	36
R49S	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASR VSRRSRGIVEECCFSSCDLALLETYCATPAKSE	37
S50I	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASR VSRRSRGIVEECCFRICDLALLETYCATPAKSE	38
A54R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASR VSRRSRGIVEECCFRSCDLRALLETYCATPAKSE	39
L55R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASR VSRRSRGIVEECCFRSCDLARALLETYCATPAKSE	40
F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGSLFSRPASR VSRRSRGILEECCTSICDLRALLETYCATPAKSE	41
Δ1-6, Y27L, K65R	TLCGGELVDTLQFVCGΓ3KFLFSRPASRVSRRSRG IVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	42
Δ1-7, Y27L, K65R	LCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRG IVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	43
Δ1-4, E6R, Y27L, K65R	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRR SRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	44
Δ1-4, E6R, Y27L	SRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRR SRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	45
E6R	AYRPSRTLCCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASR VSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	46
Кодирующие последовательности ДНК IGF2		
Пептид	Последовательность ДНК	SEQ ID №
Зрелый IGF2 дикого типа	GCTTACCGCCCCAGTGAGACCCTGTGCGGCGG GGAGCTGGTGGACACCCTCCAGTTCGTCTGTG GGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCA AGCCGTGTGAGCCGTCGCAGCCGTGGCATCGT TGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGC CCTCCTGGAGACGTA CTGTGCTACCCCGCCAA GTCCGAG	47
vIGF2 Δ1-4, E6R, Y27L, K65R	TCTAGA AACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGA CACTCTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTT	48

	CCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAGTTTCACG GAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGGAGTGTGT TCAGGTCCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCT ATTGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAA	
--	--	--

*Сигнальные пептиды*

Композиции, предусматриваемые в данном документе, в некоторых вариантах осуществления, дополнительно содержат сигнальный пептид, который улучшает секрецию hGAA780I из клетки, трансдуцированной конструктом для генной терапии. Сигнальный пептид в некоторых вариантах осуществления улучшает процессинг терапевтических белков и способствует транслокации образующегося комплекса полипептид-рибосома в эндоплазматический ретикулум (ER) и обеспечивает надлежащие котрансляционные и посттрансляционные модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид расположен (i) перед сигнальной последовательностью инициации трансляции, (ii) между последовательностью инициации трансляции и терапевтическим белком, или (iii) после терапевтического белка. Сигнальные пептиды, пригодные для использования в конструктах для генной терапии, включают, без ограничений, сигнальный пептид связывающего иммуноглобулинового белка (ViP) из семейства белков HSP70 (например, HSPA5, член 5 семейства А белков теплового шока) и сигнальные пептиды гауссии (*Gaussia*) и их варианты. Такие сигнальные пептиды обладают сверхвысокой аффинностью к частице узнавания сигнала. Примеры аминокислотных последовательностей ViP и *Gaussia* приведены в таблице ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 49-53. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид отличается от последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 49-53, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше аминокислотами, или 1 аминокислотой.

Последовательности сигнальных пептидов		
Сигнальный пептид	Аминокислотная последовательность	SEQ ID №:
Нативный человеческий ViP	MKLSLVAAMLLLLSAARA	49
Модифицированный ViP-1	MKLSLVAAMLLLLSLVAAMLLLLSAARA	50
Модифицированный ViP-2	MKLSLVAAMLLLLWVALLLLLSAARA	51
Модифицированный ViP-3	MKLSLVAAMLLLLSLVALLLLLSAARA	52
Модифицированный ViP-4	MKLSLVAAMLLLLALVALLLLLSAARA	53
Гауссия ( <i>Gaussia</i> )	MGVKVLFALICIAVAEA	54

Сигнальный пептид гауссии получен из люциферазы гауссии превосходной (*Gaussia princeps*) и направляет повышенный синтез белка и секрецию терапевтических

белков, слитых с этим сигнальным пептидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид гауссии (*Gaussia*) имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID №: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид отличается от SEQ ID №: 54 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше аминокислотами, или 1 аминокислотой. *Линкеры*

Композиции, представленные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления изобретения содержат линкер между нацеливающим пептидом и терапевтическим белком. Такие линкеры, в некоторых вариантах осуществления, поддерживают правильное расстояние и смягчают стерические несоответствия между пептидом vIGF2 и терапевтическим белком. Линкеры, в некоторых вариантах осуществления, содержат повторы остатков глицина, повторы остатков глицина-серина и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер состоит из 5-20 аминокислот, 5-15 аминокислот, 5-10 аминокислот, 8-12 аминокислот, или примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислот. Пригодные линкеры включают, без ограничений, представленные в следующей таблице:

Линкерные последовательности	
Последовательность	SEQ ID №:
GGGGSGGGG	55
GGGGS	56
GGSGGGGS	57
GGGGSGGGS	58
GGSGSGSTS	59
GGGGSGGGGS	60

В данном описании изобретения различные экспрессионные кассеты, геномы векторов, векторы и композиции описаны как содержащие кодирующую последовательность hGAA780I или белок hGAA780I или слитый белок. Следует понимать, что, если не указано иное, любые сконструированные белки hGAA780I, включая N-концевое усечение, C-концевые усечения и слитые белки, такие как описанные в данном документе, или их кодирующие последовательности, могут быть аналогично встроены в экспрессионные кассеты, геномы векторов, векторы и композиции.

Соответственно, предусматривается экспрессионная кассета, которая содержит последовательность нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

#### *Экспрессионная кассета*

В контексте данного изобретения, «экспрессионная кассета» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный генный продукт, функционально связанный с регуляторными последовательностями, которые направляют его экспрессию в промотор клетки-мишени (например, кодирующую последовательность слитого белка hGAA780I), и

может включать другие его регуляторные последовательности. Регуляторные последовательности, очевидно, функционально связаны с кодирующей последовательностью слитого белка hGAA780I таким образом, чтобы это обеспечивало его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке-мишени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионная кассета может включать одну или несколько последовательностей микроРНК-мишеней в нетранслируемой области (областях). Последовательности микроРНК-мишеней сконструированы таким образом, чтобы они специфически распознавались микроРНК, присутствующей в клетках, в которых экспрессия трансгена является нежелательной и/или желательны пониженные уровни экспрессии трансгена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионная кассета включает последовательности-мишени микроРНК, которые специфически снижают экспрессию слитого белка hGAA780I в ганглиях задних корешков. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательности-мишени микроРНК расположены в 3'-НТО (нетранслируемая область), 5'-НТО и/или в обоих 3'- и 5'-НТО. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионная кассета содержит по меньшей мере два тандемных повтора специфических для ганглиев задних корешков (ГЗК) последовательностей микроРНК-мишени, причем указанные по меньшей мере два тандемных повтора включают по меньшей мере первую последовательность-мишень микроРНК и по меньшей мере вторую последовательность-мишень микроРНК, которые могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, начало первого из по меньшей мере двух тандемных повторов ГЗК-специфической микроРНК находится в пределах 20 нуклеотидов от 3'-конца кодирующей последовательности слитого белка hGAA780I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, начало первого из по меньшей мере двух тандемных повторов ГЗК-специфической микроРНК находится на расстоянии по меньшей мере 100 нуклеотидов от 3'-конца кодирующей последовательности слитого белка hGAA780I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тандемные повторы микроРНК имеют длину от 200 до 1200 нуклеотидов. В определенном варианте осуществления изобретения, включение miR-мишеней не модифицирует экспрессию или эффективность терапевтического трансгена в одной или нескольких тканях-мишенях, по сравнению с экспрессионной кассетой или геномом вектора, не содержащими последовательностей-мишеней микроРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, геном вектора или экспрессионная кассета содержат по меньшей мере одну последовательность-мишень микроРНК, которая представляет собой последовательность-мишень miR-183. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторный геном или экспрессионная кассета содержит целевую последовательность miR-183, которая включает AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (SEQ ID №: 26), причем указанная последовательность, комплементарная затравочной последовательности miR-183, подчеркнута. В определенных вариантах осуществления изобретения геном вектора или

кассета экспрессии содержат более одной копии (например, две или три копии) последовательности, которая на 100% комплементарна затравочной последовательности miR-183. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность-мишень miR-183 имеет длину от около 7 нуклеотидов до около 28 нуклеотидов и включает по меньшей мере одну область, которая по меньшей мере на 100% комплементарна затравочной последовательности miR-183. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность-мишень miR-183 содержит последовательность с частичной комплементарностью SEQ ID №: 26 и, таким образом, при выравнивании с SEQ ID №: 26 наблюдается одно или несколько несоответствий. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень miR-183 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 несовпадений при выравнивании с SEQ ID №: 26, причем указанные несоответствия могут быть несмежными. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность-мишень miR-183 содержит область 100% комплементарности, которая также составляет по меньшей мере 30% длины последовательности-мишени miR-183. В определенных вариантах осуществления изобретения область 100% комплементарности содержит последовательность со 100% комплементарностью к затравочной последовательности miR-183. В определенных вариантах осуществления изобретения оставшая часть последовательности-мишени miR-183 имеет по меньшей мере от около 80% до около 99% комплементарности с miR-183. В определенных вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии или геном вектора включает последовательность-мишень miR-183, которая содержит усеченную SEQ ID №: 26, т.е. последовательность с отсутствующими по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидами на любом из или на обоих 5'- или 3'-концах SEQ ID №: 26. В определенных вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии или геном вектора содержит трансген и одну последовательность-мишень miR-183. В других вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии или геном вектора содержит по меньшей мере две, три или четыре последовательности-мишени miR-183. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета или векторный геном содержит по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь или по меньшей мере восемь целевых последовательностей miR-183. В некоторых вариантах осуществления изобретения включение двух, трех или четырех целевых последовательностей miR-183 в экспрессионной кассете или векторном геноме приводит к повышению уровней трансгенной экспрессии в целевой ткани, такой как сердце.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, геном вектора или экспрессионная кассета содержат по меньшей мере одну последовательность-мишень микроРНК, которая представляет собой последовательность-мишень miR-182. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторный геном или экспрессионная кассета содержит последовательность-мишень miR-182, которая включает AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA (SEQ ID №: 27). В определенных вариантах

осуществления изобретения геном вектора или кассета экспрессии содержат более одной копии (например, две или три копии) последовательности, которая на 100% комплементарна затравочной последовательности miR-182. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность-мишень miR-182 имеет длину от около 7 нуклеотидов до около 28 нуклеотидов и включает по меньшей мере одну область, которая по меньшей мере на 100% комплементарна затравочной последовательности miR-182. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность-мишень miR-182 содержит последовательность с частичной комплементарностью SEQ ID №: 27 и, таким образом, при выравнивании с SEQ ID №: 27 наблюдается одно или несколько несоответствий. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень miR-183 содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 несовпадений при выравнивании с SEQ ID №: 27, причем указанные несоответствия могут быть несмежными. В определенных вариантах осуществления изобретения последовательность-мишень miR-182 содержит область 100% комплементарности, которая также составляет по меньшей мере 30% длины последовательности-мишени miR-182. В определенных вариантах осуществления изобретения область 100% комплементарности содержит последовательность со 100% комплементарностью к затравочной последовательности miR-182. В определенных вариантах осуществления изобретения остальная часть последовательности-мишени miR-182 имеет по меньшей мере от около 80% до около 99% комплементарности с miR-182. В определенных вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии или геном вектора включает последовательность-мишень miR-182, которая содержит усеченную SEQ ID №: 27, т.е. последовательность с отсутствующими по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидами на любом из или на обоих 5'- или 3'-концах SEQ ID №: 27. В определенных вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии или геном вектора содержит трансген и одну последовательность-мишень miR-182. В других вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии или геном вектора содержит по меньшей мере две, три или четыре последовательности-мишени miR-182.

Термин «тандемные повторы» используется в данном документе для обозначения присутствия двух или более последовательных последовательностей-мишеней микроРНК. Такие последовательности-мишени микроРНК могут быть непрерывными, т.е. расположенными непосредственно друг за другом таким образом, чтобы 3'-конец одной находился непосредственно перед 5'-концом следующей, без каких-либо промежуточных последовательностей, или наоборот. В другом варианте осуществления изобретения две или более последовательностей-мишеней микроРНК разделены короткой спейсерной последовательностью.

В контексте данного изобретения, «спейсер» обозначает любую выбранную последовательность нуклеиновой кислоты, например, состоящую из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов в длину, которая расположена между двумя или более последовательно расположенными последовательностями-мишенями микроРНК. В

определенных вариантах осуществления изобретения спейсер имеет длину от 1 до 8 нуклеотидов, длину от 2 до 7 нуклеотидов, длину от 3 до 6 нуклеотидов, длину в четыре нуклеотида, длину от 4 до 9 нуклеотидов, от 3 до 7 нуклеотидов или длину большей величины. Подходящий спейсер представляет собой некодирующую последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсер может состоять из четырех (4) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсер представляет собой GGAT. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсер состоит из шести (6) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, спейсер представляет собой CACGTG или GCATGC.

В определенных вариантах осуществления изобретения тандемные повторы содержат две, три, четыре или более одинаковых последовательностей-мишеней микроРНК. В определенных вариантах осуществления изобретения тандемные повторы содержат по меньшей мере две разные последовательности-мишени микроРНК, по меньшей мере три разные последовательности-мишени микроРНК или по меньшей мере четыре разные последовательности-мишени микроРНК и т.д. В определенных вариантах осуществления изобретения тандемные повторы могут содержать две или три одинаковых последовательностей-мишеней микроРНК и четвертую последовательность-мишень микроРНК, которая отличается. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета или векторный геном включает комбинацию по меньшей мере одной, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех или по меньшей мере четырех целевых последовательностей miR183 и по меньшей мере одной, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех или по меньшей мере четырех целевых последовательностей miR182.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионная кассета может содержать по меньшей мере два разных набора тандемных повторов. Например, 3'-НТО может содержать тандемный повтор непосредственно после трансгена, последовательностей НТО, и два или более тандемных повторов ближе к 3' концу НТО. В другом примере 5'-НТО может содержать одну, две или более последовательностей-мишеней микроРНК. В другом примере 3' может содержать тандемные повторы, а 5'-НТО может содержать по меньшей мере одну последовательность-мишень микроРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионная кассета содержит две, три, четыре или больше тандемных повторов, которые начинаются в пределах примерно 0-20 нуклеотидов от стоп-кодона трансгена. В других вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии содержит тандемные повторы микроРНК по меньшей мере от 100 до около 4000 нуклеотидов из стоп-кодона трансгена.

См. международную патентную заявку № PCT/US19/67872, поданную 20 декабря 2019 г. и на данный момент опубликованную как WO 2020/132455, которая заявляет приоритет по предварительной патентной заявке США № 62/783,956, поданной 21 декабря 2018 г., которые включены в данный документ посредством ссылки. См. также предварительную патентную заявку США № 63/023593, поданную 12 мая 2020 г.,

предварительную патентную заявку США № 63/038488, поданную 12 июня 2020 г., предварительную патентную заявку США № 63/043562, поданную 24 июня 2020 г., предварительную патентную заявку США № 63/079299, поданную 16 сентября 2020 г., предварительную патентную заявку США № 63/152042, поданную 22 февраля 2021 г., предварительную патентную заявку США № PCT/US21/32003, поданную 12 мая 2021 г., все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

При использовании в данном документе, «BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183» относится к экспрессионной кассете (например, как изображено на Фиг. 11), которая содержит сконструированную кодирующую последовательность hGAA780I, имеющую модифицированную сигнальную последовательность BiP-vIGF2 под контролем универсального промотора CAG и четыре тандемных повтора последовательностей-мишеней miR183. Как проиллюстрировано в Примерах, приведенных в данном документе, как мутация V780I, так и модификации BiP-vIGF2 способствуют повышению безопасности и эффективности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183 включает последовательность, кодирующую слитый белок SEQ ID №: 3 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183 включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 7, или последовательность, по меньшей мере на 95-99% идентичную ей. В еще одном варианте осуществления, в данном документе предусматривается геном вектора, в котором BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183 фланкирован 5'-ITR (инвертированным конечным повтором) и 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения, геном вектора представляет собой SEQ ID №: 30. В еще одном варианте осуществления, предусматривается геном вектора, включающий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID №: 30 и кодирует слитый белок SEQ ID №: 6.

В контексте данного изобретения, «функционально связанные» последовательности включают как контрольные последовательности экспрессии, примыкающие к кодирующей последовательности hGAA780I, так и контрольные последовательности экспрессии, осуществляющие контроль кодирующей последовательности hGAA780I в транс-положении или дистанционно. Такие регуляторные последовательности обычно включают, например, что-то одно или несколько из промотора, энхансера, интрона, последовательности Козака, последовательности полиаденилирования и ТАТА-сигнала.

В некоторых вариантах осуществления изобретения регуляторные элементы направляют экспрессию во множестве клеток и тканей, пораженных болезнью Помпе, для обеспечения возможности конструирования и доставки одной экспрессионной кассеты, пригодной для лечения множества клеток-мишеней. Например, могут быть выбраны регуляторные элементы (например, промотор), которые экспрессируются в двух или более из клеток печени, скелетных мышц, сердца и центральной нервной системы. Например, могут быть выбраны регуляторные элементы (например, промотор), которые

экспрессируются в клетках центральной нервной системы (например, головного мозга) и скелетных мышц. В других вариантах осуществления изобретения, регуляторные элементы экспрессируются в ЦНС, скелетных мышцах и сердце. В других вариантах осуществления изобретения, экспрессионная кассета обеспечивает возможность экспрессии кодируемого hGAA780I во всех из клеток печени, скелетных мышц, сердца и центральной нервной системы. В других вариантах осуществления изобретения, могут быть выбраны регуляторные элементы для нацеливания на конкретную ткань и недопущения экспрессии в определенных клетках или ткани (например, путем использования системы ГЗК-детаргетинга, описанной в данном документе, и/или путем выбора тканеспецифичного промотора). В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациенту вводят разные экспрессионные кассеты, предусматриваемые в данном документе, которые предпочтительно нацелены на разные ткани.

Регуляторные последовательности содержат промотор. Могут быть выбраны пригодные промоторы, включая, без ограничений, промотор, который будет экспрессировать белок hGAAV780I в клетках-мишенях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выбирают, конститутивный промотор или индуцибельный/регуляторный промотор. Примером конститутивного промотора является промотор бета-актина кур. Различные промоторы бета-актина кур были описаны отдельно или в комбинации с различными энхансерными элементами (например, CB7 представляет собой промотор бета-актина кур с цитомегаловирусными энхансерными элементами; промотор CAG, который включает промотор, первый экзон и первый интрон бета-актина кур, и акцептор сплайсинга гена бета-глобина кролика; промотор CBh, SJ Gray et al, *Hu Gene Ther*, 2011 Sep; 22(9): 1143-1153). В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть выбран регулируемый промотор. См., например, WO 2011/126808B2, который включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть выбран тканеспецифичный промотор. Примеры промоторов, являющихся тканеспецифичными, хорошо известны для печени (альбумин, Miyatake et al., (1997) *J. Virol.*, 71:5124-32; коровий промотор вируса гепатита В, Sandig et al., (1996) *Gene Ther.*, 3:1002-9; альфа-фетопропротеин (AFP), Arbuthnot et al., (1996) *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14), центральной нервной системы, например, нейронов (такой как промотор нейрон-специфической энтолазы (NSE), Andersen et al., (1993) *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15; ген легкой -цепи нейрофиламента, Piccioli et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5; и нейрон-специфический ген *vgf*, Piccioli et al., (1995) *Neuron*, 15:373-84), сердечной мышцы, скелетных мышц, легкого и других тканей. В другом варианте осуществления изобретения, пригодный промотор может включать, без ограничений, промотор фактора элонгации 1 альфа (EF1-альфа) (см., например, Kim DW et al., *Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene*. 1990 Jul 16;91(2):217-23), промотор синапсина 1 (см., например, Kügler S et al., *Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral*

vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther.* 2003 Feb;10(4):337-47), промотор нейрон-специфической энолазы (NSE) (см., например, Kim J et al., *Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells.* *Endocrinology.* 2004 Feb;145(2):613-9. Epub 2003 Oct 16) или промотор CB6 (см., например, *Large-Scale Production of Adeno-Associated Viral Vector Serotype-9 Carrying the Human Survival Motor Neuron Gene,* *Mol Biotechnol.* 2016 Jan;58(1):30-6. doi: 10.1007/s12033-015-9899-5). В некоторых вариантах осуществления изобретения с использованием тканеспецифичных промоторов могут быть выбраны котерапии с применением разных экспрессионных каскад с тканеспецифичными промоторами, нацеленными на разные типы клеток.

В одном варианте осуществления изобретения, регуляторная последовательность дополнительно содержит энхансер. В одном варианте осуществления изобретения, регуляторная последовательность содержит один энхансер. В другом варианте осуществления изобретения, регуляторная последовательность содержит два или больше энхансеров экспрессии. Такие энхансеры могут быть одинаковыми или могут быть разными. Например, энхансер может включать энхансер альфа *mic/bik* или энхансер ЦМВ. Такой энхансер может присутствовать в двух копиях, которые расположены рядом друг с другом. Альтернативно, двойные копии энхансера могут быть разделены одной или несколькими последовательностями.

В одном варианте осуществления изобретения, регуляторная последовательность дополнительно содержит интрон. В дополнительном варианте осуществления изобретения, интрон представляет собой интрон бета-актина кур. Другие пригодные интроны включают известные специалистам в данной области техники и могут быть интроном  $\beta$ -глобулина человека и/или коммерчески доступным интроном Promega®, и интронами, описанными в WO 2011/126808.

В одном варианте осуществления изобретения, регуляторная последовательность дополнительно содержит сигнал полиаденилирования (полиА). В дополнительном варианте осуществления изобретения, полиА представляет собой полиА глобина кролика. См., например, WO 2014/151341. Альтернативно, экспрессионная каскада может включать другой полиА, например, последовательность полиаденилирования гормона роста человека (hGH), полиА SV40, или синтетический полиА.

Следует понимать, что композиции в экспрессионной каскаде, описанной в данном документе, предназначены для применения по отношению к другим композициям, схемам, аспектам, вариантам осуществления изобретения и способам, представленным в данном описании изобретения.

Экспрессионные каскады могут быть доставлены с помощью любой пригодной системы доставки. Пригодные невирусные системы доставки известны в данной области техники (см., например, Ramamoorth and Narvekar. *J Clin Diagn Res.* 2015 Jan; 9(1):GE01-GE06, которая включена в данный документ посредством ссылки) и могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники, и могут включать, например, голую

ДНК, голую РНК, дендримеры, PLGA (полилактид-ко-гликолид), полиметакрилат, неорганические частицы, липидные частицы (например, липидные наночастицы или LNP), или состав на основе хитозана.

В одном варианте осуществления изобретения, вектор представляет собой невирусную плазмиду, которая содержит ее описанную экспрессионную кассету, например, «немодифицированную ДНК», «модифицированную плазмидную ДНК», РНК, и мРНК; в сочетании с различными композициями и наночастицами, включая, например, мицеллы, липосомы, композиции катионный липид - нуклеиновая кислота, полигликановые композиции и другие полимеры, конъюгаты на основе липида и/или холестерина - нуклеиновой кислоты, и другие конструкторы, такие как описанные в данном документе. См., например, X. Su et al., Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), pp 774-787; интернет-публикация: 21 марта 2011 г.; WO2013/182683, WO 2010/053572 и WO 2012/170930, которые все включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в данном документе предусматриваются молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие последовательности, кодирующие вариант hGAA780I, слитый белок или усеченный белок, как описано в данном документе. В одном желательном варианте осуществления изобретения, hGAA780I кодируется сконструированной последовательностью SEQ ID №: 4 или последовательностью, по меньшей мере на 95% идентичной с ней, которая кодирует вариант hGAA780I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, SEQ ID №: 4 модифицирована таким образом, чтобы кодон, кодирующий Ile в положении 780I, представлял собой ATT или ATC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота, содержащая сконструированную последовательность SEQ ID №: 4 или ее фрагмент, используется для экспрессии слитого белка или усеченного hGAA780I. Хотя это менее желательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, hGAA780I кодируется SEQ ID №: 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота кодирует слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID №: 6 или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, предусматривается нуклеиновая кислота, имеющая последовательность SEQ ID №: 7 или последовательностью, по меньшей мере на 95% идентичной ей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

### *Векторы*

«Вектор», в контексте данного изобретения, представляет собой биологический или химический фрагмент, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть введена в подходящую клетку-мишень для репликации или экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты. Примеры вектора включают, без ограничений, рекомбинантный вирус, плазмиду, липоплексы, полимерсом, полиплексы, дендример, конъюгат клеточно-проникающего пептида (CPP), магнитную частицу или

наночастицу. В одном варианте осуществления изобретения, вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую экзогенную или гетерологичную сконструированную нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональный генный продукт, который затем может быть введен в пригодную клетку-мишень. Такие векторы предпочтительно имеют одну или несколько точек начала репликации, и один или несколько сайтов, в которые может быть вставлена рекомбинантная ДНК. Векторы часто имеют средства, с помощью которых клетки с векторами могут быть отобраны от клеток без векторов, например, они кодируют гены устойчивости к лекарствам. Обычные векторы включают плазмиды, вирусные геномы и «искусственные хромосомы». Обычные методы генерации, продуцирования, определения характеристик или количественного определения векторов доступны специалисту в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор, описанный в данном документе, представляет собой «дефектный по репликации вирус» или «вирусный вектор», который относится к синтетической или искусственной вирусной частице, в которой экспрессионная кассета, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный слитый белок hGAA780I, упакована в вирусный капсид или оболочку, причем любые вирусные геномные последовательности, также упакованные в вирусный капсид или оболочку, являются дефектными по репликации; т.е. они не могут генерировать вирионы потомства, но сохраняют способность инфицировать клетки-мишени. В одном варианте осуществления изобретения, геном вирусного вектора не включает гены, кодирующие ферменты, необходимые для репликации (геном может быть сконструирован «выпотрошенным» - содержащим только кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, фланкированную сигналами, необходимыми для амплификации и упаковки искусственного генома), но такие гены могут быть добавлены в процессе продуцирования. Вследствие этого, он считается безопасным для использования в генной терапии, поскольку репликация и инфицирование вирионами потомства может происходить только в присутствии вирусного фермента, необходимого для репликации.

В контексте данного изобретения, рекомбинантный вирусный вектор представляет собой любой пригодный вирусный вектор, нацеленный на желаемую клетку (клетки). Таким образом, рекомбинантный вирусный вектор предпочтительно нацелен на одну или несколько клеток и тканей, пораженных болезнью Помпе, включая центральную нервную систему (например, головной мозг), скелетные мышцы, сердце и/или печень. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор нацелен по меньшей мере на клетки центральной нервной системы (например, головного мозга), легкого, сердечные клетки или скелетные мышцы. В других вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор нацелен на ЦНС (например, головной мозг), скелетные мышцы и/или сердце. В других вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор нацелен на все из клеток печени, скелетных мышц, сердца и центральной нервной системы. В примерах представлены иллюстративные рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV).

Однако, другие пригодные вирусные векторы могут включать, например, рекомбинантный аденовирус, рекомбинантный парвовирус, такой как рекомбинантный бокавирус, гибрид ААВ/бокавирус, рекомбинантный вирус простого герпеса, рекомбинантный ретровирус или рекомбинантный лентивирус. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, такие рекомбинантные вирусы являются репликационно некомпетентными.

Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» может относиться к пакующей клеточной линии, в которой продуцируется вектор (например, рекомбинантный ААВ). Клетка-хозяин может быть прокариотической или эукариотической клеткой (например, человека, насекомого или дрожжей), содержащей экзогенную или гетерологичную ДНК, которая была введена в клетку любыми средствами, например, электропорацией, осаждением фосфатом кальция, микроинъекцией, трансформацией, вирусной инфекцией, трансфекцией, липосомной доставкой, методами мембранного слияния, покрытыми ДНК шариками с высокой скоростью, вирусной инфекцией и слиянием протопластов. Примеры клеток-хозяев могут включать, без ограничений, выделенные клетки, клеточную культуру, клетки *Escherichia coli*, дрожжевые клетки, клетки человека, клетки, не принадлежащие человеку, клетки млекопитающих, клетки, не принадлежащие млекопитающим, клетки насекомых, клетки НЕК-293, клетки печени, клетки почки, клетки центральной нервной системы, нейроны, глиальные клетки или стволовые клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка-хозяин содержит экспрессионную кассету для продуцирования hGAA780I таким образом, чтобы указанный белок продуцировался в достаточном количестве *in vitro* для выделения или очистки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка-хозяин содержит экспрессионную кассету, кодирующую hGAAV780I, или его фрагмент. Как предусматривается в данном документе, белок hGAA780I может быть включен в фармацевтическую композицию, которую вводят субъекту в качестве лекарственного средства (т.е. заместительная ферментная терапия).

Используемый в данном документе термин «клетка-мишень» относится к любой клетке-мишени, в которой экспрессия функционального генного продукта является желательной.

В контексте данного изобретения, «геном вектора» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, упакованной внутри вирусного вектора. В одном примере «геном вектора» содержит, как минимум, в направлении от 5' к 3', вектор-специфическую последовательность, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный генный продукт (например, hGAAV780I, слитый белок hGAAV780I или другой белок), функционально связанную с регуляторными контрольными последовательностями, которые направляют ее экспрессию в клетке-мишени, вектор-специфическую последовательность, и необязательно, последовательности-мишени микроРНК в нетранслируемой области (областях) и вектор-

специфическую последовательность. Вектор-специфически последовательность может быть последовательностью концевой повтора, которая специфически упаковывает геном вектора в капсид вирусного вектора или белок оболочки. Например, инвертированные концевые повторы AAV используют для упаковки в капсиды AAV и некоторых других парвовирусов. Lentiviral длинные концевые повторы могут быть использованы в случаях, когда желательна упаковка в лентивирусный вектор. Аналогично, могут быть выбраны другие концевые повторы (например, ретровирусные длинные концевые повторы) и т.п.

Следует понимать, что композиции в векторе, описанном в данном документе, должны рассматриваться как применимые к другим композициям, схемам, аспектам, вариантам осуществления изобретения, и способам, представленным в данном описании изобретения.

#### *Аденоассоциированный вирус (AAV)*

В одном аспекте, в данном документе предложен рекомбинантный AAV (pAAV), содержащий капсид AAV и упакованный в него геном вектора, который кодирует слитый белок hGAAV780I (фермент), как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, выбранный капсид AAV нацелен на клетки двух или больше типов из печени, мышц, почки, сердца и/или центральной нервной системы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, желательной является экспрессия слитого белка hGAA780I в по меньшей мере двух или больше типах клеток из печени, скелетных мышц, сердца, почки и/или по меньшей мере одного типа клеток центральной нервной системы. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения выбранный капсид AAV нацелен на сердечную ткань. В некоторых вариантах осуществления изобретения выбранный капсид AAV, нацеленный на сердечную ткань, выбран из AAV 1, 6, 8 и 9 (см., например, Katz et al. Hum Gene Ther Clin Dev. 2017 Sep 1; 28(3): 157-164). В других вариантах осуществления изобретения, выбранный капсид AAV нацелен на клетки почки. В одном варианте осуществления изобретения, капсид для нацеливания на клетки почки выбран из AAV1, 2, 6, 8, 9 и Anc80 (см., например, Ikeda Y et al. J Am Soc Nephrol. 2018 Sep; 29(9):2287-2297 и Ascio et al. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Feb 26; 497(1): 19-24). В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAV представляет собой природный или сконструированный капсид клады F. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид представляет собой капсид AAV9 или капсид AAVhu68.

В одном варианте осуществления изобретения, геном вектора содержит 5'-инвертированный концевой повтор (ITR) AAV, экспрессионную кассету, как описано в данном документе, и 3'-ITR AAV. В одном варианте осуществления изобретения, геном вектора относится к последовательности нуклеиновой кислоты упакованной внутри капсида pAAV с образованием вектора pAAV. Такая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV, фланкирующие экспрессионную кассету. В одном примере «геном вектора» для упаковки

в капсид ААВ или бокавируса содержит, как минимум, в направлении от 5' к 3', 5'-ITR ААВ, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный слитый белок hGAA780I, как описано в данном документе, функционально связанную с регуляторными контрольными последовательностями, направляющими ее экспрессию в клетке-мишени, и 3'-ITR ААВ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ITR принадлежат ААВ2 и капсид принадлежит другому ААВ. Альтернативно, могут быть использованы другие ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения, геном вектора дополнительно содержит последовательности-мишени микроРНК в нетранслируемой области (областях), которые сконструированы таким образом, чтобы они специфически распознавались последовательностями микроРНК в клетках, в которых экспрессия трансгена является нежелательной, и/или сниженные уровни экспрессии трансгена являются желательными. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности-мишени miR183 в векторном геноме приводят к повышенной экспрессии трансгена в сердце.

ITR представляют собой генетические элементы, ответственные за репликацию и упаковку генома при продуцировании вектора и являются единственными вирусными cis-элементами, необходимыми для получения рААВ. В одном варианте осуществления изобретения, ITR принадлежат ААВ, отличному от источника капсида. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, последовательности ITR из ААВ2, или их делетированный вариант ( $\Delta$ ITR) могут быть использованы для удобства и ускорения разрешения регулирующих органов. Однако, могут быть выбраны ITR из других ААВ-источников. В тех случаях, когда источником ITR является ААВ2, и капсид ААВ принадлежит другому ААВ-источнику, полученный вектор может быть назван псевдотипированным. Обычно ААВ геном вектора содержит 5'-ITR ААВ, кодирующую последовательность hGAA780I и любые регуляторные последовательности, и 3'-ITR ААВ. Однако, другие конфигурации этих элементов могут быть пригодными. Был описан укороченный вариант 5'-ITR, названный  $\Delta$ ITR, в котором делетированы D-последовательность и сайт концевой разрешения (trs). В других вариантах осуществления изобретения используются 5'-ITR ААВ и 3'-ITR ААВ полной длины. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторный геном включает укороченные 5'- и/или 3'-ITR ААВ2 из 130 пар оснований, причем внешний элемент «а» удален. Укороченный ITR обращен назад к длине дикого типа из 145 пар оснований в процессе амплификации ДНК вектора с использованием внутреннего элемента А в качестве шаблона.

Термин «ААВ», в контексте данного изобретения, относится к природным аденоассоциированным вирусам, аденоассоциированным вирусам, доступным для специалистов в данной области техники и/или в свете композиции (композиций) и способа (способов), описанных в данном документе, а также к искусственным ААВ. Вирусный вектор на основе аденоассоциированного вируса (ААВ) представляет собой устойчивую к действию нуклеазы ААВ (например, ДНКазы) частицу, имеющую капсидный белок ААВ, в который упакована экспрессионная кассета, фланкированная

последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) ААВ для доставки в клетки-мишени. Устойчивый к действию нуклеазы рекомбинантный ААВ (рААВ) указывает на то, что капсид ААВ является полностью собранным и защищает последовательности упакованного генома вектора от деградации (гидролиза) на стадиях инкубации с нуклеазой, предназначенных для удаления загрязняющих нуклеиновых кислот, которые могут присутствовать после процесса продуцирования. Во многих случаях, рААВ, описанные в данном документе, являются резистентными к ДНКазе.

Капсид ААВ состоит из 60 капсидных (сар) белковых субъединиц VP1, VP2 и VP3, которые расположены с икосаэдрической симметрией в соотношении приблизительно от 1:1:10 до 1:1:20, в зависимости от выбранного ААВ. Различные ААВ могут быть выбраны в качестве источников капсидов вирусных векторов ААВ, как указано выше. См., например, опубликованную патентную заявку США № 2007-0036760-A1; опубликованную патентную заявку США № 2009-0197338-A1; EP 1310571. См. также, WO 2003/042397 (ААВ7 и другие ААВ обезьян), патент США 7790449 и патент США 7282199 (ААВ8), WO 2005/033321 и US 7906111 (ААВ9), и WO 2006/110689, и WO 2003/042397 (rh.10). В этих документах также описаны другие ААВ, которые могут быть выбраны для получения ААВ и включены посредством ссылок. Из ААВ, выделенных или сконструированных у человека или нечеловекообразных приматов (NHP) и хорошо охарактеризованных, ААВ2 человека представляет собой первый ААВ, разработанный как вектор для переноса генов; он широко использовался в экспериментах с успешным переносом генов в разных тканях-мишенях и животных моделях. Если иное не указано, капсид ААВ, ITR и другие выбранные компоненты ААВ, описанные в данном документе, может быть легко выбран из любого ААВ, включая, без ограничения, ААВ, обычно идентифицируемые как ААВ1, ААВ2, ААВ3, ААВ4, ААВ5, ААВ6, ААВ6.2, ААВ7, ААВ8, ААВ9, ААВ8bp, ААВrh10, ААВhu37, ААВ7M8 и ААВAnc80, ААВrh90 (PCT/US20/30273, поданная 28 апреля 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки), ААВrh91 (PCT/US20/30266, поданная 28 апреля 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки) и ААВrh92, rh93 и rh91.93 (PCT/US20/30281, поданная 28 апреля 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки), и варианты любого из известных или упомянутых ААВ или ААВ, которые еще предстоит обнаружить, или их варианты или смеси. См., например, WO 2005/033321, который включен в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления изобретения, капсид ААВ представляет собой капсид ААВ9 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок обозначается цифрой или комбинацией цифр и букв после термина «ААВ» в названии рААВ-вектора.

ITR или другие компоненты ААВ могут быть легко выделены из ААВ или сконструированы с использованием методов, доступных специалистам в данной области техники. Такие ААВ могут быть выделены, сконструированы или получены из академических, коммерческих или общедоступных источников (например, от Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection), Манассас,

Виргиния). Альтернативно, последовательности ААВ могут быть сконструированы путем синтеза или другими пригодными способами со ссылками на опубликованные последовательности, такие как доступные в литературе или в базах данных, таких как, например, GenBank, PubMed и т.п. Вирусы ААВ могут быть сконструированы обычными методами молекулярной биологии, позволяющими оптимизировать такие частицы для клеточно-специфической доставки последовательностей нуклеиновых кислот, с целью минимизации иммуногенности, регулировки стабильности и времени жизни частиц, эффективной деградации, точной доставки в ядро и т.д.

Используемые в данном документе термины «рААВ» и «искусственный ААВ», используемые взаимозаменяемо, означают, без ограничений, ААВ, содержащий капсидный белок и упакованный в него геном вектора, причем геном вектора содержит нуклеиновую кислоту, гетерологичную к ААВ. В одном варианте осуществления изобретения, капсидный белок представляет собой не встречающийся в природе капсид. Такой искусственный капсид может быть получен любым пригодным методом, с использованием выбранной последовательности ААВ (например, фрагмента капсидного белка *vp1*) в комбинации с гетерологичными последовательностями, которые могут быть получены из разных выбранных ААВ, несмежных участков одного и того же ААВ, из вирусного источника, не относящегося к ААВ, или из невирусного источника. Искусственный ААВ может быть, без ограничений, псевдотипированным ААВ, химерным капсидом ААВ, рекомбинантным капсидом ААВ или «гуманизированным» капсидом ААВ. Псевдотипированные векторы, в которых капсид одного ААВ заменяют на гетерологичный капсидный белок, пригодны для использования в некоторых вариантах осуществления изобретения. В одном варианте осуществления изобретения, ААВ2/5 и ААВ2/8 являются примерами псевдотипированных векторов. Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым пригодным способом, включая трансфекцию, электропорацию, доставку липосомами, методы мембранного слияния, покрытые ДНК шарики с высокой скоростью, вирусную инфекцию и слияние протопластов. Способы, используемые для приготовления таких конструкторов, известны специалистам по манипуляциям с нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и методы синтеза. См., например, Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид ААВ выбирают из природных и сконструированных аденоассоциированных вирусов кланды F. В примерах ниже, аденоассоциированный вирус кланды F представляет собой ААVhu68. См., WO 2018/160582, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Однако, в других вариантах осуществления изобретения, капсид ААВ выбирают из другой кланды, например, кланды А, В, С, D или Е, или из ААВ-источника, не принадлежащего к какой-либо из этих кланд.

Используемый в данном документе термин «кланда», по отношению к группам

ААВ, относится к группам ААВ, которые является филогенетически родственными друг с другом по результатам определения с использованием алгоритма объединения соседних пар по значению бутстрепа не менее 75% (для по меньшей мере 1000 реплик) и измерению расстояния с поправкой Пуассона не более 0,05, на основе выравнивания аминокислотной последовательности ААВ vp1. Алгоритм объединения соседних пар был описан в литературе. См., например, M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, New York (2000)). Компьютерные программы, которые можно использовать для реализации этого алгоритма, являются доступными. Например, в программе MEGA v2.1 внедрен модифицированный метод Nei-Gojobori. Используя эти методы и компьютерные программы, и последовательность капсидного белка ААВ vp1, специалист в данной области техники может легко определить, принадлежит ли выбранный ААВ к одной из клад, указанных в данном документе, к другой кладе, или находится за пределами этих клад. См., например, G Gao, et al., *J Virol*, 2004 Jun; 78(10): 6381-6388, где определены клады А, В, С, D, Е и F, и приведены последовательности нуклеиновых кислот новых ААВ, номера доступа GenBank AY530553-AY530629. См. также WO 2005/033321.

В контексте данного изобретения, «капсид ААВ9» относится к ААВ9, имеющему аминокислотную последовательность (а) № доступа GenBank: AAS99264, включенный в данный документ посредством ссылки, и капсидный белок ААВ vp1, и/или (b) аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью № доступа GenBank: AY530579.1: (нуклеотиды (nt) 1..2211). Настоящее изобретение охватывает некоторые отклонения от этой кодируемой последовательности, и может включать последовательности, имеющие примерно 99% идентичности с эталонной аминокислотной последовательностью № доступа GenBank: AAS99264 и US7906111 (также WO 2005/033321) (т.е. менее чем примерно 1% отклонений от эталонной последовательности). Такие ААВ могут включать, например, природные изоляты (например, hu31 или hu32), или варианты ААВ9, имеющего аминокислотные замещения, делеции или добавления, например, включая, без ограничений, аминокислотные замены, выбранные из альтернативных остатков, «рекрутированных» из соответствующего положения в каком-либо другом капсиде ААВ, выровненном с капсидом ААВ9; например, как описано в US 9102949, US 8927514, US2015/349911, WO 2016/049230A1, US 9623120 и US 9585971. Однако, в других вариантах осуществления изобретения могут быть выбраны другие варианты ААВ9, или капсиды ААВ9, имеющие по меньшей мере примерно 95% идентичности с вышеуказанными последовательностями. См., например, US 2015/0079038. Способы получения капсидов, их кодирующих последовательностей, и способы продуцирования вирусных векторов рААВ были уже описаны. См., например, Gao, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (10), 6081-6086 (2003) и US 2013/0045186A1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид ААVhu68 представляет собой капсид, описанный в WO 2018/160582, озаглавленном «Novel Adeno-associated virus (AAV) Clade F Vector and Uses Therefor», который настоящим включен в

данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAVhu68 содержит: белки vp1 AAVhu68, продуцируемые в результате экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность с 1 по 736 SEQ ID №: 2, белки vp1, продуцируемые из SEQ ID №: 1, или белки vp1, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% идентична SEQ ID №: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность 1-736 SEQ ID №: 2; белки AAVhu68 vp2 продуцируемые путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно аминокислот 138-736 SEQ ID №: 2, белки vp2, продуцируемые из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды 412-2211 SEQ ID №: 1, или белки vp2, продуцируемые из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам 412-2211 SEQ ID №: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно аминокислот 138-736 SEQ ID №: 2 и/или белки AAVhu68 vp3, продуцируемые путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере примерно аминокислот 203-736 SEQ ID №: 2, белки vp3, продуцируемые из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды 607-2211 SEQ ID №: 1, или белки vp3, продуцируемые из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% идентична по меньшей мере нуклеотидам с 607 по 2211 SEQ ID №: 1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность из по меньшей мере аминокислот с около 1 по 736 SEQ ID №: 2.

Белки vp1, vp2 и vp3 AAVhu68 обычно экспрессируются как альтернативные варианты сплайсинга, кодируемые той же последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует полноразмерную аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID №: 2 (аминокислоты 1-736). Необязательно, кодирующая vp1 последовательность используется одна для экспрессии белков vp1, vp2 и vp3. Альтернативно, эта последовательность может коэкспрессироваться с одной или несколькими последовательностями нуклеиновой кислоты, которые кодируют аминокислотную последовательность vp3 AAVhu68 SEQ ID №: 2 (приблизительно аминокислоты 203-736) без уникальной для vp1 области (приблизительно аминокислоты 1-137) и/или уникальных для vp2 областей (приблизительно аминокислоты 1-202), или комплементарная к ней нить, соответствующая мРНК (приблизительно нуклеотиды 607-2211 SEQ ID №: 1), или последовательностью, которая от по меньшей мере на 70% до по меньшей мере на 99% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID №: 1, которая кодирует аминокислоты 203-736 SEQ ID №: 2. Дополнительно или альтернативно, кодирующая vp1 и/или кодирующая vp2 последовательность может коэкспрессироваться с последовательностью нуклеиновой

кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность vp2 AAVhu68 SEQ ID №: 2 (приблизительно аминокислоты 138-736) без уникальной для vp1 области (приблизительно аминокислоты 1-137), или комплементарная к ней нить, соответствующая мРНК (нуклеотиды 412-2211 SEQ ID №: 1), или последовательностью, которая от по меньшей мере на 70% до по меньшей мере на 99% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична нуклеотидам с 412 по 2211 SEQ ID №: 1, которая кодирует приблизительно аминокислоты 138-736 SEQ ID №: 2.

Как описано в данном документе, rAAVhu68 содержит капсид rAAVhu68, полученный в системе продуцирования экспрессионных капсидов из нуклеиновой кислоты AAVhu68, которая кодирует аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID №: 2, и необязательно дополнительные последовательности нуклеиновых кислот, например, кодирующие белок vp3 без уникальных для vp1 и/или vp2 областей. rAAVhu68, образующийся в результате продуцирования с использованием последовательности одной нуклеиновой кислоты vp1, продуцирует гетерогенную популяцию белков vp1, белков vp2 и белков vp3. Более конкретно, капсид AAVhu68 содержит субпопуляции среди белков vp1, среди белков vp2 и среди белков vp3, которые имеют модификации по сравнению с предсказанными аминокислотными остатками в SEQ ID №: 2. Такие субпопуляции включают, как минимум, деамидированные остатки аспарагина (N или Asn). Например, аспарагины в парах аспарагин-глицин являются в сильной степени деамидированными.

В одном варианте осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты AAVhu68 vp1 имеет последовательность SEQ ID №: 1, или комплементарной к ней нити, например, соответствующей мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белки vp2 и/или vp3 могут экспрессироваться дополнительно или альтернативно из последовательностей нуклеиновых кислот, отличных от vp1, например, для изменения соотношения белков vp в выбранной системе экспрессии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, также предусматривается последовательность нуклеиновой кислоты которая кодирует аминокислотную последовательность AAVhu68 vp3 SEQ ID №: 2 (приблизительно аминокислоты 203-736) без уникальной для vp1 области (приблизительно аминокислоты 1-137) и/или уникальных для vp2 областей (приблизительно аминокислоты 1-202), или комплементарная к ней нить, соответствующая мРНК (приблизительно нуклеотиды 607-2211 SEQ ID №: 2). В некоторых вариантах осуществления изобретения, также предусматривается последовательность нуклеиновой кислоты которая кодирует аминокислотную последовательность AAVhu68 vp2 SEQ ID №: 2 (приблизительно аминокислоты 138-736) без уникальной для vp1 области (приблизительно аминокислоты 1-137), или комплементарная к ней нить, соответствующая мРНК (нуклеотиды 412-2211 SEQ ID №: 1).

Однако, другие последовательность нуклеиновых кислот, кодирующие

аминокислотную последовательность SEQ ID №: 2, могут быть выбраны для использования в продуцировании капсидов rAAVhu68. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1 или последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 70-99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID №: 1, которая кодирует SEQ ID №: 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1 или последовательность по меньшей мере на 70-99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 99%, идентичную приблизительно нуклеотидам 412-2211 SEQ ID №: 1, которая кодирует капсидный белок vp2 (аминокислоты с около 138 по 736) SEQ ID №: 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты из приблизительно нуклеотидов 607-2211 SEQ ID №: 1, или последовательность, по меньшей мере на 70-99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 99% идентичную нуклеотидам 412-2211 SEQ ID №: 1, которая кодирует капсидный белок vp3 (аминокислоты с около 203 по 736) SEQ ID №: 1.

Специалист в данной области техники способен сконструировать последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие этот капсид AAVhu68, включая ДНК (геномную или кДНК), или РНК (например, мРНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей капсидный белок vp1 AAVhu68, представлена в SEQ ID №: 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид AAVhu68 продуцируется с использованием последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1 или последовательности, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 99% кодирующей аминокислотную последовательность vp1 SEQ ID №: 2 с модификацией (например, деамидированной аминокислотой), как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотная последовательность vp1 воспроизведена в SEQ ID №: 2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, могут быть выбраны капсиды AAB, имеющие пониженную степень деамидирования капсида. См., например, PCT/US19/19804 и PCT/US18/19861, оба поданные 27 февраля 2019 г. и включенные посредством ссылки в полном объеме.

Как используется в данном документе, при использовании в отношении капсидных белков vp, термин «гетерогенный» или его любой грамматический вариант относится к

популяции, состоящей из элементов, которые не являются одинаковыми, например, содержащими мономеры vp1, vp2 или vp3 (белки) с различными модифицированными аминокислотными последовательностями. SEQ ID №: 2 предусматривает кодируемую аминокислотную последовательность белка vp1 AAVhu68. Термин «гетерогенный» при использовании в связи с белками vp1, vp2 и vp3 (альтернативно называемыми изоформами), относится к различиям в аминокислотных последовательностях белков vp1, vp2 и vp3 в капсиде. Капсид AAV содержит субпопуляции внутри белков vp1, внутри белков vp2 и внутри белков vp3, которые имеют модификации по сравнению с предсказанными аминокислотными остатками. Такие субпопуляции включают, как минимум, некоторые деамидированные остатки аспарагина (N или Asn). Например, определенные субпопуляции содержат по меньшей мере один, два, три или четыре положения аспарагинов (N) с высокой степенью деамидирования в парах аспарагин-глицин, и необязательно дополнительно содержат другие деамидированные аминокислоты, причем деамидирование приводит к замене аминокислоты и другим необязательным модификациям.

В контексте данного изобретения, «субпопуляция» белков vp относится к группе белков vp, которая имеет по меньшей мере одну общую определенную характеристику, и которая состоит из от по меньшей мере одного члена группы до менее чем всех членов эталонной группы, если не указано иное. Например, «субпопуляция» белков vp1 состоит из от по меньшей мере одного (1) белка vp1 до менее чем всех белков vp1 в собранном капсиде AAV, если не указано иное. «Субпопуляция» белков vp3 может представлять собой от одного (1) белка vp3 до менее чем всех белков vp3 в собранном капсиде AAV, если не указано иное. Например, белки vp1 могут представлять собой субпопуляцию белков vp; белки vp2 могут представлять собой отдельную субпопуляцию белков vp, и vp3 представляют собой дополнительную субпопуляцию белков vp в собранном капсиде AAV. В другом примере, белки vp1, vp2 и vp3 могут содержать субпопуляции, имеющие разные модификации, например, по меньшей мере один, два, три или четыре аспарагина с высокой степенью деамидирования, например, в парах аспарагин-глицин.

Если не указано иное, с высокой степенью деамидирования относится к по меньшей мере 45% деамидирования, по меньшей мере 50% деамидирования, по меньшей мере 60% деамидирования, по меньшей мере 65% деамидирования, по меньшей мере 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99%, или до примерно 100% деамидирования в указанном аминокислотном положении по сравнению с предсказанной аминокислотной последовательностью в указанном аминокислотном положении (например, по меньшей мере 80% аспарагинов в положении 57 аминокислоты SEQ ID №: 2 [AAVhu68] могут быть деамидированными от общего количества белков vp1, могут быть деамидированными от общего количества белков vp1, vp2 и vp3). Такие процентные величины могут быть определены с использованием двумерного геля, методов масс-спектрометрии или других пригодных методов.

Таким образом, рААВ включает субпопуляции белков  $\nu p1$ ,  $\nu p2$  и/или  $\nu p3$  в капсиде гААВ с деамидированными аминокислотами, включая, как минимум, по меньшей мере одну субпопуляцию, содержащую по меньшей мере один аспарагин с высокой степенью деамидирования. Кроме того, другие модификации могут включать изомеризацию, особенно в выбранных положениях остатков аспарагиновой кислоты (D или Asp). В других вариантах осуществления изобретения модификации могут включать амидирование в положении Asp.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид ААВ содержит субпопуляции  $\nu p1$ ,  $\nu p2$  и  $\nu p3$ , имеющие от по меньшей мере 4 до по меньшей мере примерно 25 положений деамидированных аминокислотных остатков, из которых по меньшей мере 1-10% являются деамидированными по сравнению с кодируемой аминокислотной последовательностью белков  $\nu p$ . Большинство их может быть остатками N. Однако, остатки Q также могут быть деамидированными.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ААВ имеет капсид ААВ, содержащий белки  $\nu p1$ ,  $\nu p2$  и  $\nu p3$ , имеющие субпопуляции, содержащие комбинации двух, трех, четырех или более деамидированных остатков в положениях, указанных в таблице, приведенной в Примере 1, и включенной в данный документ посредством ссылки. Деамидирование в гААВ может быть определено с помощью 2D гель-электрофореза и/или масс-спектрометрии, и/или методик моделирования белков. Онлайн-хроматографию можно осуществлять с использованием колонки Acclaim PepMap и системы Thermo UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific) в сочетании с Q Exactive HF с источником NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Данные MS собирают с использованием метода отбора 20 лучших точек данных для Q Exactive HF с динамическим выбором наиболее многочисленных из еще несеквенированных ионов-прекурсоров из обзорных сканов (200-2000  $m/z$ ). Секвенирование осуществляют посредством фрагментации за счет высокоэнергетического столкновения-диссоциации с целевым значением, составляющим  $1e5$  ионов, что определено с использованием предсказанного автоматического контроля набора, и выделение прекурсоров осуществляли с окном 4  $m/z$ . Обзорные сканы получали при разрешении 120000 при  $m/z$  200. Разрешение для спектра HCD может быть установлено равным 30000 при  $m/z$  200 с максимальным временем введения ионов, составляющим 50 мс, и нормализованной энергией столкновения, составляющей 30. Уровень RF S-линз может быть установлен равным 50, что дает оптимальное пропускание области  $m/z$ , занятой пептидами из смеси после разложения. Ионы-прекурсоры могут быть исключены из единственного неопределенного или шестого или более высоких зарядовых состояний из отбора фрагментации. Для анализа полученных данных можно использовать программное обеспечение BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific). Для картирования пептида поиск осуществляют с использованием базы данных белков FASTA с единственной записью с карбамидометилированием, установленным как фиксированная модификация; и окислением, деамидированием и фосфорилированием, установленными как переменные

модификации, точностью массы 10 млн-1, высокой специфичностью к протеазе и доверительным уровнем 0,8 для спектра МС/МС. Примеры пригодных протеаз могут включать, например, трипсин или химотрипсин. Масс-спектрометрическая идентификация деамидированных пептидов является относительно прямой, поскольку деамидирование прибавляет к массе интактной молекулы +0,984 Да (различие массы между группами -ОН и -NH<sup>2</sup>). Процент деамидирования конкретного пептида определяют по площади массы деамидированного пептида, деленной на сумму площадей деамидированного и нативного пептидов. Учитывая количество возможных сайтов деамидирования, изобарные фрагменты, деамидированные по разным сайтам, могут совместно мигрировать в одном пике. Следовательно, ионы фрагментов, происходящие из пептидов с несколькими возможными сайтами деамидирования, также можно использовать для расположения или дифференцировки различных сайтов деамидирования. В этих случаях относительные интенсивности в наблюдаемых конфигурациях изотопов можно использовать для специфического определения относительной распространенности различных деамидированных пептидных изомеров. Этот метод основан на предположении, что эффективность фрагментации для всех изомерных видов одинакова и не зависит от сайта деамидирования. Специалистом в данной области техники понятно, что может использоваться ряд вариантов таких показательных методов. Например, пригодные масс-спектрометры могут включать, например, квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр (QTOF), такой как Waters Xevo или Agilent 6530 или инструмент с орбитальной ионной ловушкой (orbitrap), такой как Orbitrap Fusion или Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Пригодные системы жидкостной хроматографии включают, например, систему Acquity UPLC фирмы Waters или системы Agilent (серии 1100 или 1200). Пригодные прикладные программы для анализа данных могут включать, например, MassLynx (Waters), Pinpoint и Pepfinder (Thermo Fisher Scientific), Mascot (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Другие методики могут быть описаны, например, в X. Jin et al., *Hu Gene Therapy Methods*, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267, опубликованной онлайн 16 июня 2017 г.

Кроме деамидирования, могут происходить другие модификации, не приводящие к превращению одной аминокислоты в остаток другой аминокислоты. Такие модификации могут включать ацетилированные остатки, изомеризации, фосфорилирования или окисления.

Модуляция деамидирования: В некоторых вариантах осуществления изобретения, ААВ модифицируют с заменой глицина в паре аспарагин-глицин, для снижения деамидирования. В других вариантах осуществления изобретения, аспарагин заменяют на другую аминокислоту, например, глутамин, который деамидируется с более низкой скоростью; или на аминокислоту, не содержащую амидных групп (например, глутамин и аспарагин содержат амидные группы); и/или на аминокислоту, не содержащую аминокислотных групп (например, лизин, аргинин и гистидин содержат аминокислотные группы). В контексте данного изобретения, к аминокислотам, не имеющим боковых амидных или аминокислотных групп,

относятся, например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, цистин, фенилаланин, тирозин или триптофан и/или пролин. Модификации, такие как были описаны, могут находиться одной, двух или трех парах аспарагин-глицин, присутствующих в кодируемой аминокислотной последовательности ААВ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие модификации не проводят во всех четырех парах аспарагин-глицин. Таким образом, предусматривается способ снижения деамидирования ААВ и/или сконструированных вариантов ААВ, имеющих более низкие показатели деамидирования. Дополнительно или альтернативно, одна или несколько других аминокислот амида могут быть заменены на неамидную аминокислоту для снижения деамидирования ААВ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутантный капсид ААВ, описанный в данном документе, содержит мутацию в паре аспарагин-глицин с заменой глицина на аланин или серин. Мутантный капсид ААВ может содержать один, два или три мутанта в тех случаях, когда нативный эталонный ААВ содержит четыре пары NG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсид ААВ может содержать один, два, три или четыре таких мутанта в тех случаях, когда нативный эталонный ААВ содержит пять пар NG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутантный капсид ААВ содержит только одну мутацию в паре NG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутантный капсид ААВ содержит мутации в двух разных парах NG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутантный капсид ААВ содержит мутацию в двух разных парах NG, которые расположены в структурно обособленных положениях в капсиде ААВ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутация расположена не в уникальной для *vr1* области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одна из мутаций расположена в уникальной для *vr1* области. Необязательно, мутантный капсид ААВ не содержит модификаций в парах NG, но содержит мутации, предназначенные для минимизации или недопущения деамидирования в одном или нескольких аспарагинах, или глутамине, расположенных вне пары NG. В капсидном белке ААVhu68, 4 остатка (N57, N329, N452, N512) обычно демонстрируют уровни деамидирования >70% и в большинстве случаев >90% в разных партиях. Дополнительные остатки аспарагина (N94, N253, N270, N304, N409, N477 и Q599) также демонстрируют уровни деамидирования до ~20% в разных партиях. Уровни деамидирования первоначально определяли путем гидролиза трипсином и проверяли путем гидролиза химотрипсином.

Капсид ААVhu68 содержит субпопуляции среди белков *vr1*, среди белков *vr2* и среди белков *vr3*, которые имеют модификации по сравнению с предсказанными аминокислотными остатками в SEQ ID №: 2. Такие субпопуляции включают, как минимум, некоторые деамидированные остатки аспарагина (N или Asn). Например, некоторые субпопуляции содержат по меньшей мере один, два, три или четыре положения деамидированных в высокой степени аспарагинов (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID №: 2 и необязательно дополнительно содержат другие деамидированные аминокислоты, причем деамидирование приводит к заменам аминокислот и другим необязательным

модификациям. Различны комбинации таких и других модификаций описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рААВ, как описано в данном документе, представляет собой самокомплементарный ААВ. «Самокомплементарный ААВ» относится к конструкту, в котором кодирующая область, переносимая последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты ААВ, сконструирована таким образом, что образует внутримолекулярную двухцепочечную матрицу ДНК. После заражения, вместо того чтобы ждать опосредованного клетками синтеза второй нити, две комплементарные половинки скААВ (самокомплементарный ААВ) соединяются, образуя одну единицу двухцепочечной ДНК (дцДНК), которая готова к немедленной репликации и транскрипции. См., например, D M McCarty et al., “Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis”, *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254. Самокомплементарные ААВ описаны, например, в патентах США №№ 6596535; 7125717 и 7456683, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (ААВ), описанный в данном документе, может быть получен с использованием известных методов. См., например, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Такой способ предусматривает культивацию клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсид ААВ; функциональный ген гер; экспрессионную кассету, как описано в данном документе, фланкированную ААВ инвертированными концевыми повторами (ITR); и достаточные хелперные функции для обеспечения возможности упаковки экспрессионной кассеты в капсидный белок ААВ. Также в данном документе предусматривается клетка-хозяин, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсид ААВ; функциональный ген гер; геном вектора, как описано; и достаточные хелперные функции для обеспечения возможности упаковки генома вектора в капсидный белок ААВ. В одном варианте осуществления, клетка-хозяин представляет собой клетку НЕК 293. Эти методы описаны более подробно в WO2017160360 A2, который включен в данный документ посредством ссылки.

Могут быть использованы другие способы продуцирования рААВ, доступные специалисту в данной области техники. Пригодные способы могут включать, без ограничений, бакуловирусную экспрессионную систему или продуцирование с использованием дрожжей. См., например, Robert M. Kotin, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Mol Genet*. 2011 Apr 15; 20(R1): R2-R6. Онлайн-публикация, 29 апреля 2011 г., doi: 10.1093/hmg/ddr141; Aucoin MG et al., Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnol Bioeng*. 2006 Dec 20;95(6):1081-92; SAMI S. THAKUR, Production of Recombinant Adeno-associated viral vectors in yeast. Thesis presented to the

Graduate School of the University of Florida, 2012; Kondratov O et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells, *Mol Ther.* 2017 Aug 10. pii: S1525-0016(17)30362-3. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003. [предварительная электронная публикация]; Mietzsch M et al, OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal Encapsulation of Foreign DNA. *Hum Gene Ther Methods.* 2017 Feb;28(1):15-22. doi: 10.1089/hgtb.2016.164.; Li L et al. Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes: a eukaryotic source of DNA for gene transfer. *PLoS One.* 2013 Aug 1;8(8):e69879. doi: 10.1371/journal.pone.0069879. Print 2013; Galibert L et al, Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. *J Invertebr Pathol.* 2011 Jul;107 Suppl:S80-93. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.008; и Kotin RM, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Mol Genet.* 2011 Apr 15;20(R1):R2-6. doi: 10.1093/hmg/ddr141. Epub 2011 Apr 29.

Двухстадийную очистку методом аффинной хроматографии при высокой концентрации соли с последующей хроматографией на анионообменной смоле используют для очистки векторного лекарственного продукта и удаления пустых капсидов. Эти методы описаны более подробно в WO 2017/160360, озаглавленном “Scalable Purification Method for AAV9” (Масштабируемый способ очистки AAV9), который включен в данный документ посредством ссылки. Вкратце, способ отделения частиц рAAV9, имеющих упакованные геномные последовательности, от геном-дефицитных промежуточных AAV9 включает проведение жидкостной хроматографии быстрого разрешения суспензии, содержащей рекомбинантные вирусные частицы AAV9 и промежуточные капсиды AAV9, при которой вирусные частицы AAV9 и промежуточные AAV9 связываются с сильной анионообменной смолой, уравновешенной при pH 10,2, и подвергаются воздействию градиента соли при контроле элюата по поглощению ультрафиолета при приблизительно 260 и приблизительно 280. Значение pH может находиться в диапазоне примерно 10,0-10,4, хотя для рAAV9 это будет менее оптимально. В этом способе, собирают полные капсиды AAV9 из фракции, которая элюируется при достижении точки перегиба соотношения A260/A280. В одном примере, для стадии аффинной хроматографии, подвергнутой диафильтрации продукт может быть нанесен на аффинную смолу Capture Select™ Poros-AAV2/9 (Life Technologies), которая эффективно улавливает серотип AAV2/9. В таких ионных условиях, значительная часть остаточной клеточной ДНК и белков проходят через колонку, в то время как частицы AAV эффективно улавливаются.

Обычные методы характеристики или количественного определения рAAV являются доступными для специалиста в данной области техники. Для расчета содержания пустых и полных частиц, строят график зависимости объемов полос VP3 для выбранного образца (например, в примерах в данном документе - препарата, подвергнутого очистке в градиенте йодиксанола, где число GC=числу частиц) от

количества загруженных частиц GC. Полученное уравнение линейной зависимости ( $y=mx+c$ ) используют для расчета числа частиц в объемах полос пиков исследуемого препарата. Количество загруженных частиц (pt) на 20 мкл затем умножают на 50, что дает частицы (pt) /мл. Pt/мл, разделенный на GC/mL, дает соотношение частиц к копиям генома (pt/GC). Pt/мл-GC/мл дает пустые pt/мл. Деление величины пустых частиц/мл на количество частиц/мл и умножение на 100 дает процентное содержание пустых частиц. В общем, способы оценки количества пустых капсидов и векторных частиц AAV с упакованными геномами известны специалистам в данной области техники. См., например, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. Способы анализа на денатурированный капсид включают проведение электрофореза обработанного маточного раствора AAV на ДСН-полиакриламидном геле, состоящем из любого геля, способного разделять три капсидных белка, например, градиентного геля, содержащего 3-8% трис-ацетата в буфере, с последующей разгонкой геля до разделения материала образца и блоттингом геля на нейлоновую или нитроцеллюлозную мембраны, предпочтительно, нейлоновую. Антитела против капсидов AAV используют затем в качестве первичных антител, которые связываются с денатурированными капсидными белками, предпочтительно, моноклональное антитело против капсидов AAV, наиболее предпочтительно, В1 анти-AAV-2 моноклональное антитело (Wobus et al., *J. Viral.* (2000) 74:9281-9293). Затем используют вторичное антитело, которое связывается с первичным антителом и содержит средство для обнаружения связывания с первичным антителом, более предпочтительно антитело к IgG, содержащее молекулу детектирования, ковалентно с ним связанную, наиболее предпочтительно антитело овцы к IgG мыши, ковалентно связанное с пероксидазой хрена. Для полуколичественного определения связывания между первичным и вторичным антителами используют метод обнаружения связывания, предпочтительно метод обнаружения, способный определять эмиссию радиоактивных изотопов, электромагнитное излучение или колориметрические изменения, наиболее предпочтительно, набор для обнаружения хемилюминесценции. Например, для ДСН-ПААГ, могут быть взяты образцы из колоночных фракций и нагреты в загрузочном буфере для ДСН-ПААГ, содержащем восстановитель (например, дитиотреитол (DTT)), и капсидные белки разделяют на предварительно отлитых градиентных полиакриламидных гелях (например, Novex). Можно проводить окрашивание серебром с использованием SilverXpress (Invitrogen, CA) в соответствии с инструкциями производителя, или другие пригодные способы окрашивания, такие как окрашивание красителями SYPRO рубин или кумасси (Coomassie). В одном варианте осуществления, концентрация векторных геномов (vg) AAV в колоночных фракциях может быть измерена путем количественной ПЦР в реальном времени (Q-PCR). Образцы разбавляют и расщепляют ДНКазой I (или другой пригодной нуклеазой) для удаления экзогенной ДНК. После инактивации нуклеазы образцы дополнительно разбавляют и амплифицируют с использованием праймеров и флуорогенного зонда TaqMan™, специфичного к последовательности ДНК между

праймерами. Количество циклов, необходимых для достижения определенного уровня флуоресценции (пороговый цикл,  $C_t$ ) измеряют для каждого образца с использованием системы детектирования последовательности Applied Biosystems Prism 7700. Для получения стандартной кривой в количественной реакции ПЦР используют плазмидную ДНК, содержащую последовательности, идентичные тем, которые содержатся в векторе ААВ. Значения порогового цикла ( $C_t$ ), полученные для образцов, используют для определения титра векторного генома путем его нормирования по значению  $C_t$  калибровочной кривой для плазмиды. Также могут использоваться анализы конечных точек на основе цифровой ПЦР.

В одном аспекте, используется оптимизированный метод количественной ПЦР, который использует сериновую протеазу широкого спектра действия, например, протеиназу К (такую как коммерчески доступная от Qiagen). Более конкретно, оптимизированный анализ титра генома методом количественной ПЦР является схожим со стандартным анализом, за исключением того, что после гидролиза ДНК образцы разбавляют буфером для протеиназы К и обрабатывают протеиназой К с последующей термоинактивацией. Нормально, образцы разбавляют буфером для протеиназы К в количестве, равном размеру образца. Буфер протеиназы К может иметь 2-кратную или более высокую концентрацию. Обычно, обработку протеиназой К проводят в количестве примерно 0,2 мг/мл, но эта величина может изменяться от 0,1 мг/мл до примерно 1 мг/мл. Стадию обработки обычно проводят при около 55°C в течение около 15 минут, но можно проводить при более низкой температуре (например, от около 37°C до около 50 °C) в течение большего периода времени (например, от около 20 минут до около 30 минут) или при более высокой температуре (например, до около 60 °C) в течение более короткого периода времени (например, от около 5 до 10 минут). Аналогично, термоинактивация обычно проводится при примерно 95°C в течение примерно 15 минут, но температура может быть более низкой (например, от примерно 70 до примерно 90 °C), а время более продолжительным (например, от примерно 20 минут до примерно 30 минут). Затем образцы разбавляют (например, 1000-кратно) и проводят анализ TaqMan, как описано для стандартного анализа.

Дополнительно или альтернативно, может быть использован метод капельной цифровой ПЦР (кцПЦР). Например, были описаны способы определения титров одноцепочечного и самокомплементарного генома ААВ-вектора методом кцПЦР. См., например, M. Lock et al, *Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

Способы определения соотношений между капсидными белками vp1, vp2 и vp3 также являются доступными. См., например, Vamseedhar Rayaprolu et al, *Comparative Analysis of Adeno-Associated Virus Capsid Stability and Dynamics, J Virol*. 2013 Dec; 87(24): 13150-13160; Buller RM, Rose JA. 1978. Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. *J. Virol.* 25:331-338; и Rose JA, Maizel JV, Inman JK, Shatkin AJ. 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J. Virol.* 8:766-770.

Следует понимать, что композиции в рААВ, описанных в данном документе должны рассматриваться как применимые к другим композициям, схемам, аспектам, вариантам осуществления изобретения, и способам, представленным в данном описании изобретения.

#### *Фармацевтическая композиция*

Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок hGAA780I или экспрессионную кассету, содержащую трансген слитого белка hGAA780I, может быть жидкой суспензией, лиофилизированной или замороженной композицией, или другим пригодным составом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция содержит слитый белок hGAA780I или экспрессионную кассету и физиологически совместимую жидкость (например, раствор, разбавитель, носитель), которые образуют суспензию. Такая жидкость предпочтительно имеет водную основу и может содержать один или несколько буферных агентов, поверхностно-активных веществ, регуляторов pH, консервантов или других подходящих вспомогательных веществ. Пригодные компоненты описаны более подробно ниже. Фармацевтическая композиция содержит водную суспендирующую жидкость и любые выбранные вспомогательные вещества, а также слитый белок hGAA780I или экспрессионную кассету.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит экспрессионную кассету, содержащую трансген и невирусную систему доставки. Она может включать, например, немодифицированную ДНК, немодифицированную РНК, неорганическую частицу, липидную или липидоподобную частицу, состав на основе хитозана, и другие, известные в данной области техники и описанные, например, в Ramamoorth and Narvekar, как указано выше). В других вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой суспензию, содержащую экспрессионную кассету, содержащую трансген, сконструированный в системе вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит нереплицирующийся вирусный вектор. Пригодные вирусные векторы могут включать любой пригодный вектор доставки, такой как, например, рекомбинантный аденовирус, рекомбинантный лентивирус, рекомбинантный бокавирус, рекомбинантный аденоассоциированный вирус (ААВ), или другой рекомбинантный парвовирус. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор представляет собой рекомбинантный ААВ для доставки генного продукта пациенту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит слитый белок hGAA780I или экспрессионную кассету, содержащие кодирующие последовательности слитого белка hGAA780I и буфер для лекарственной формы пригодный для доставки путем интрацеребровентрикулярной (ИЦВ), интратекальной (ИТ), интрацистернальной или внутривенной (ВВ) инъекции. В одном варианте осуществления изобретения, экспрессионная кассета является частью генома вектора, упакованного в рекомбинантный вирусный вектор (т.е. рААВ.hGAA780I,

несущий слитый белок).

В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит слитый белок hGAA780I или его функциональный фрагмент, для доставки субъекту в качестве заместительной ферментной терапии (ЗФТ). Такие фармацевтические композиции обычно вводят внутривенно, однако в некоторых обстоятельствах также возможно интрадермальное, внутримышечное или пероральное введение. Композиции могут быть введены для профилактического лечения особ, страдающих от, или с риском болезни Помпе. Для терапевтического применения, фармацевтические композиции вводят пациенту, страдающему от установленного заболевания, в количестве, достаточном для снижения концентрации накапливаемого метаболита и/или предотвращения или прекращения дальнейшего накопления метаболита. Для особ с риском заболевания дефицита лизосомального фермента, фармацевтические композиции вводят профилактически в количестве, достаточном для предотвращения или ингибирования накопления метаболита. Композиции модифицированного GAA, описанного в данном документе, вводят в терапевтически эффективном количестве. В общем, терапевтически эффективное количество может меняться в зависимости от тяжести медицинского состояния у субъекта, а также возраста, общего состояния и пола субъекта. Дозировки могут быть определены врачом и могут корректироваться по мере необходимости в зависимости от эффекта наблюдаемого лечения. В одном аспекте, в данном документе предусматривается фармацевтическая композиция для ЗФТ, составленная таким образом, чтобы она содержала единичную дозу слитого белка hGAA780I или его функционального фрагмента.

В одном варианте осуществления изобретения, композиция включает конечный состав, подходящий для доставки субъекту, например, представляет собой водную жидкую суспензию, забуференную до физиологически совместимых значений pH и концентрации соли. Необязательно, в композиции присутствует одно или несколько поверхностно-активных веществ. В другом варианте осуществления изобретения композицию можно транспортировать в виде концентрата, который разбавляют для введения субъекту. В других вариантах осуществления изобретения, композиция может быть лиофилизована и восстановлена во время введения.

В одном варианте осуществления изобретения, композиция, предусматриваемая в данном документе, содержит поверхностно-активное вещество, консервант, вспомогательные вещества и/или буфер, растворенные в водной суспендирующей жидкости. В одном варианте осуществления изобретения, буфер представляет собой ФСБ (фосфатно-солевой буфер). В другом варианте осуществления изобретения буфер представляет искусственную спинномозговую жидкость (aCSF), например буфер для состава Элиотта или жидкость для устройства перфузии Гарварда (искусственная CSF с конечными концентрациями ионов (в mM): Na 150; K 3,0; Ca 1,4; Mg 0,8; P 1,0; Cl 155). Известны различные пригодные растворы, включая содержащие что-то одно или несколько из: забуференного физиологического раствора, поверхностно-активного

вещества, и физиологически совместимой соли или смеси солей, доведенных до ионной силы, эквивалентной от примерно 100 мМ хлорида натрия (NaCl) до примерно 250 мМ хлорида натрия, или физиологически совместимой соли, доведенной до эквивалентной ионной концентрации.

Предпочтительно, состав доводят до физиологически приемлемого уровня pH, например, в диапазоне значений pH 6-8, или pH 6,5-7,5, pH 7,0-7,7, или pH 7,2-7,8. Поскольку pH спинномозговой жидкости имеет значение от примерно 7,28 до примерно 7,32, для интратекальной доставки может быть желательной величина pH в этом диапазоне; в то время как для внутривенной доставки может быть желательной величина pH от 6,8 до примерно 7,2. Однако, другие значения pH в очень широких диапазонах значений и их поддиапазонах могут быть выбраны для других путей доставки.

Пригодное поверхностно-активное вещество или комбинация поверхностно-активных веществ могут быть выбраны из неионных поверхностно-активных веществ, являющихся нетоксичными. В одном варианте осуществления изобретения, выбирают бифункциональное блок-сополимерное поверхностно-активное вещество с концевыми первичными гидроксильными группами, например, такое как плуроник (Pluronic®) F68 [BASF], также известное как поллоксамер (Poloxamer) 188, которое имеет нейтральное значение pH и средний молекулярный вес 8400. Могут быть выбраны другие поверхностно-активные вещества и другие поллоксамеры, т.е., неионные триблок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной полиоксипропиленовой цепи (поли(пропиленоксид)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксид)), SOLUTOL HS 15 (макрогол-15 гидроксистеарат), LABRASOL (глицерид полиоксикаприловой кислоты), простой полиокси-10 олеиловый эфир, твин (TWEEN) (сложные эфиры жирных кислот полиоксиэтиленсорбитана), этанол и полиэтиленгликоль. В одном варианте осуществления изобретения, состав содержит поллоксамер. Эти сополимеры обычно обозначают буквой «Р» (для поллоксамера), за которой следуют три цифры: первые две цифры x 100 дают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового остова, а последняя цифра x 10 дает содержание полиоксиэтилена в процентах. В одном варианте осуществления изобретения выбран поллоксамер 188. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в количестве до примерно 0,0005-0,001% от суспензии.

В одном примере, состав может содержать, например, забуференный физиологический раствор, содержащий что-то одно или несколько из хлорида натрия, бикарбоната натрия, декстрозы, сульфата магния (например, сульфата магния ·7H<sub>2</sub>O), хлорида калия, хлорида кальция (например, кальция хлорида ·2H<sub>2</sub>O), двухосновного фосфата натрия и их смесей, в воде. Пригодная для интратекальной доставки осмолярность находится в диапазоне значений, совместимом с цереброспинальной жидкостью (например, от примерно 275 до примерно 290); см., например, [emedicine.medscape.com/article/2093316-overview](http://emedicine.medscape.com/article/2093316-overview). Необязательно, для интратекальной доставки может быть использован коммерчески доступный разбавитель в качестве

суспендирующего агента или в комбинации с другим суспендирующим агентом и другими необязательными вспомогательными веществами. См., например, раствор Elliotts B® [Lukare Medical].

В других вариантах осуществления изобретения, состав может содержать один или несколько усилителей проницаемости. Примеры пригодных усилителей проницаемости могут включать, например, маннит, гликохолат натрия, таурохолат натрия, дезоксихолат натрия, салицилат натрия, каприлат натрия, капрат натрия, лаурилсульфат натрия, простой полиоксиэтилен-9-лауреловый эфир или ЭДТА

Дополнительно предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе. В контексте данного изобретения, «носитель» включает все без исключения растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты, буферы, растворы-носители, суспензии, коллоиды и т.п. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. Вспомогательные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции. Средства доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и т.п., могут быть использованы для введения композиций, описанных в данном документе, в пригодные клетки-хозяева. В частности, вектор рААВ может быть составлен для доставки либо инкапсулированным в липидной частице, липосоме, везикуле, наносфере, либо в наночастице и т.п. В одном варианте осуществления изобретения, в фармацевтическую композицию включают терапевтически эффективное количество вектора. Выбор носителя не является ограничительным для данного изобретения. Другие обычные фармацевтически приемлемые носители, такие как консерванты или химические стабилизаторы. Примеры пригодных консервантов включают хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновую кислоту, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол и пара-хлорфенол. Пригодные химические стабилизаторы включают желатин и альбумин.

Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным частицам и композициям, которые не вызывают аллергических или схожих неблагоприятных реакций при введении хозяину.

Используемый в данном документе термин «дозировка» или «количество» может относиться к общей дозе или количеству, доставленным субъекту в ходе лечения, или к дозе или количеству, доставленным при однократном (или многократном или дробном) введении.

Водные суспензии или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, предназначены для доставки субъектам, нуждающимся в этом, любым пригодным путем или комбинацией разных путей. В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическую композицию составляют для доставки путем

интрацеребровентрикулярной (ИЦВ), интратекальной (ИТ) или интрацистернальной инъекции. В одном варианте осуществления изобретения, композиции, описанные в данном документе предназначены для доставки субъектам, нуждающимся в этом, путем внутривенной инъекции. Альтернативно, могут быть выбраны другие пути введения (например, пероральный, ингаляцией, интраназальный, интратрахеальный, интраартериальный, внутриглазной, внутримышечный и другие парентеральные пути).

Используемые в данном документе термины «интратекальная доставка» или «интратекальное введение» относятся к пути введения лекарственных средств путем инъекции в спинномозговой канал, более конкретно, в субарахноидальное пространство, чтобы они попадали в спинномозговую жидкость (CSF). Интратекальная доставка может включать люмбальную пункцию, внутрижелудочковую, подглазничную/интрацистернальную и/или С1-2 пункцию. Например, материал может быть введен для диффузии в субарахноидальное пространство путем люмбальной пункции. В другом примере, может быть сделана инъекция в большую цистерну. Интрацистернальная доставка может увеличить диффузию вектора и/или снизить токсичность и вызываемое введением воспаление. См., например, Christian Hinderer et al, Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna, *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2014; 1: 14051. Онлайн-публикация 10 декабря 2014 г. doi: 10.1038/mtm.2014.51.

Используемые в данном документе термины «интрацистернальная доставка» или «интрацистернальное введение» относятся к пути введения лекарственных средств непосредственно в цереброспинальную жидкость желудочков головного мозга или в большую мозжечково-мозговую цистерну, более конкретно, путем подглазничной пункции, или прямой инъекцией в большую цистерну, или через постоянно установленную трубку.

В одном аспекте, в данном документе предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая вектор, как описано в данном документе, в буфере для лекарственной формы. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции вируса с дефектом репликации можно вводить в состав в единицах дозировки так, чтобы они содержали количество вируса с дефектом репликации в диапазоне от около  $1,0 \times 10^9$  GC до около  $1,0 \times 10^{16}$  GC (для лечения среднестатистического субъекта с массой тела 70 кг), в том числе все целые числа или дробные числа в указанном интервале, и предпочтительно от  $1,0 \times 10^{12}$  GC до  $1,0 \times 10^{14}$  GC для пациента-человека. В одном варианте осуществления изобретения композиции составлены так, что содержат по меньшей мере  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$  или  $9 \times 10^9$  GC на дозу, включая все целые числа и дробные числа в указанном интервале. В другом варианте осуществления изобретения композиции составлены так, что содержат по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$  или  $9 \times 10^{10}$  GC на дозу, включая все целые числа и дробные числа в указанном интервале. В другом варианте осуществления изобретения композиции составлены так, что содержат по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,

$3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$  или  $9 \times 10^{11}$  GC на дозу, включая все целые числа и дробные числа в указанном интервале. В другом варианте осуществления изобретения композиции составлены так, что содержат по меньшей мере  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$  или  $9 \times 10^{12}$  GC на дозу, включая все целые числа и дробные числа в указанном интервале. В другом варианте осуществления изобретения композиции составлены так, что содержат по меньшей мере  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$  или  $9 \times 10^{13}$  GC на дозу, включая все целые числа и дробные числа в указанном интервале. В другом варианте осуществления изобретения композиции составлены так, что содержат по меньшей мере  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$  или  $9 \times 10^{14}$  GC на дозу, включая все целые числа и дробные числа в указанном интервале. В другом варианте осуществления изобретения композиции составлены так, что содержат по меньшей мере  $1 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$  или  $9 \times 10^{15}$  GC на дозу, включая все целые числа и дробные числа в указанном интервале. В одном варианте осуществления изобретения для применения у людей доза может находиться в интервале от  $1 \times 10^{10}$  до около  $1 \times 10^{12}$  GC на дозу, включая все целые числа или дробные числа в указанном интервале.

В одном варианте осуществления изобретения предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая рААВ, как описано в данном документе, в буфере для лекарственной формы. В одном варианте осуществления изобретения рААВ введен в состав в количестве от около  $1 \times 10^9$  копий генома (GC)/мл до около  $1 \times 10^{14}$  GC/мл. В дополнительном варианте осуществления изобретения рААВ введен в состав в количестве от около  $3 \times 10^9$  GC/мл до около  $3 \times 10^{13}$  GC/мл. В дополнительном варианте осуществления изобретения рААВ введен в состав в количестве от около  $1 \times 10^9$  GC/мл до около  $1 \times 10^{13}$  GC/мл. В одном варианте осуществления изобретения рААВ введен в состав в количестве по меньшей мере около  $1 \times 10^{11}$  GC/мл.

В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическую композицию, содержащую рААВ, как описано в данном документе, можно вводить в дозе от около  $1 \times 10^9$  GC на грамм массы головного мозга до около  $1 \times 10^{14}$  GC на грамм массы головного мозга.

Следует понимать, что указанные композиции в фармацевтических композициях, описанных в данном документе, должны рассматриваться как применимые к другим композициям, схемам, аспектам, вариантам осуществления изобретения, и способам, представленным в данном описании изобретения.

#### *Способ лечения*

Предусматривается терапевтическая схема лечения пациента с болезнью Помпе, которая включает экспрессионную кассету, рААВ и/или слитый белок hGAA780I, как описано в данном документе, необязательно, в комбинации с иммуномодулятором. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациент имеет болезнь Помпе с поздним началом. В других вариантах осуществления изобретения, пациент болезнь

Помпе с началом в детском возрасте. В некоторых вариантах осуществления изобретения, проводится доставка сопутствующей терапии экспрессионной кассетой, рААВ, или слитым белком hGAA780I, такой как иммуномодулирующая схема лечения. Дополнительно или альтернативно, сопутствующая терапия может включать что-то одно или несколько из бронхолитика, ингибитора ацетилхолинэстеразы, тренировки силы дыхательных мышц (ТДМ), заместительной ферментной терапии и/или терапии стимуляцией диафрагмального нерва. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациент получает однократное введение рААВ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациент получает однократное введение композиции, содержащей экспрессионную кассету и/или рААВ, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такое однократное введение композиции, содержащей эффективное количество экспрессионной кассеты, включает по меньшей мере одно сопутствующее терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациенту вводят экспрессионную кассету, рААВ и/или слитый белок hGAA780I или, как описано в данном документе, двумя разными путями по существу одновременно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, два разных пути инъекции представляют собой внутривенное и интратекальное введение. В одном варианте осуществления изобретения, композицию в виде суспензии доставляют субъекту интрацеребровентрикулярно, интратекально, интрацистернально или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациенту с дефицитом альфа-глюкозидазы вводят композицию, предусматриваемую в данном документе, для улучшения одной или нескольких из функций сердца, дыхания и/или скелетных мышц. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в результате лечения наблюдается снижение накопления гликогена и/или накопления аутофагосом в чем-то одном или нескольких из сердца, ЦНС (головного мозга) и/или скелетных мышц.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионная кассета, рААВ, вирусный или невирусный вектор используются в производстве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления изобретения предусматривается использование композиции для лечения болезни Помпе.

Такие композиции могут быть использованы в комбинации с другими терапиями, включая, например, иммунотерапии, заместительную ферментную терапию (например, лумизим (Lumizyme), выпущенный на рынок компанией Genzyme, принадлежащей Sanofi Corporation, и под названием миозим (Myozyme) за пределами США). Дополнительное лечение болезни Помпе является симптоматическим и поддерживающим. Например, может потребоваться респираторная поддержка; физиотерапия может быть полезной для усиления дыхательных мышц; некоторые пациенты могут нуждаться в искусственном дыхании посредством искусственной вентиляции легких (т.е. двухфазная вентиляция с положительным давлением в дыхательных путях (bipap) или аппараты объемной вентиляции легких) ночью и/или периодически в течение дня. Кроме того, может потребоваться дополнительная поддержка при инфекциях дыхательных путей.

Ортопедические устройства, включая ортодонтические скобы, могут быть рекомендованы некоторым пациентам. Хирургическое вмешательство может быть необходимо при некоторых ортопедических симптомах, таких как контрактуры или деформация позвоночника. Некоторым младенцам может потребоваться трубка для кормления, которую вводят через нос, по пищеводу и в желудок (назогастральный зонд). Некоторым детям может потребоваться введение питательной трубки непосредственно в желудок через небольшое хирургическое отверстие в брюшной стенке. Некоторым людям с поздним началом болезни Помпе может потребоваться жидкая пища, но лишь немногие из них нуждаются в питательных трубках.

Хотя ЗФТ значительно улучшает выживаемость пациентов с классической детской болезнью Помпе, она не способна полностью обратить патологию скелетных мышц, частично вследствие аутофагического разрастания, которое препятствует попаданию фермента в лизосому. Мы показали, что композиции, представленные в данном документе, являются эффективными для лечения и обращения мышечной патологии. Например, аутофагосомное накопление было полностью разрешено у взрослых мышей с болезнью Помпе с уже существующей патологией на момент лечения. Данные также демонстрируют, что лечение векторами, представленными в данном документе, может значительно увеличивать процент крупных мышечных волокон и уменьшать процент небольших мышечных волокон в скелетной мышце. Следовательно, обычные патологии, устойчивые к лечению, такие как размер мышечных волокон и аутофагическое разрастание являются чувствительными к лечению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в данном документе представлены способы снижения прогрессирования аномальной мышечной патологии и/или обращения аномальной мышечной патологии у пациента с диагностированным заболеванием Помпе или у которого подозревается заболевание Помпе. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента еще не появилось симптомов. В других вариантах осуществления изобретения у пациента появились симптомы, включая возрастных пациентов с более запущенными стадиями заболеваниями, и лечение включает улучшение (или обращение) симптомов заболевания Помпе. В некоторых вариантах осуществления изобретения аномальная мышечная патология характеризуется одним или более из: i) повышенной доли мышечных клеток с центральным ядром; ii) атрофией мышечных волокон, iii) анизоцитозом в клетках мышечных волокон, iv) и аутофагическим разрастанием, v) вакуолизацией и vi) слабостью. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы улучшают дыхание и/или движение пациента.

Как описано в данном документе, термины «увеличение» (например, увеличение уровней hGAA после лечения с использованием слитого белка hGAA780I, определяемое по результатам измерений в ткани, крови и т.д.) или «снижение», «уменьшение», «ослабление», «улучшение», «задержка», или любые их грамматические варианты, или любые схожие термины, указывающие на изменение, означают изменение примерно в 5 раз, примерно в 2 раза, примерно в 1 раз, примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%,

примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10%, или примерно 5% по сравнению с соответствующим эталоном (например, контролем без лечения или субъектом в нормальном состоянии без болезни Помпе), если не указано иное.

«Пациент» или «субъект», используемые в контексте данного изобретения взаимозаменяемо, означают самца или самку млекопитающего животного, включая человека, животное, подлежащее ветеринарному лечению, или сельскохозяйственное животное, домашнее животное или питомца, и животных, обычно используемых для клинических исследований. В одном варианте осуществления изобретения, субъектом таких способов и композиций является человек. В одном варианте осуществления изобретения, субъектом таких способов и композиций является мужчина или женщина.

В одном варианте осуществления изобретения, суспензия имеет значение pH от примерно 7,28 до примерно 7,32.

Пригодные объемы для доставки таких доз и концентраций могут быть определены специалистом в данной области техники. Например, могут быть выбраны объемы от около 1 мкл до 150 мл, причем большие объемы выбраны для взрослых. Как правило, для новорожденных младенцев пригодный объем составляет от около 0,5 мл до около 10 мл, для младенцев постарше могут быть выбраны от около 0,5 мл до около 15 мл. Для детей раннего возраста может быть выбран объем, составляющий от около 0,5 мл до около 20 мл. Для детей дошкольного возраста могут быть выбраны объемы до около 30 мл. Для детей школьного возраста и подростков могут быть выбраны объемы до около 50 мл. В других вариантах осуществления изобретения пациенту могут осуществлять интратекальное введение в объеме от около 5 мл до около 15 или от около 7,5 мл до около 10 мл. Могут быть определены другие пригодные объемы и дозировки. Дозировка будет корректироваться таким образом, чтобы сбалансировать терапевтический эффект с любыми побочными эффектами, и такие дозировки могут варьироваться в зависимости от терапевтического применения, в котором используется рекомбинантный вектор.

В одном варианте осуществления изобретения композицию, содержащую pAAB, как описано в данном документе, можно вводить в дозе от около  $1 \times 10^9$  GC на грамм массы головного мозга до около  $1 \times 10^{14}$  GC на грамм массы головного мозга. В некоторых вариантах осуществления изобретения, pAAB вводят системно при совместном введении в дозе от около  $1 \times 10^9$  GC на кг массы тела до около  $1 \times 10^{13}$  GC на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, pAAB вводят системно при совместном введении в дозе от около  $1 \times 10^{11}$  GC на кг массы тела до около  $5 \times 10^{13}$  GC на кг массы тела.

В одном варианте осуществления изобретения, субъекту доставляют терапевтически эффективное количество экспрессионной кассеты, pAAB или слитого белка hGAA780I, описанных в данном документе. В контексте данного изобретения, «терапевтически эффективное количество» относится к количеству экспрессионной кассеты, pAAB или слитого белка hGAA780I, или их комбинации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает введение субъекту

рААВ или экспрессионной кассеты для доставки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок hGAA780I, в комбинации с введением композиции, содержащей слитый белок фермента hGAA780I, предусматриваемый в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретения экспрессионная кассета представляет собой векторный геном, доставляемый в количестве от около  $1 \times 10^9$  GC на грамм массы головного мозга до около  $1 \times 10^{13}$  копий генома (GC) на грамм (г) массы головного мозга, включая все целые числа или дробные числа в указанном диапазоне и между указанными конечными точками. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет от  $1 \times 10^{10}$  GC на грамм массы головного мозга до около  $1 \times 10^{13}$  GC на грамм массы головного мозга. В конкретных вариантах осуществления изобретения доза вектора, вводимого пациенту, составляет по меньшей мере около  $1,0 \times 10^9$  GC/г, около  $1,5 \times 10^9$  GC/г, около  $2,0 \times 10^9$  GC/г, около  $2,5 \times 10^9$  GC/г, около  $3,0 \times 10^9$  GC/г, около  $3,5 \times 10^9$  GC/г, около  $4,0 \times 10^9$  GC/г, около  $4,5 \times 10^9$  GC/г, около  $5,0 \times 10^9$  GC/г, около  $5,5 \times 10^9$  GC/г, около  $6,0 \times 10^9$  GC/г, около  $6,5 \times 10^9$  GC/г, около  $7,0 \times 10^9$  GC/г, около  $7,5 \times 10^9$  GC/г, около  $8,0 \times 10^9$  GC/г, около  $8,5 \times 10^9$  GC/г, около  $9,0 \times 10^9$  GC/г, около  $9,5 \times 10^9$  GC/г, около  $1,0 \times 10^{10}$  GC/г, около  $1,5 \times 10^{10}$  GC/г, около  $2,0 \times 10^{10}$  GC/г, около  $2,5 \times 10^{10}$  GC/г, около  $3,0 \times 10^{10}$  GC/г, около  $3,5 \times 10^{10}$  GC/г, около  $4,0 \times 10^{10}$  GC/г, около  $4,5 \times 10^{10}$  GC/г, около  $5,0 \times 10^{10}$  GC/г, около  $5,5 \times 10^{10}$  GC/г, около  $6,0 \times 10^{10}$  GC/г, около  $6,5 \times 10^{10}$  GC/г, около  $7,0 \times 10^{10}$  GC/г, около  $7,5 \times 10^{10}$  GC/г, около  $8,0 \times 10^{10}$  GC/г, около  $8,5 \times 10^{10}$  GC/г, около  $9,0 \times 10^{10}$  GC/г, около  $9,5 \times 10^{10}$  GC/г, около  $1,0 \times 10^{11}$  GC/г, около  $1,5 \times 10^{11}$  GC/г, около  $2,0 \times 10^{11}$  GC/г, около  $2,5 \times 10^{11}$  GC/г, около  $3,0 \times 10^{11}$  GC/г, около  $3,5 \times 10^{11}$  GC/г, около  $4,0 \times 10^{11}$  GC/г, около  $4,5 \times 10^{11}$  GC/г, около  $5,0 \times 10^{11}$  GC/г, около  $5,5 \times 10^{11}$  GC/г, около  $6,0 \times 10^{11}$  GC/г, около  $6,5 \times 10^{11}$  GC/г, около  $7,0 \times 10^{11}$  GC/г, около  $7,5 \times 10^{11}$  GC/г, около  $8,0 \times 10^{11}$  GC/г, около  $8,5 \times 10^{11}$  GC/г, около  $9,0 \times 10^{11}$  GC/г, около  $9,5 \times 10^{11}$  GC/г, около  $1,0 \times 10^{12}$  GC/г, около  $1,5 \times 10^{12}$  GC/г, около  $2,0 \times 10^{12}$  GC/г, около  $2,5 \times 10^{12}$  GC/г, около  $3,0 \times 10^{12}$  GC/г, около  $3,5 \times 10^{12}$  GC/г, около  $4,0 \times 10^{12}$  GC/г, около  $4,5 \times 10^{12}$  GC/г, около  $5,0 \times 10^{12}$  GC/г, около  $5,5 \times 10^{12}$  GC/г, около  $6,0 \times 10^{12}$  GC/г, около  $6,5 \times 10^{12}$  GC/г, около  $7,0 \times 10^{12}$  GC/г, около  $7,5 \times 10^{12}$  GC/г, около  $8,0 \times 10^{12}$  GC/г, около  $8,5 \times 10^{12}$  GC/г, около  $9,0 \times 10^{12}$  GC/г, около  $9,5 \times 10^{12}$  GC/г, около  $1,0 \times 10^{13}$  GC/г, около  $1,5 \times 10^{13}$  GC/г, около  $2,0 \times 10^{13}$  GC/г, около  $2,5 \times 10^{13}$  GC/г, около  $3,0 \times 10^{13}$  GC/г, около  $3,5 \times 10^{13}$  GC/г, около  $4,0 \times 10^{13}$  GC/г, около  $4,5 \times 10^{13}$  GC/г, около  $5,0 \times 10^{13}$  GC/г, около  $5,5 \times 10^{13}$  GC/г, около  $6,0 \times 10^{13}$  GC/г, около  $6,5 \times 10^{13}$  GC/г, около  $7,0 \times 10^{13}$  GC/г, около  $7,5 \times 10^{13}$  GC/г, около  $8,0 \times 10^{13}$  GC/г, около  $8,5 \times 10^{13}$  GC/г, около  $9,0 \times 10^{13}$  GC/г, около  $9,5 \times 10^{13}$  GC/г или около  $1,0 \times 10^{14}$  GC/г массы головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию, содержащую рААВ, как описано в данном документе, вводят систематически в дозировке от около  $1 \times 10^{11}$  GC на кг массы тела до около  $5 \times 10^{13}$  GC на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления изобретения рААВ вводят посредством ИСМ в дозировке от около  $1 \times 10^{12}$  GC до около  $5 \times 10^{13}$  GC. В других вариантах осуществления изобретения рААВ вводят совместно посредством внутривенного и ИСМ путей, при этом пациенту вводят дозировку

от около  $1 \times 10^{11}$  GC на кг массы тела до  $5 \times 10^{13}$  GC на кг массы тела (в/в) и в дозировке от около  $1 \times 10^{12}$  GC до около  $5 \times 10^{13}$  GC (ICM).

В одном варианте осуществления изобретения, способ лечения включает доставку слитого белка hGAA780I в качестве заместительной ферментной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, слитый белок hGAA780I доставляют в качестве ЗФТ в комбинации с генной терапией (включая, без ограничений, экспрессионную кассету или рААВ, как предусматривается в данном документе). В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает введение субъекту более чем одной ЗФТ (например, композиции, содержащей слитый белок hGAA780I в комбинации с другим терапевтическим белком, таким как лумизим). Композиция, содержащая слитый белок hGAA780I, описанный в данном документе, может вводиться субъекту каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше дней. Введение может осуществляться путем внутривенной инфузии амбулаторному пациенту, которому прописано введение еженедельно, ежемесячно или раз в два месяца. Соответствующие терапевтически эффективные дозы соединений подбираются лечащим врачом и включают от примерно 1 мкг/кг до примерно 500 мг/кг, от примерно 10 мг/кг до примерно 100 мг/кг, от примерно 20 мг/кг до примерно 100 мг/кг и от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пригодную терапевтическую дозу выбирают из, например, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 и 100 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает введение субъекту слитого белка hGAA780I в дозе 10 мг/кг массы тела пациента или больше в неделю. Часто дозировки превышают 10 мг/кг в неделю. Режимы дозирования могут варьироваться от 10 мг/кг в неделю до по меньшей мере 1000 мг/кг в неделю. Обычными режимами дозирования являются 10 мг/кг в неделю, 15 мг/кг в неделю, 20 мг/кг в неделю, 25 мг/кг в неделю, 30 мг/кг в неделю, 35 мг/кг в неделю, 40 мг/кг в неделю, 45 мг/кг в неделю, 60 мг/кг в неделю, 80 мг/кг в неделю и 120 мг/кг в неделю. В предпочтительных режимах, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг или 40 мг/кг вводят один, два или три раза еженедельно. Лечение обычно продолжается по меньшей мере 4 недели, иногда 24 недели, и иногда на протяжении жизни пациента. Необязательно, уровни альфа-глюкозидазы человека контролируют после лечения (например, в плазме или мышцах) и вводят дополнительную дозу, если будет обнаружено существенное снижение значений определяемых уровней по сравнению с нормальными особами (например, менее 20%). В одном варианте осуществления изобретения, hGAA780I вводят первоначально с «высокой» дозой (т.е. «ударная доза»), с последующим введением более низких доз (т.е. «поддерживающая доза»). Примером ударной дозы является по меньшей мере примерно 40 мг/кг массы тела пациента 1-3 раза в неделю (например, в течение 1, 2 или 3 недель). Примером поддерживающей дозы является по меньшей мере от примерно 5 до по меньшей мере примерно 10 мг/кг массы тела пациента в неделю или больше, например, 20 мг/кг в неделю, 30 мг/кг в неделю, 40 мг/кг в неделю. В некоторых вариантах осуществления изобретения, дозы вводят по нарастающей в течение периода введения

доз. Это может быть достигнуто путем увеличения скорости потока при внутривенной инфузии или путем использования градиента возрастающей концентрации слитого белка hGAA780I при введении с постоянной скоростью. Введение в такой способ может снижать риск иммуногенной реакции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутривенная инфузия проводится на протяжении периода нескольких часов (например, 1-10 часов, предпочтительно, 2-8 часов, более предпочтительно, 3-6 часов), причем скорость инфузии увеличивается через определенные промежутки времени в течение периода введения.

В одном варианте осуществления изобретения, способ дополнительно включает получение субъектом иммуносупрессивной сопутствующей терапии. Иммунодепрессанты для такой сопутствующей терапии включают, без ограничений, глюкокортикоид, стероиды, антиметаболиты, ингибиторы Т-клеток, макролид (например, рапамицин или рапалог), и цитостатические агенты, включая алкилирующий агент, антиметаболит, цитотоксичный антибиотик, антитело или агент, воздействующий на иммунофилин. Иммунодепрессант может включать азотистый иприт, нитрозомочевину, соединение платины, метотрексат, азатиоприн, меркаптопурин, фторурацил, дактиномицин, антрациклин, митомицин С, блеомицин, митрамицин, антитела, нацеленные на рецептор ИЛ-2 или CD3, анти-ИЛ-2 антитела, циклоспорин, такролимус, сиролимус, ИФН- $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , опиоид или связывающий агент ФНО- $\alpha$  (фактор некроза опухоли-альфа). В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммуносупрессивная терапия может быть начата за 0, 1, 2, 7 или больше дней до введения генной терапии. Одно или несколько таких лекарственных средств может продолжаться после введения генной терапии, в той же дозе или откорректированной дозе. Такая терапия может продолжаться в течение примерно 1 недели (7 дней), примерно 60 дней или дольше, в зависимости от необходимости.

В одном варианте осуществления изобретения, композицию, содержащую экспрессионную кассету, как описано в данном документе, вводят один раз нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионную кассету доставляют с помощью рААВ. Следует понимать, что композиции и способ, описанные в данном документе, должны рассматриваться как применимые к другим композициям, схемам, аспектам, вариантам осуществления изобретения и способам, описанным в данном описании изобретения.

Композиции и способы, предусматриваемые в данном документе, могут быть использованы для лечения инфантильной формы болезни Помпе или болезни Помпе с поздним началом и/или ассоциированных с ней симптомов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективность может быть определена по улучшению одного или нескольких симптомов заболевания или замедлению прогрессирования заболевания. Симптомы инфантильной формы болезни Помпе включают, без ограничений, гипотонию, респираторные/дыхательные проблемы, гепатомегалию, гипертрофическую кардиомиопатию, а также накопление гликогена в сердце, мышцах, ЦНС (особенно, в двигательных нейронах). Симптомы болезни Помпе с поздним началом

включают, без ограничений, слабость проксимальных мышц, респираторные/дыхательные проблемы, а также накопление гликогена в мышцах и двигательных нейронах. Путь введения может быть определен на основании состояния и/или диагноза пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, предусматривается способ лечения пациента с диагнозом инфантильной формы болезни Помпе или болезни Помпе с поздним началом, который включает введение рААВ, описанного в данном документе, для доставки слитого белка hGAA780I с использованием комбинации путей внутривенного (ВВ) введения и введения в большую цистерну (ICM). В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациенту, идентифицированному как имеющему болезнь Помпе с поздним началом, проводят лечение, включающее только системную доставку рААВ (например, только ВВ). Как описано в данном документе, доставка композиции, содержащей рААВ, может осуществляться в комбинации с заместительной ферментной терапией (ЗФТ). В некоторых вариантах осуществления изобретения, предусматривается способ лечения субъекта с диагнозом болезни Помпе, включающий доставку в большую цистерну рААВ, описанного в данном документе, в комбинации с ЗФТ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субъекту, идентифицированному как имеющего инфантильную форму болезни Помпе, вводят рААВ, описанный в данном документе, путем инъекции в большую цистерну, и также проводят ЗФТ для лечения аспектов периферического заболевания.

«Нуклеиновая кислота», как описано в данном документе, может представлять собой РНК, ДНК или их модификации и может быть одно- или двухцепочечной, и может быть выбрана, например, из группы, включающей: нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, представляющий интерес, олигонуклеотиды, аналоги нуклеиновой кислоты, например пептидо-нуклеиновую кислоту (PNA), псевдокомплементарную PNA (pc-PNA), замкнутую нуклеиновую кислоту (LNA) и т.д. Такие последовательности нуклеиновой кислоты включают, например, но не ограничиваясь ими, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белки, например, которые действуют как репрессоры транскрипции, антисмысловые молекулы, рибозимы, малые ингибирующие последовательности нуклеиновой кислоты, например, но не ограничиваясь этим, РНКи, кшРНКи, миРНК, микроРНКи (mRNAi), антисмысловые олигонуклеотиды и т.д.

Способы «обратной трансляции» белка, пептида или полипептида известны специалистам в данной области техники. Когда последовательность белка известна, существуют основанные на использовании интернет-ресурсов и коммерчески доступные компьютерные программы, а также компании, предоставляющие услуги по обратной трансляции последовательностей аминокислот в кодирующие последовательности нуклеиновых кислот. См., например, `backtranseq` из пакета EMBOSS (доступна онлайн на сайте [ebi.ac.uk/Tools/st](http://ebi.ac.uk/Tools/st)); Gene Infinity (доступна онлайн на сайте [geneinfinity.org/sms/sms\\_-backtranslation.html](http://geneinfinity.org/sms/sms_-backtranslation.html)); ExPasy (доступна онлайн [expasy.org/tools/](http://expasy.org/tools/)). В одном варианте осуществления изобретения, кодирующие последовательности РНК и/или кДНК конструируют для оптимальной экспрессии в клетках человека.

Термин «процент (%) идентичности», «идентичность последовательности», «процент идентичности последовательности» или «процентная идентичность», в контексте последовательности нуклеиновых кислот, относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании на соответствие. Длиной последовательности при сравнении на идентичность может быть полный геном, полная длина кодирующей последовательности гена или, желательнее, фрагмент, состоящий из по меньшей мере примерно 500-5000 нуклеотидов. Однако, может быть желательным также определение идентичности меньших по размеру фрагментов, например, состоящих из по меньшей мере примерно девяти нуклеотидов, обычно, по меньшей мере примерно 20-24 нуклеотидов, по меньшей мере примерно 28-32 нуклеотидов, по меньшей мере примерно 36 или больше нуклеотидов.

Процент идентичности может быть легко определен для аминокислотных последовательностей полноразмерного белка, полипептида, примерно 32 аминокислот, примерно 330 аминокислот, или их пептидного фрагмента, или соответствующих кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты. Пригодный аминокислотный фрагмент может иметь длину по меньшей мере примерно 8 аминокислот, и может содержать до примерно 700 аминокислот. Обычно, при указании на «идентичность», «гомологию» или «сходство» между двумя разными последовательностями, «идентичность», «гомологию» или «сходство» определяют по отношению к «выровненным» последовательностям. «Выровненные» последовательности или «выравнивания» относятся к множественным последовательностям нуклеиновых кислот или белковым (аминокислотным) последовательностям, часто содержащим поправки на недостающие или дополнительные основания или аминокислоты по сравнению с эталонной последовательностью.

Выравнивание выполняется с помощью любой из множества общедоступных или коммерческих программ выравнивания множественных последовательностей. Имеются программы для выравнивания аминокислотных последовательностей, например, программы «Clustal X», «Clustal Omega», «MAP», «PIMA», «MSA», «BLOCKMAKER», «MEME» и «Match-Box». Обычно, любые такие программы используются с настройками по умолчанию, хотя специалист в данной области может при необходимости изменить такие настройки. Альтернативно, специалист в данной области техники может использовать другой алгоритм или компьютерную программу, которые имеют по меньшей мере такой же уровень идентичности или выравнивания, как и обеспечиваемый указанными алгоритмами и программами. См., например, J. D. Thompson et al., Nucl. Acids. Res., 27(13):2682-2690 (1999).

Также доступны программы выравнивания множественных последовательностей нуклеиновых кислот. Примеры таких программ включают «Clustal W», «Clustal Omega», «CAP Sequence Assembly», «BLAST», «MAP» и «MEME», которые доступны с веб-серверов в интернете. Другие источники таких программ известны специалистам в данной области техники. Альтернативно, также используются функции вектора NTI. Также есть

ряд алгоритмов, известных в данной области техники, которые можно использовать для идентичности нуклеотидной последовательности, включая те, которые содержатся в программах, описанных выше. В качестве другого примера полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с использованием Fasta™, программы в GCG версии 6.1. Fasta™ дает выравнивание и процент идентичности последовательности областей с наибольшим перекрытием между запрашиваемой и изученной последовательностями. Например, процент идентичности между последовательностями нуклеиновых кислот может быть определен с использованием Fasta™ с параметрами по умолчанию (размер слова 6 и опция NOPAM для матрицы оценок), предусматриваемыми в GCG версии 6.1, включенном в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин «регуляторная последовательность» или «последовательность контроля экспрессии» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, таким как инициаторные последовательности, энхансерные последовательности и промоторные последовательности, которые индуцируют, репрессируют или иначе контролируют транскрипцию последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белок, с которыми они функционально связаны.

Термин «экзогенный» при использовании для описания последовательности нуклеиновой кислоты или белка означает, что нуклеиновая кислота или белок не встречаются в природе в том положении, в котором они находятся в хромосоме или клетке-хозяине. Экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты также относится к последовательности, полученной из тех же клетки-хозяина или субъекта, и вставленной в них же, но присутствующей в неприродном состоянии, например, с другим числом копий или под контролем других регуляторных элементов.

Термин «гетерологичный» при использовании для описания последовательности нуклеиновой кислоты или белка означает, что нуклеиновая кислота или белок были получены из другого организма или от другого вида, отличных от организма клетки-хозяина или от субъекта, в которых они экспрессируются. Термин «гетерологичный» при использовании по отношению к белку или нуклеиновой кислоте в плазмиде, экспрессионной кассете или векторе, указывает, что белок или нуклеиновая кислота имеет другую последовательность или субпоследовательность, с которыми указанные белок или нуклеиновая кислота не встречаются в природе в таких же отношениях друг с другом.

«Содержащий» представляет собой термин, означающий включение других компонентов или стадий способа. При использовании термина «содержащий» следует понимать, что родственные варианты осуществления изобретения включают описания с использованием словосочетания «состоящий из», исключающего другие компоненты или стадии способа, и словосочетания «состоящий по существу из», исключающего любые компоненты или стадии способа, которые существенно изменяют сущность варианта осуществления или изобретения. Следует понимать, что хотя в описании изобретения различные варианты осуществления изобретения представлены с использованием формулировки «содержащий», в различных обстоятельствах соответствующий вариант

осуществления также описывается с использованием формулировок «состоящий из» или «состоящий по существу из».

Используемый в данном документе термин «е» со следующим за ним численным значением (nn) относится к показателю степени, и этот термин используется взаимозаменяемо с «х 10nn». Например,  $3e13$  является эквивалентом  $3 \times 10^{13}$ .

Следует отметить, что термин, используемый в единственном числе, относится к одному или нескольким, например, «вектор» следует понимать как обозначающий один или несколько векторов. По существу, термины в единственном числе, «один или несколько» и «по меньшей мере один» используются в данном документе взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин «около» означает возможность отклонений плюс-минус 10% от приведенного опорного значения, если не указано иное.

#### ПРИМЕРЫ

Далее изобретение будет описано со ссылками на следующие примеры. Эти примеры представлены только с иллюстративными целями, и изобретение никоим образом не должно рассматриваться как ограниченное этими примерами, и должно охватывать любые и все варианты, которые будут очевидными из описания, приведенного в данном документе.

#### ПРИМЕР 1: МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

##### *Продуцирование вектора*

Эталонную последовательность GAA с Val в положении 780, и последовательность с мутацией V780I подвергли обратной трансляции, и была сконструирована нуклеотидная последовательность для получения цис-плазмид для продуцирования AAV с использованием экспрессионных кассет под промотором CAG. Кроме того, последовательность кДНК природного hGAA (эталонная последовательность) клонировали в тот же каркас цис-AAV для сравнения с несконструированной последовательностью. Векторы AAVhu68 также продуцировали и титровали, как описано ранее. (Lock, et al. 2010, Hum Gene Ther 21(10): 1259-1271). Вкратце, клетки HEK293 подвергли тройной трансфекции и культуральный супернатант собирали, концентрировали и очищали с градиентом йодиксанола. Очищенные векторы титровали методом цифровой капельной ПЦР с использованием праймеров, нацеленных на полиА-последовательность бета-глобина кролика, как было описано ранее (Lock, et al. (2014). Hum Gene Ther Methods 25(2): 115-125).

##### *Животные*

##### *Мыши*

Мыши-основатели с болезнью Помпе (Gaa-нокаут (-/-), генетический фон C57BL/6/129) были закуплены у фирмы Jackson Labs (порода №004154, также известная как мыши бпео). Размножающаяся колония содержалась в аккредитованном AAALAC (Ассоциация по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными) барьерном комплексе для мышей Программы генной терапии с использованием спаривания

гетерозигот с гетерозиготами для получения нуль-мышей и контролей дикого типа (ДТ) в одном помете. Gaa-нокаутные мыши являются широко используемой моделью болезни Помпе. Они демонстрируют прогрессирующее накопление лизосомального гликогена в сердце, центральной нервной системе, скелетных мышцах и диафрагме, с пониженной подвижностью и прогрессирующей мышечной слабостью. Небольшой размер, воспроизводимый фенотип и эффективное разведение позволяют быстро проводить исследования, оптимальные для *in vivo* доклинического скрининга кандидатов.

Помещения для содержания животных поддерживались при температуре в диапазоне 64-79°F (18-26°C) и влажности 30-70%.

Животных содержали с их родителями и особями из того же помета до отъема, а затем в стандартных клетках по два-пять животных на клетку в виварии Программы генной терапии (GTP) Translational Research Laboratories (TRL). Все размеры клеток и условия содержания соответствовали Руководству по содержанию и использованию лабораторных животных. Клетки, бутылки с водой и подстилочные субстраты автоклавируются для использования в барьерном комплексе.

Поддерживался автоматически контролируемый 12-часовой цикл свет/темнота. Каждый период темноты начинался в 19-00 часов ( $\pm 30$  минут). Доступ к корму без ограничений (Purina, LabDiet®, 5053, облученный, PicoLab®, Rodent Diet 20, 25 фунтов (11,34 кг)). Вода была доступна для всех животных без ограничений посредством индивидуально установленной поилки в каждой клетке для проживания. Емкости с водой заменяли, как минимум, раз в неделю при еженедельной смене клеток. Водоснабжение осуществлялось из г. Филадельфия, и воду хлорировали с помощью водоочистителя Getinge. Уровни хлорирования проверяли ежедневно ULAR (верхний водораздел реки Лос-Анджелес), и поддерживались на уровне 2-4 частей на миллион (млн-1, ppm). Материал для гнезд Nestlets™ помещали в каждую клетку для улучшения условий содержания.

#### *In vivo* исследования и гистология

Мышам вводили дозу  $5 \times 10^{11}$  GC (приблизительно  $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг) или дозу  $5 \times 10^{10}$  GC (приблизительно  $2,5 \times 10^{12}$  GC/кг) AAVhu68.CAG.hGAA (различные конструкторы hGAA) в 0,1 мл через боковую хвостовую вену (BB), брали кровь в День 7 и День 21 после введения вектора для выделения сыворотки, и полностью обескровливали (для выделения плазмы) и подвергали эвтаназии путем обескровливания через 28 дней после инъекции. Быстро собирали ткани, начиная с головного мозга.

Ткани для гистологии фиксировали формалином и заливали парафином с использованием стандартных методов. Срезы головного и спинного мозга окрашивали люксолом прочным синим (набор для окрашивания люксолом прочным синим, Abscam ab150675), а периферические органы окрашивали ШИК-реакцией (периодная кислота-реактив Шиффа) с использованием стандартных методов для выявления в тканях полисахаридов, таких как гликоген. Иммуноокрашивание на hGAA проводили на фиксированных формалином залитых парафином образцах. Срезы депарафинизировали,

кипятили в 10 мМ цитратном буфере (рН 6,0) для извлечения антигена, блокировали 1% ослиной сыворотки в ФСБ+0,2% тритона в течение 15 мин, и затем инкубировали поочередно с первичным (Sigma HPA029126 анти-hGAA антитело) и биотинилированным вторичным антителами, разбавляли блокирующим буфером; использовали колориметрическую реакцию на основе HRP (пероксидаза хрена) для детектирования сигнала.

Препараты анализировал в слепом режиме сертифицированным министерством здравоохранения ветеринарный патологоанатом. Была разработана полуколичественная система оценки для измерения тяжести связанных с болезнью Помпе гистологических поражений в мышцах (накопление гликогена и накопление аутофагосом), определяемых по суммарному проценту клеток, демонстрирующих накопление и/или вакуоли:

#### Гистологическая оценка накопления

0	0%
1	от 1 до 9%
2	от 10 до 49%
3	от 50 до 74%
4	от 75 до 100%

Также оценивали связанные с вектором гистопатологические поражения в соответствующих случаях.

#### *Нечеловекообразные приматы*

Для введения вектора, макак-резусов усыпляли дексмететомидином и кетаминном внутримышечно и делали одну инъекцию в большую цистерну (ICM) или внутривенную инъекцию. Положение иглы проверяли с помощью миелографии с использованием флуороскопа (OEC9800 C-Arm, GE), как описано ранее (Katz N, et al. Hum Gene Ther Methods. 2018 Oct;29(5):212-219). Животных подвергали эвтаназии путем передозировки барбитуратов. Собранные ткани немедленно замораживали на сухом льду или фиксировали в 10% формалине для гистологии.

#### *Характеризация действия фермента hGAA780I in vitro*

##### *Активность GAA*

Плазму или супернатант гомогенизированных тканей смешивали с 5,6 мМ 4-MU- $\alpha$ -глюкопиранозидом, рН 4,0, и инкубировали в течение три часов при 37 °С. Реакцию останавливали 0,4 М карбонатом натрия, рН 11,5. Показатели в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ) измеряли с использованием флуориметра Victor3, возбуждение при 355 нм и эмиссия при 460 нм. Активность, выраженную в нмоль/мл/ч, рассчитывают путем интерполяции по калибровочной кривой для 4-MU (4-метилумбеллиферон). Уровни активности в образцах индивидуальных тканей нормировали по общему содержанию белка в супернатанте гомогената. Для образцов плазмы использовали равные объемы.

##### *Определение сигнатурного пептида GAA методом ЖХ/МС*

Плазму осаждали в 100% метаноле и центрифугировали. Супернатанты

отбрасывали. В осадок добавляют уникальный для hGAA пептид, меченный стабильным изотопом, в качестве внутреннего стандарта, ресуспендируют с трипсином и инкубируют при 37°C в течение часа. Гидролиз останавливают 10% муравьиной кислотой. Пептиды разделяют С-18 обращеннофазовой хроматографией и идентифицируют и проводят количественные определения методом масс-спектропии с ионизацией электрораспылением (ESI). Общую концентрацию GAA в плазме рассчитывают по концентрации сигнатурного пептида.

*Анализ связывания рецепторов клеточной поверхности*

96-Луночный планшет покрывают рецептором, промывают и блокируют БСА. Проводят серийное трехкратное разведение кондиционированной среды культуры СНО (клетки яичника китайского хомячка) или плазмы, содержащей равные активности rhGAA или сконструированного GAA, получая серию из девяти уменьшающихся концентраций, и инкубируют с ко-сопряженным рецептором. После инкубации планшет промывают для удаления несвязанного GAA и добавляют 4-MU- $\alpha$ -глюкопиранозид на один час при 37 °С. Реакцию останавливают 1,0 М глицином, рН 10,5, и ОЕФ (относительные единицы флуоресценции) считывают флуориметром Spectramax; возбуждение 370, излучение 460. Величины ОЕФ для каждого образца преобразовывают в нмоль/мл/ч путем интерполяции по калибровочной кривой для 4-MU (4-метилумбеллиферон). Нелинейную регрессию проводят с использованием программы GraphPad Prism.

*Гликоген - гидролиз ТФК*

Гомогенат ткани гидролизуют 4н. ТФК при 100°C в течение четырех часов, сушат и разводят водой. Гидролизированный материал наносят на колонку CarboPac PA-10 2×250 мм для определения глюкозы методом анионообменной хроматографии при высоком рН с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAD). Концентрацию свободной глюкозы в каждом образце рассчитывают путем интерполяции по калибровочной кривой для глюкозы. Окончательные данные приводят в мкг гликогена/мг белка.

**Пример 2: Оценка векторов rAAVhu68.hGAA у мышей с болезнью Помпе**

Векторы AAV разводили в стерильном ФСБ для ВВ доставки мышам с болезнью Помпе. Опытные образцы включали: AAVhu68.CAG.hGAAco.rBG, AAVhu68.CAG.hGAAcoV780I.rBG, AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAco.rBG, AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.rBG и AAVhu68.CAG.sp7co.Δ8.hGAAcoV780I.rBG. Дикая тип и контроли носителя были включены в исследования.

Экспрессию и активность белка hGAA измеряли в различных тканях, взятых у получавших препараты мышей, включая печень (Фиг. 1А, Фиг. 1В), сердце (Фиг. 2А, Фиг. 2В), четырехглавую мышцу (Фиг. 3А, Фиг. 3В), головной мозг (Фиг. 4А, Фиг. 4А, Фиг. 4В), плазму (Фиг. 9А). Все промотеры проявили себя одинаково хорошо в печени как при низких, так и при высоких дозах. Введение вектора, экспрессируемого под промотором UbC, приводило к более низкой активности в скелетной мышце в обеих дозах, и вектор с

промотором CAG имел наилучшую общую активность. Вектор с промотором UbC также имел более низкую активность в сердце в обеих дозах.

Контрольные мыши с болезнью Помпе, получающие носитель (ФСБ) (Фиг. 5D), демонстрировали выраженное накопление гликогена (темное окрашивание на окрашенных ШИК срезах) в сердце. У мышей дикого типа и всех мышей, получавших вектор, наблюдали устранение накопления от почти полного до полного. Однако, две группы, которые получали векторы, кодирующие эталонную последовательность hGAA (V780), демонстрировали фиброзирующий лимфоцитарный миокардит (Фиг. 5B и Фиг. 5C), который наблюдался у семи из восьми животных, получавших нативный трансген hGAA, и у трех из восьми животных, получавших сконструированный hGAA с модификациями ViP и vIGF2. Поскольку ни у одной из мышей, получавших фермент hGAAcoV780I, не наблюдалось миокардита (Фиг. 5E, Фиг. 5F и Фиг. 5G), считали, что это поражение связано с вектором, а более конкретно специфично к эталонной последовательности hGAA.

Анализ ткани четырехглавой мышцы показал, что мыши дикого типа и все мыши, получавшие векторы, кодирующие вариант V780I, с дополнительными модификациями или без них, демонстрировали устранение накопления и аутофагосомного разрастания от почти полного до полного (Фиг. 6A - Фиг. 6H). Однако, две группы, получавшие векторы, кодирующие эталонную последовательность hGAAV780, демонстрировали сохраняющееся накопление гликогена от минимального до умеренного, а также аутофагосомное разрастание (Фиг. 10), кроме того демонстрировали субоптимальную коррекцию двух основных признаков заболевания Помпе. Наилучший исход наблюдался при доставке двух векторов, кодирующих вариант V780I, будь то в его нативной форме или с модификациями ViP-vIGF2. Модификации sp7-дельта8, по-видимому, вызывали непоследовательную коррекцию гистологических поражений, приписываемых болезни Помпе. Оба конструкта, кодирующие эталонную последовательность hGAAV780, были субоптимальными по показателям устранения запасов и накопления гликогена.

При ВВ введении высокой дозы ( $5 \times 10^{11} = 2,5 \times 10^{13}$  GC/кг), hGAAcoV780I и ViP-vIGF2.hGAAcoV780I демонстрировали близкие к норме уровни гликогена в четырехглавой мышце и значительно лучшее поглощение hGAA клетками (Фиг. 7A - Фиг. 7H и Фиг. 42). Оценка других скелетных мышц, включая переднюю большеберцовую (ПББ) и икроножную, показала схожие результаты (вариант с V780I устранял как гликоген, так и центральные аутофагальные вакуоли). Все конструкты снижали накопление гликогена в сердце, причем введение ViP-vIGF2.hGAAcoV780I приводило к наиболее низким уровням. Хотя уровни гликогена в четырехглавой мышце были близкими к норме, ШИК-окрашивание показало некоторые отличия, причем hGAAcoV780I и ViP-vIGF2.hGAAcoV780I продемонстрировали наилучшие результаты. Иммуногистохимия подтвердила экспрессию hGAA в скелетной мышце, сердце и спинном мозге мышей, которые получали препарат (Фиг. 43).

При ВВ введении низкой дозы ( $5 \times 10^{10} = 2,5 \times 10^{12}$  GC/кг) ViP-vIGF2.hGAAcoV780I

демонстрировал более низкое снижение уровня гликогена в сердце и четырехглавых мышцах, чем нативный hGAAV780I (Фиг. 41). Уровни гликогена в головном и спинном мозге были близки к норме для BiP-vIGF2.hGAAcoV780I, даже при тканевых уровнях ~15%, предположительно, вследствие лучшего нацеливания. В ЦНС наблюдались мощные синергические эффекты между сконструированным конструктом и вариантом V780I. Только BiP-vIGF2.hGAAcoV780I очищал ЦНС от гликогена.

Как показано на Фиг. 8, оценка гистологии спинного мозга показала, что мыши, получавшие AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I, демонстрировали клиренс накопленного гликогена от почти полного до полного, в то время как у мышей, получавших векторы, кодирующие эталонный фермент hGAAV780, сохранялись отложения гликогена. Окрашивание срезов мозга также выявило коррекцию при использовании BiP-vIGF2.hGAAcoV780I, но не нативного фермента hGAAV780 (Фиг. 42). Результаты демонстрируют вклад как мутации V780I, так и модификаций BiP-vIGF2.

**ПРИМЕР 3: Влияние ГЗК-детаргетинга на экспрессию hGAA у мышей с болезнью Помпе**

Модифицировали BiP-vIGF2.hGAAcoV780I с включением четырех сайтов-мишеней mir183 (BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183, SEQ ID №: 30) (Фиг. 11) и упаковкой в капсид AAVhu68.

Геном вектора содержит следующие элементы последовательности:

Инвертированные концевые повторы (ITR): ITR представляют собой идентичные обратно комплементарные последовательности, выделенные из AAB2 (130 п.н., GenBank: NC\_001401), которые фланкируют все компоненты генома вектора. ITR выполняют функции как начала репликации векторной ДНК, так и сигнала упаковки векторного генома, когда хелперные функции AAB и аденовируса обеспечиваются в транс-конфигурации. По существу, последовательности ITR представляют собой единственные цис-последовательности, необходимые для репликации и упаковки генома вектора.

Промотор СAG: Гибридный конструкт, состоящий из энхансера цитомегаловируса (ЦМВ), промотора бета-актина кур (СВ) (282 п.н., GenBank: X00182.1) и интрона бета-глобина кролика.

Кодирующая последовательность: Сконструированная кДНК (нуклеотиды (nt) 1141-4092 из SEQ ID №: 30), кодирующая BiP-vIGF2.hGAAcoV780I (SEQ ID №: 31).

Последовательности-мишени микроРНК: Четыре тандемные последовательности-мишени miR-183 (SEQ ID №: 26).

Сигнал полиаденилирования  $\beta$ -глобина кролика (полиА rBG): Сигнал полиА rBG (127 пар оснований) способствует эффективному полиаденилированию мРНК трансгена в цис-конфигурации. Этот элемент функционирует как сигнал терминации транскрипции, специфического события расщепления на 3'-конце растущего транскрипта, и добавления длинного полиаденилового хвоста.

Эффект введения сайтов-мишеней miR183 в геном вектора BiP-vIGF2-hGAAcoV780I оценивали после ВВ доставки AAVhu68 мышам с болезнью Помпе. Как

наблюдалось для конструкта BiP-vIGF2.hGAAcoV780I (без мишеней miR183), накопление гликогена в ЦНС скорректировалось после внутривенного введения высокой дозы вектора, включающего последовательности-мишени miR183 (Фиг. 12 и Фиг. 13). Отложения гликогена и аутофагосомное разрастание в четырехглавой мышце полностью корректировались после внутривенного введения высокой дозы, в то время как после введения низкой дозы наблюдались коррекция накопления гликогена и частичная коррекция аутофагосомного разрастания (Фиг. 14). Коррекция накопления гликогена также наблюдалась в сердце как при низкой, так и при высокой дозах (Фиг. 15). Аналогично результатам, наблюдавшимся при введении CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I, аутофагосомное разрастание устранялось полностью при высокой дозе и существенно снижалось при низкой дозе (Фиг. 16). Результаты подтвердили, что добавление мишеней miR183 не изменяет эффективность терапевтического трансгена по сравнению с соответствующим вектором без последовательностей-мишеней микроРНК.

Исследование диапазона доз осуществляли для определения профиля эффективности и MED для конструкта BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183 после ВВ введения. Схема исследования представлена в таблице ниже.

Обозначение группы	1	2	3	4	5	6	7
N/группа	4M/4F	4M/4F	4M/4F	4M/4F	4M/4F	4M/4F	4M/4F (ДТ)
Путь введения	ВВ	ВВ	ВВ	ВВ	ВВ	ВВ	ВВ
Доза вектора	5e12 GC/кг	1e13 GC/кг	2,5e13 GC/кг	5e13 GC/кг	1e14 GC/кг	ФСБ	ФСБ
Длительность	60 дней						

Мышечную патологию оценивали на ШИК-окрашенных срезах мышц через 60 дней после ВВ введения вектора AAVhu68.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmir183. Срезы четырехглавых мышц анализировали путем иммуногистохимии с использованием окрашивания с помощью WGA (клеточная мембрана; для возможности измерения диаметра мышечного волокна), DAPI (ядро; для количественного определения наличия центрального ядра) и антитела LC3b (аутофагосома; для количественного определения аутофагического разрастания). Срезы сканировали и автоматически разлагали, а затем анализировали с помощью программного обеспечения Visiopharm.

#### *Количественное определение центрального ядра*

Волокна здоровых мышц редко содержат центральное ядро (CN) (ниже 3% в мышцах дикого типа), и наличие CN указывает на регенерацию мышц. Процент волокон с CN значительно различались между контролями WT и нокаут-ФСБ (Фиг. 43). По сравнению с контрольными мышцами нокаут-ФСБ процент волокон с CN был значительно снижен в группах, которым давали  $2 \times 10^{11}$  GC ( $1 \times 10^{13}$  GC/кг) и более высокие дозы векторов. У молодых мышей циклы дегенерации/регенерации, которые увеличивают CN, не происходили до начала исследования и были предотвращены лечением, приводящим к

фенотипической корректировке у мышей Помпе.

*Количественное определение LC3b*

При нормальных условиях продуктивной аутофагии аутофагосомы быстро деградируют под действием лизосом, а LC3-положительные структуры едва ли детектировать. У нокаутных мышей GAA поврежденные/дисфункциональные лизосомы могут запускать повышение аутофагии; лизосомы не могут растворяться и деградировать содержание аутофагосом, что приводит к аутофагическому разрастанию.

Аутофагическое разрастание (% LC3b+клетки) предотвращали при всех дозах, начиная от  $5 \times 10^{11}$  GC ( $2,5 \times 10^{13}$  GC/кг) (Фиг. 44). Значительное аутофагосомное разрастание наблюдалось у контролей ФСБ в возрасте три месяца (>20% волокон).

*Количественное определение меньшего диаметра волокон четырехглавых мышц*

Для количественного определения различий размера волокон при сравнении с контрольными животными дикого типа диаметры волокон распределяли по классам: малые (<30 мкм), средние (30-50 мкм) и крупные (>50 мкм). Нокаутные контроли, получавшие ФСБ, демонстрируют значительную атрофию в возрасте 3 месяцев. По сравнению с нокаутной группой, получавшей ФСБ, наблюдалось значительное повышение процента крупных волокон четырехглавой мышцы и снижение процента малых волокон четырехглавой мышцы (Фиг. 45). Доля малых волокон (S) была значительно снижена у GAA -/- мышцей, которых лечили дозой  $2 \times 10^{11}$  GC ( $1 \times 10^{13}$  GC/кг) и выше, что указывает на профилактику мышечной атрофии.

*Тяжесть вакуолизации*

Результаты показали дозозависимую коррекцию лизосомального накопления во всех оцененных мышцах (Фиг. 46А - Фиг. 46F). Коррекция достигалась при более низкой протестированной дозе ( $5 \times 10^{12}$  GC/кг,  $1 \times 10^{11}$  GC) в камбаловидной мышце и диафрагме, хотя большинство других протестированных мышц были значительно улучшены по сравнению с контрольными нокаутными мышцами GAA, получавшими ФСБ, при средней дозе  $2 \times 10^{13}$  GC/кг ( $5 \times 10^{11}$  GC). Мышечная патология практически отсутствовала, и срезы, по-видимому, были подобны мышцам мышцей дикого типа для двух наивысших доз -  $5 \times 10^{13}$  GC/кг ( $1 \times 10^{12}$  GC) и  $1 \times 10^{14}$  GC/кг ( $2 \times 10^{12}$  GC).

**ПРИМЕР 4:** Исследования пути введения и дозы у взрослых мышей с болезнью Помпе после появления симптомов

Оценивали влияние пути введения и дозы у мышей с болезнью Помпе (а также дикого типа и контролей носителем), которым вводили кодирующие hGAA векторы AAVhu68 (включая, например, AAVhu68.CAG.BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.rBG) внутривенной (ВВ) и/или интрацеребровентрикулярной (ИЦВ) инъекцией. Подход с двумя путями введения (внутривенным и инъекции в спинномозговую жидкость) с использованием одного и того же вектора должен корректировать как периферические, так и неврологические проявления заболевания. Поскольку значительная часть пациентов, которые будут допущены к проведению генной терапии, уже будут иметь прогрессирующую патологию, мы решили провести лечение мышцей Помпе после

появления симптомов (в возрасте шести-семи месяцев) с наблюдением за ними в течение по меньшей мере шести месяцев после лечения.

Мыши получали два уровня доз (низкую дозу или высокую дозу) вектора с использованием внутривенного (ВВ), интрацеребровентрикулярного (ИЦВ) или двойного путей введения. Дозы, используемые в этом исследовании ( $5 \times 10^{10}$  или  $1 \times 10^{11}$  ГС ИЦВ и  $1 \times 10^{13}$  ГС/кг или  $5 \times 10^{13}$  ГС/кг ВВ), соответствуют низкой и высокой дозе, используемой в исследовании NHP, описанном в Примере 6, и дозам, пригодным для введения людям ( $1 \times 10^{13}$  ГС/кг и  $5 \times 10^{13}$  ГС/кг). Мышей умерщвляли через приблизительно 210 дней после инъекции в возрасте 13-14 месяцев для сбора тканей для анализа. Схема исследования представлена на Фиг. 47.

В ходе исследования мышей тестировали на двигательную активность с использованием теста способности удерживаться на вращающемся стержне (rotarod), проволочной петле, оценки силы схвата, а также проводили плетизмографию. Измеряли экспрессию/активность белка hGAA и запасы гликогена в различных тканях, взятых у получавших лечение мышей, включая плазму, четырехглавую мышцу, икроножную мышцу, диафрагму и мозг. Проводили гистологию для оценки, например, ШИК-реакции (PAS) (путем окрашивания люксолом прочным синим), экспрессии hGAA и нейровоспаления (астроцитоз). Срезы тканей окрашивали для оценки накопления аутофагосом или клиренса (например, с использованием антител, метящих LC3B).

Проводили гистологические исследования образцов четырехглавой мышцы, сердца и спинного мозга мышей, получавших лечение высокой дозой и низкой дозой ИЦВ (Фиг. 28) и лечение высокой дозой и низкой дозой ВВ (Фиг. 29). Наблюдалась коррекция накопления гликогена в спинном мозге мышей, которые получали низкую или высокую дозу вектора путем ИЦВ введения. ВВ введение высокой дозы эффективно корректировало накопление гликогена в четырехглавой мышце, сердце и спинном мозге.

Существенная коррекция массы тела наблюдалась у самцов, получавших комбинации векторов ИЦВ и ВВ (двойные пути введения) как в низких, так и в высоких дозах (Фиг. 25А). Введение одним путем (только ВВ или только ИЦВ) не приводило к существенной коррекции массы тела. Масса тела не отличалась у самок мышей с болезнью Помпе и мышей ДТ (Фиг. 25В).

Сила схватывания значительно улучшалась у мышей, получавших высокую дозу ВВ (по сравнению с исходным уровнем и по сравнению с контролями ФСБ) (Фиг. 26). Не наблюдалось значительного эффекта для низких доз вектора, вводимого ИЦВ и ВВ или двойным путем введения (н.д. ИЦВ+н.д. ВВ). Однако, введение комбинации высоких доз ВВ и ИЦВ восстанавливало силу до уровней дикого типа всего за 30 дней после инъекции и нарастающий эффект комбинации наблюдался в день 180 (Фиг. 27).

Мышечную патологию исследовали в различных группах, чтобы обнаружить релевантные данные о болезни Помпе. Мышцы, полученные от пациентов с болезнью Помпе, и мышиную модель болезни Помпе 6<sup>neo</sup> GAA КО (нокаутные) характеризовали наличием структурных аномалий, таких как атрофия волокон, анизоцитоз, аутофагическое

разрастание и образование центрального ядра (Фиг. 48).

*Количественное определение центрального ядра*

У мышей, которых лечили через шесть месяцев, циклы дегенерации/регенерации уже происходили до лечения (Фиг. 49).

*Количественное определение LC3b*

Лечение мышей с болезнью Помпе с предварительно существующей патологией приводила к обращению аутофагосомного накопления в группах ВВ в.д. ( $1 \times 10^{12}$  GC= $5 \times 10^{13}$  GC/кг) и ИЦВ+ВВ в.д. (ИЦВ  $1 \times 10^{11}$  GC и ВВ  $1 \times 10^{12}$  GC) (Фиг. 50).

*Количественное определение диаметра волокон четырехглавых мышц*

У мышей, которых лечили через шесть месяцев, когда мышечная атрофия становится очевидной, доля малых волокон (S) снижалась в группе лечения ИЦВ+ВВ в.д. (ИЦВ  $1 \times 10^{11}$  GC и ВВ  $1 \times 10^{12}$  GC= $1 \times 10^{13}$  GC/кг), и доля крупных волокон (L) была увеличена в группах лечения ВВ в.д. и ИЦВ+ВВ в.д. (Фиг. 51). В этой группе лечения распределение размеров мышечных волокон было подобным мышам ДТ и статистически значимо снижено по сравнению с контрольными мышами с болезнью Помпе, получившими ФСБ, что демонстрирует избавление от уже существующей патологии в этом примере лечения развившегося заболевания после появления симптомов. Результаты коррелируют с возвращением силы схватывания до уровней ДТ в той же группе, как показано на Фиг. 27. Лечение в.д. ВВ также приводило к ослаблению патологии с увеличенной долей крупных волокон и тенденцией к снижению атрофических волокон (Фиг. 51).

Результаты подтверждают, что двойной путь введения является предпочтительным для воздействия на все аспекты заболевания. Доставка указанного вектора обращает уже существующую патологию мышечных волокон у взрослых мышей Помпе после появления симптомов, включая аспекты, которые, как правило, являются устойчивыми к лечению, такие как атрофия волокон и аутофагическое разрастание.

**ПРИМЕР 5:** Введение вектора генной терапии для ГЗК-детаргетинга нечеловекообразным приматам

Исследования на приматах NHP проводили для оценки токсичности и оценки доставки в большую цистерну CAG.BiP-IGF2-hGAAcoV780I или CAG.BiP-IGF2-hGAAcoV780I-4xmir183 в капсидах AAVhu68. Векторы вводили инъекцией в большую цистерну в дозе  $3 \times 10^{13}$  GC/кг и животных умерщвляли в день 35.

Добавление четырех тандемных повторов miR183 подавляло экспрессию трансгена hGAA в сенсорных нейронах ГЗК шейного отдела (Фиг. 17). Заметно сниженная экспрессия трансгена hGAA также наблюдалась в сенсорных нейронах ГЗК поясничного отдела для вектора miR183, но некоторый уровень экспрессии сохранялся (Фиг. 18). Неожиданно, наличие последовательности-мишени miR183 не модифицирует экспрессию трансгена в двигательных нейронах (Фиг. 19), что позволяет предположить, что введение вектора будет полезным для снижения накопления гликогена в двигательных нейронах пациентов с болезнью Помпе. Кроме того, не наблюдалось снижения экспрессии

трансгена в сердце после доставки конструкта, содержащего последовательность-мишень miR183 (Фиг. 20). К тому же, экспрессия в сердце оказалась повышенной, что позволяет предположить увеличение эффективности лечения сердечных заболеваний у пациентов с болезнью Помпе. Примечательно, что тандемные повторы последовательностей-мишеней miR183 снижали токсичность в сенсорных нейронах ГЗК из шейного и грудного сегментов (Фиг. 21А и Фиг. 21В). Не наблюдалось снижения токсичности в поясничном сегменте при этом уровне дозы (Фиг. 21С), что, вероятно, происходит вследствие остаточной экспрессии белка на уровне поясницы, как изображено на Фиг. 18.

Дизайн исследования для дальнейшей оценки ВВ доставки конструктов с последовательностями-мишенями miR183 NHP представлен в таблице ниже. Исследование включает последовательность GAA макаки-резуса (rhGAA) для оценки возможных эффектов несамостоятельного иммунного ответа.

Обозначение группы	1	2
N/группа	6	3
Путь введения	ВВ	ВВ
Доза вектора	1e13 GC/кг	1e13 GC/кг
Вектор	AAVhu68.CAG.BiP.vIGF2.hGAAco(V780I)-4xmiR183	AAVhu68.CAG.BiP.vIGF2.hGAAco(V780I)-4xmiR183
Длительность, конечные точки	60 дней. Фармакология (уровни экспрессии hGAA), токсикология (сердечные маркеры+классические панели), гистопатология	

Дополнительно, профиль безопасности вектора CAG.BiP-IGF2-hGAAcoV780I-4xmiR183 оценивают с использованием исследования с диапазоном доз. NHP в исследовании с диапазоном доз вводят различные дозы ICM, включая  $3 \times 10^{12}$  GC,  $6 \times 10^{12}$  GC и  $1 \times 10^{13}$  GC.

Обозначение группы	1	2	3
N/группа	4	4	4
Путь введения	ICM	ICM	ICM
Доза вектора	3E12 GC	6E12 GC	1E13 GC
Вектор	AAVhu68.CAG.BiP.vIGF2.hGAAco(V780I)-4xmiR183		
Длительность, конечные точки	60 дней*. Фармакология (уровни экспрессии hGAA), токсикология (сердечные маркеры+классические панели+NCV), гистопатология		

ПРИМЕР 6: Исследования пути введения у нечеловекообразных приматов

Исследования на приматах NHP проводят для оценки токсичности и для оценки альтернативных или комбинированных путей введения вектора. AAVhu68.CAG.BiP-IGF2-hGAAcoV780I вводят внутривенно в дозе  $5 \times 10^{13}$  GC/кг (высокая доза) или  $1 \times 10^{13}$  GC/кг (низкая доза) или ICM в дозе  $3 \times 10^{13}$  GC (высокая доза) или  $1 \times 10^{13}$  GC (низкая доза). Пригодность и токсичность двойных путей введения также оценивали, например, путем введения ВВ и ICM доз в комбинации (ВВ  $5 \times 10^{13}$  GC/кг+ICM  $3 \times 10^{13}$  GC или ВВ  $1 \times 10^{14}$  GC/кг+ICM  $1 \times 10^{13}$  GC/кг). Комбинация доз ВВ и ICM может выявить синергические эффекты, которые будут полезными при лечении пациентов с болезнью Помпе.

Схема исследования с указанием путей введения и дозировок представлена на Фиг. 31. Предварительные исследования показали, что у животных, получивших низкую дозу ВВ инъекцией, наблюдалась экспрессия hGAA в четырехглавой мышце и сердце (Фиг. 37). Животные с ВВ инъекцией также демонстрировали более низкую степень аксонопатии спинного мозга, чем животные с инъекцией в большую цистерну (Фиг. 33D - Фиг. 33F). Экспрессия hGAA также наблюдалась при гистологическом исследовании спинного мозга животных, которым вводили низкую дозу инъекцией в большую цистерну (Фиг. 37).

Количественное определение двигательных нейронов, экспрессирующих hGAA, в сегментах спинного мозга проводили на срезах, иммуноокрашенных к трансгену GAA человека. Результаты показали, что только животные, которым вводили дозы ICM и ICM+ВВ, демонстрировали значимое количество нижних двигательных нейронов спинного мозга, экспрессирующих трансген. Этот результат свидетельствует о том, что непосредственное введение в CSF является эффективным для коррекции патологии двигательных нейронов. Доза н.д. ВВ отдельно не приводила к двигательным нейронам, положительным по hGAA, тогда как ВВ в.д. приводила к рассеянными двигательным нейронам, положительным по hGAA (Фиг. 55).

Дегенерация ГЗК и аксонопатия спинного мозга у животных, получивших инъекцию в большую цистерну, не были дозозависимыми (Фиг. 33А - Фиг. 33F). Кроме того, одно животное с ВВ низкой дозы (RA3607:  $1 \times 10^{13}$  GC/кг) и одно животное ВВ+ICM (180717: ВВ  $5 \times 10^{13}$  GC/кг+ICM  $3 \times 10^{13}$  GC) показали более высокие показатели дегенерации ГЗК, аксонопатии спинного мозга и более высокие воспалительные ответы сердца, чем животные с ВВ инъекциями высокой дозы. Однако, повышенная экспрессия GAA в сердце наблюдалась после введения ICM конструкций, содержащих последовательности-мишени miR и в отсутствие воспаления (Фиг. 20).

(Перечень последовательностей со свободным текстом)

Следующая информация представлена для последовательностей, содержащих свободный текст под численным идентификатором <223>.

SEQ ID №: (содержит свободный текст)	Свободный текст под <223>
--	---------------------------

3	<p>&lt;223&gt; Синтетический конструктор</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (1)..(27)</p> <p>&lt;223&gt; Сигнальный пептид</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (70)..(952)</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (123)..(952)</p> <p>&lt;223&gt; Белок GAA массой 76 кДа с V780I</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (204)..(952)</p> <p>&lt;223&gt; Белок GAA массой 70 кДа с V780I</p>
4	<p>&lt;223&gt; Сконструированная кодирующая последовательность hGAAI</p>
6	<p>&lt;223&gt; Слитый белок, содержащий hGAA780I</p>
7	<p>&lt;223&gt; Сконструированная последовательность, кодирующая слитый белок, содержащий GAAV780I</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (810)..(810)</p> <p>&lt;223&gt; V810I</p>
8	<p>&lt;223&gt; промотор CAG</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (1)..(243)</p> <p>&lt;223&gt; Ранний энхансерный элемент CMV</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (244)..(525)</p> <p>&lt;223&gt; Промотор бета-актина кур</p> <p>&lt;220&gt;</p>

	<221> misc_feature <222> (526)..(934) <223> гибридный интрон
9	<223> полиА глобина кролика
12	<223> Сконструированный сигнальный пептид hGAAV780I <220> <221> sig_peptide <222> (1)..(81) <220> <221> CDS <222> (1)..(81)
13	<223> Синтетический конструктор
14	<223> Сконструированный зрелый белок hGAAV780I <220> <221> CDS <222> (1)..(2649)
15	<223> Синтетический конструктор
16	<223> Сконструированная ДНК для hGAA780I 123-890 <220> <221> CDS <222> (1)..(2304)
17	<223> Синтетический конструктор
18	<223> Сконструированная кДНК hGAA массой 70 кДа <220> <221> CDS <222> (1)..(2247)
19	<223> Синтетический конструктор
20	<223> Сконструированная ДНК для белка hGAAV780I массой 76 кДа <220> <221> CDS <222> (1)..(2490)
21	<223> Синтетический конструктор
22	<223> Синтетический конструктор

	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; CDS          &lt;222&gt; (1)..(2952)          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (1)..(270)          &lt;223&gt; Сигнальный пептид ViP+удлинение vIGF2+2GS          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (271)..(2952)          &lt;223&gt; сконструированная ДНК для hGAA 61-952 780I          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (2428)..(2430)          &lt;223&gt; кодон Ile</p>
23	<223> Синтетический конструктор
24	<p>&lt;223&gt; Синтетический конструктор          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; CDS          &lt;222&gt; (1)..(2952)          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (1)..(270)          &lt;223&gt; Пептид ViP-vIGF          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (1)..(270)          &lt;223&gt; Сигнальный пептид ViP+удлинение vIGF2+2GS          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (271)..(2952)          &lt;223&gt; ДНК hGAA 61-952 V780          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (2428)..(2430)</p>

	<223> кодон валина 780 hGAA
25	<223> Синтетический конструкт
26	<223> последовательность-мишень микроРНК
27	<223> последовательность-мишень микроРНК
28	<223> Синтетический конструкт <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> 5'-ITR <220> <221> энхансер <222> (195)..(437) <223> Энхансер IE CMV <220> <221> промотор <222> (440)..(721) <223> промотор бета-актина кур <220> <221> Интрон <222> (721)..(1128) <223> гибридный интрон в CAG <220> <221> CDS <222> (1141)..(4092) <223> BiP-vIGF2-hGAAco <220> <221> misc_feature <222> (3568)..(3570) <223> кодон Ile <220> <221> сигнал полиА <222> (4161)..(4287) <223> поли а бета-глобина кролика <220> <221> misc_feature

	<222> (4452)..(4581) <223> 3'-ITR
29	<223> Синтетический конструктор
30	<223> Синтетический конструктор <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> 5'-ITR <220> <221> энхансер <222> (195)..(437) <223> Энхансер IE CMV <220> <221> промотор <222> (440)..(721) <223> промотор бета-актина кур <220> <221> Интрон <222> (721)..(1128) <223> гибридный интрон в CAG <220> <221> CDS <222> (1141)..(4092) <223> BiP-vIGF2-hGAAco <220> <221> misc_feature <222> (3568)..(3570) <223> кодон Pe <220> <221> misc_feature <222> (4113)..(4134) <223> мишень miR-183 <220> <221> misc_feature <222> (4139)..(4160)

	<223> мишень miR-183 <220> <221> misc_feature <222> (4167)..(4188) <223> мишень miR-183 <220> <221> misc_feature <222> (4195)..(4216) <223> мишень miR-183 <220> <221> сигнал полиА <222> (4267)..(4393) <223> поли а бета-глобина кролика <220> <221> misc_feature <222> (4558)..(4687) <223> 3'-ITR
31	<223> Синтетический конструктор
32	<223> F26S IGF2
33	<223> Y27L IGF2
35	<223> V43L
36	<223> F48T IGF2
37	<223> R49S IGF2
38	<223> S50I IGF2
39	<223> A54R IGF2
40	<223> L55R IGF2
41	<223> F26S, Y27L, V43L, F48T, R49S, S50I, A54R, L55 IGF2
42	<223> Y27L, K65R IGF2 дельта1-6
43	<223> Y27L, K65R IGF2 дельта1-7
44	<223> E6R, Y27L, K65R IGF2 дельта1-4
45	<223> E6R, Y27L IGF2 дельта1-4
46	<223> E6R IGF2
48	<223> E6R, Y27L, K65R vIGF2 дельта1-4
50	<223> Модифицированный BiP-1

51	<223> Модифицированный ViP-2
52	<223> Модифицированный ViP-3
53	<223> Модифицированный ViP-4
55	<223> линкерная последовательность
57	<223> линкерная последовательность
58	<223> линкерная последовательность
59	<223> линкерная последовательность
60	<223> линкерная последовательность

Все документы, цитируемые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки. Перечень последовательностей подан с данной заявкой (озаглавлен «21-9596PCT\_ST25»), и содержащиеся в нем последовательности и текст включены посредством ссылки. Предварительная заявка на патент США № 62/840911, поданная 30 апреля 2019 г., предварительная заявка на патент США № 62/913401, поданная 10 октября 2019 г., международная патентная заявка № PCT/US20/30484, поданная 29 апреля 2020 г., международная патентная заявка № PCT/US20/30493, поданная 29 апреля 2020 г., предварительная заявка на патент США № 63/024941, поданная 14 мая 2020 г., предварительная заявка на патент США № 63/109677, поданная 4 ноября 2020 г. и предварительная заявка на патент США № 63/180379, поданная 27 апреля 2021 г., включены посредством ссылки. Хотя изобретение было описано со ссылками на конкретные варианты осуществления изобретения, следует понимать, что могут быть внесены модификации, не выходящие за пределы сущности изобретения. Предполагается, что такие модификации попадают в рамки прилагаемой формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения прогрессирования аномальной мышечной патологии и/или обращения аномальной мышечной патологии у пациента, при этом у пациента диагностирована болезнь Помпе или подозревается наличие болезни Помпе, причем способ включает введение пациенту рекомбинантного ААВ (рААВ), содержащего капсид ААВ и векторный геном, упакованный в него, при этом векторный геном содержит:

(a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);

(b) промотор;

(c) нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный слитой белок, содержащий сигнальный пептид и пептид vIGF2, слитый с кислой  $\alpha$ -глюкозидазой человека (hGAA), при этом последовательность, кодирующая химерный слитой белок, функционально связана с регуляторными последовательностями, которые направляют его экспрессию, и содержит SEQ ID №: 7 или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, которая кодирует аминокислоты с 1 по 982 SEQ ID №: 6;

(d) полиА; и

(e) 3'-ITR.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что промотор представляет собой конститутивный промотор, необязательно промотор СAG или промотор СВ7.

3. Способ по п. 1, отличающаяся тем, что аномальная мышечная патология характеризуется одним или более из: i) повышенной доли мышечных клеток с центральным ядром; ii) атрофией мышечных волокон, iii) анизоцитозом в клетках мышечных волокон, iv) аутофагическим разрастанием, v) вакуолизацией и vi) слабостью.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что у пациента наблюдается заболевание Помпе с поздним началом.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что у пациента наблюдается заболевание Помпе с началом в детском возрасте.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что векторный геном дополнительно содержит по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь или по меньшей мере восемь целевых последовательностей miR, при этом необязательно каждая из целевых последовательностей miR специфична к miR-183.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что капсид ААВ представляет собой капсид АAVhu68.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рААВ вводят внутривенно и/или подоболочечно.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рААВ вводят пациенту посредством двух путей введения, необязательно при этом два пути представляют собой внутривенное введение и введение в большую цистерну (ICM).

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рААВ вводят внутривенно в дозировке, составляющей от около  $1 \times 10^{11}$  копий генома (GC)/кг до около  $5 \times 10^{13}$  GC/кг.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рААВ вводят посредством ИСМ в дозировке от около  $1 \times 10^{12}$  ГС до около  $5 \times 10^{13}$  ГС.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рААВ вводят посредством ВВ в дозировке от около  $1 \times 10^{11}$  ГС/кг до около  $5 \times 10^{13}$  ГС/кг и посредством ИСМ в дозировке от около  $1 \times 10^{12}$  ГС до около  $5 \times 10^{13}$  ГС.

13. Способ по п. 1, дополнительно включающий введение пациенту совместной терапии, причем необязательно совместная терапия представляет собой бронхолитик, ингибитор ацетилхолинэстеразы, тренировку силы дыхательных мышц (ТДМ), заместительную ферментную терапию и/или терапию стимуляцией диафрагмального нерва.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный ААВ (рААВ), содержащий капсид ААВ и векторный геном, упакованный в него, при этом векторный геном содержит:

(a) 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);

(b) промотор;

(c) нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный слитой белок, содержащий сигнальный пептид и пептид vIGF2, слитый с кислой  $\alpha$ -глюкозидазой человека (hGAA), при этом последовательность, кодирующая химерный слитой белок, функционально связана с регуляторными последовательностями, которые направляют его экспрессию, и содержит SEQ ID №: 7 или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, которая кодирует аминокислоты с 1 по 982 SEQ ID №: 6;

(d) полиА; и

(e) 3'-ITR.

15. Фармацевтическая композиция по п. 14, отличающаяся тем, что промотор представляет собой конститутивный промотор, необязательно промотор СAG или промотор СB7.

16. Фармацевтическая композиция по п. 14 или 15, отличающаяся тем, что векторный геном дополнительно содержит по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь или по меньшей мере восемь целевых последовательностей miR, при этом необязательно каждая из целевых последовательностей miR специфична к miR-183.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 14-16, отличающаяся тем, что капсид ААВ представляет собой капсид АAVhu68.

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 14-17, отличающаяся тем, что композиция составлена для внутривенного и/или подбололочечного введения.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 14-18 для применения в лечении пациента с болезнью Помпе, при этом лечение снижает прогрессирование аномальной мышечной патологии и/или обращает аномальную мышечную патологию у пациента.

20. Фармацевтическая композиция для применения по п. 19, отличающаяся тем, что аномальная мышечная патология характеризуется одним или более из: i) повышенной доли мышечных клеток с центральным ядром; ii) атрофией мышечных волокон, iii) анизоцитозом в клетках мышечных волокон, iv) аутофагическим разрастанием, v) вакуолизацией и vi) слабостью.

21. Фармацевтическая композиция для применения по п. 19 или 20, отличающаяся тем, что у пациента наблюдается заболевание Помпе с поздним началом.

22. Фармацевтическая композиция по п. 19 или 20, отличающаяся тем, что у пациента наблюдается заболевание Помпе с началом в детском возрасте.

23. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 19-22, отличающаяся тем, что рААВ вводят пациенту посредством двух путей введения, необязательно при этом два пути представляют собой внутривенное введение и введение в большую цистерну (ICM).

24. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 14-18, пригодная для введения пациенту после появления симптомов, у которого диагностировано заболевание Помпе.

25. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 14-18, которая пригодна для обращения аномальной мышечной патологии у пациентов с болезнью Помпе после появления симптомов.

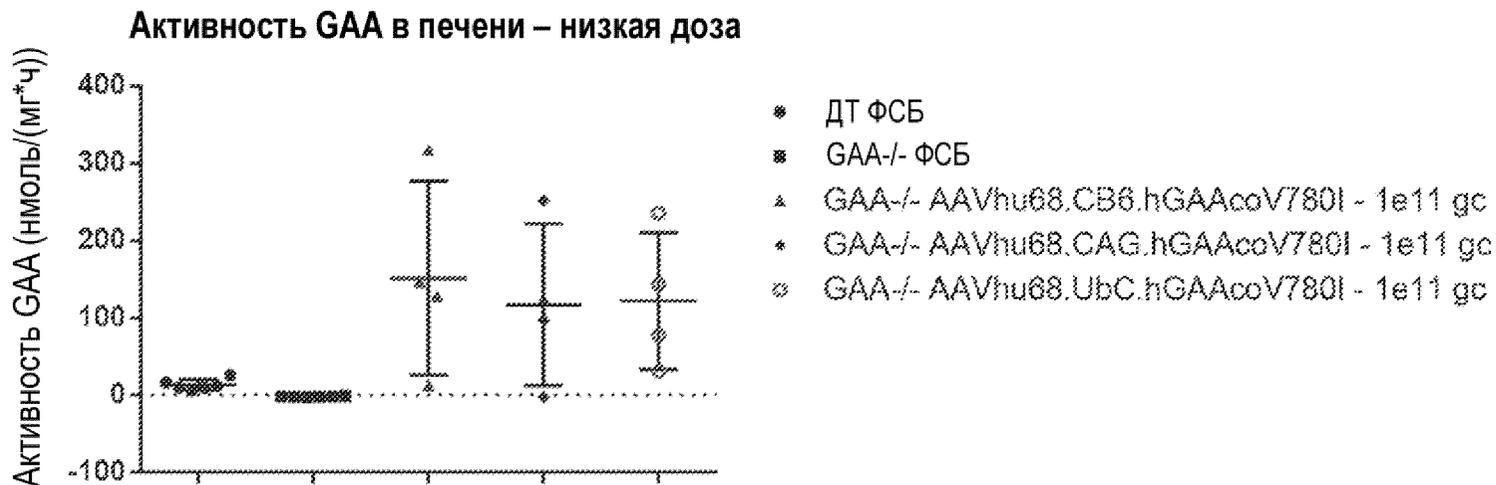
26. Фармацевтическая композиция по п. 25, отличающаяся тем, что аномальная мышечная патология характеризуется одним или более из: i) повышенной доли мышечных клеток с центральным ядром; ii) атрофией мышечных волокон, iii) анизоцитозом в клетках мышечных волокон, iv) аутофагическим разрастанием, v) вакуолизацией и vi) слабостью.

27. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 14-18 или 24-26, которая пригодна для применения в совместной терапии, которая необязательно характеризуется тем, что пациент дополнительно получает лечение бронхолитиком, ингибитором ацетилхолинэстеразы, тренировкой силы дыхательных мышц (ТДМ), заместительной ферментной терапией и/или терапией стимуляцией диафрагмального нерва.

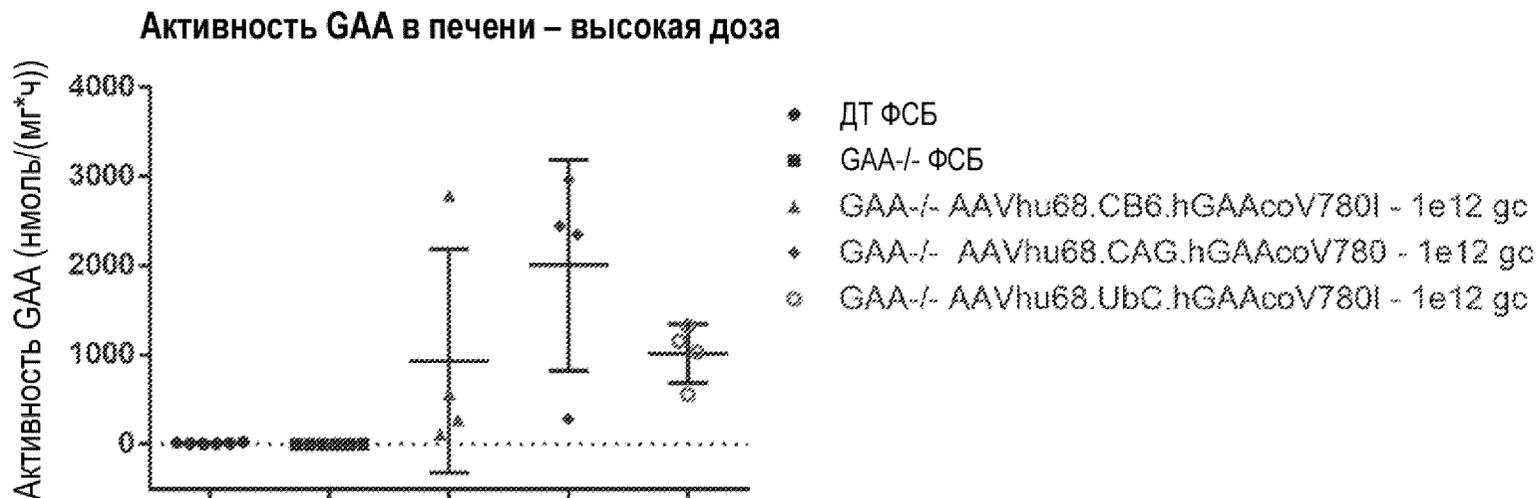
28. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 14-18 для лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом, при этом лечение снижает прогрессирование аномальной мышечной патологии и/или обращает аномальную мышечную патологию у пациента.

По доверенности

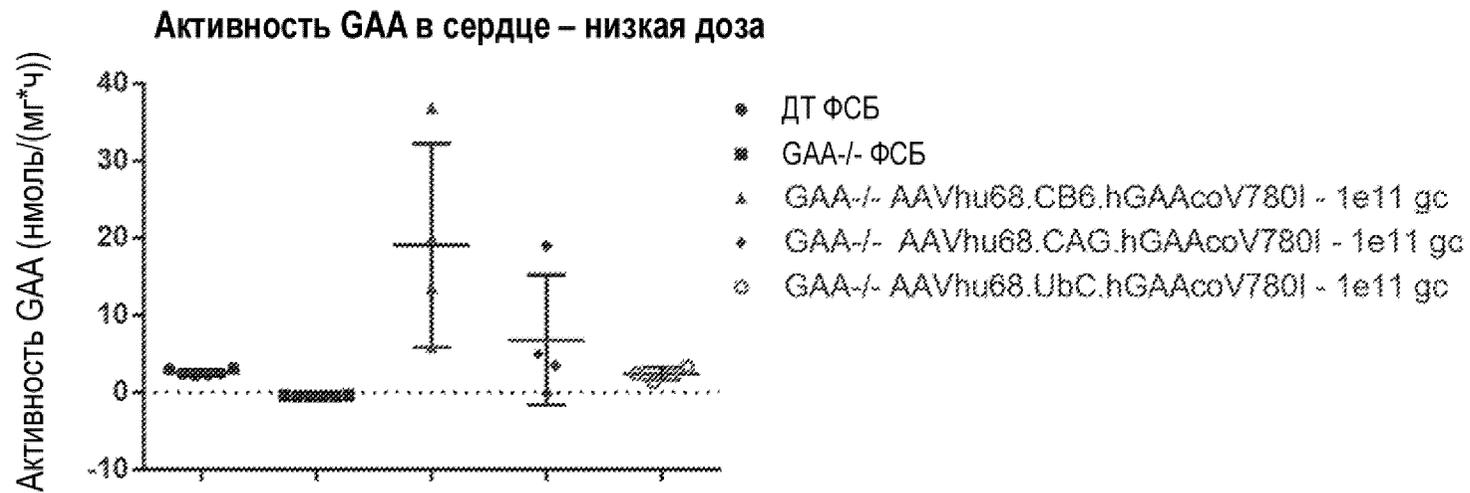
Фиг. 1А



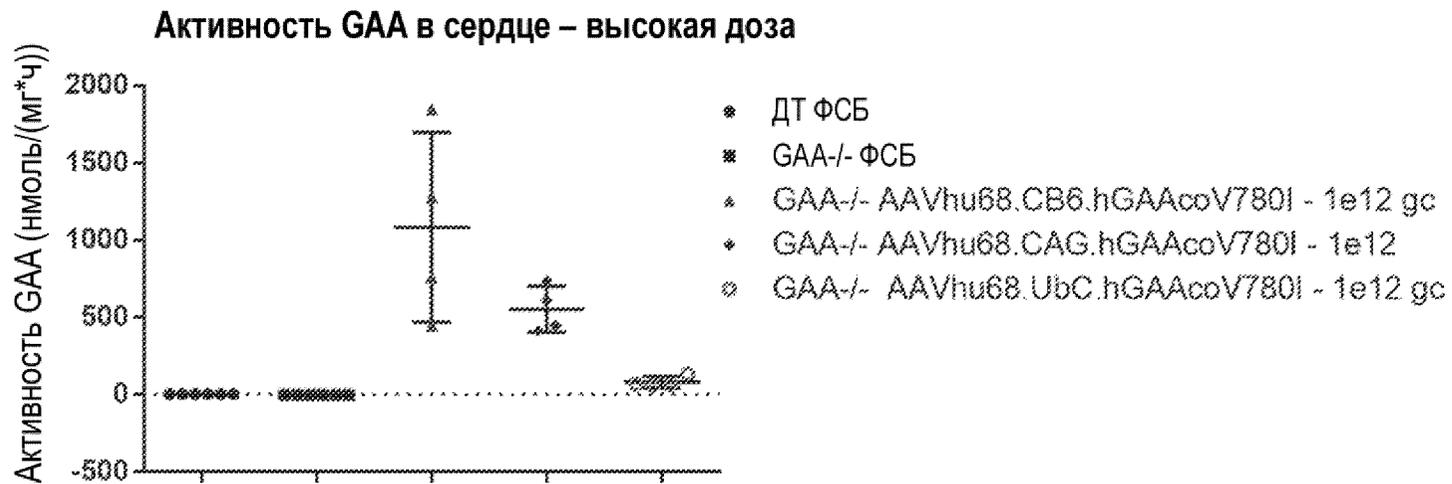
Фиг. 1В



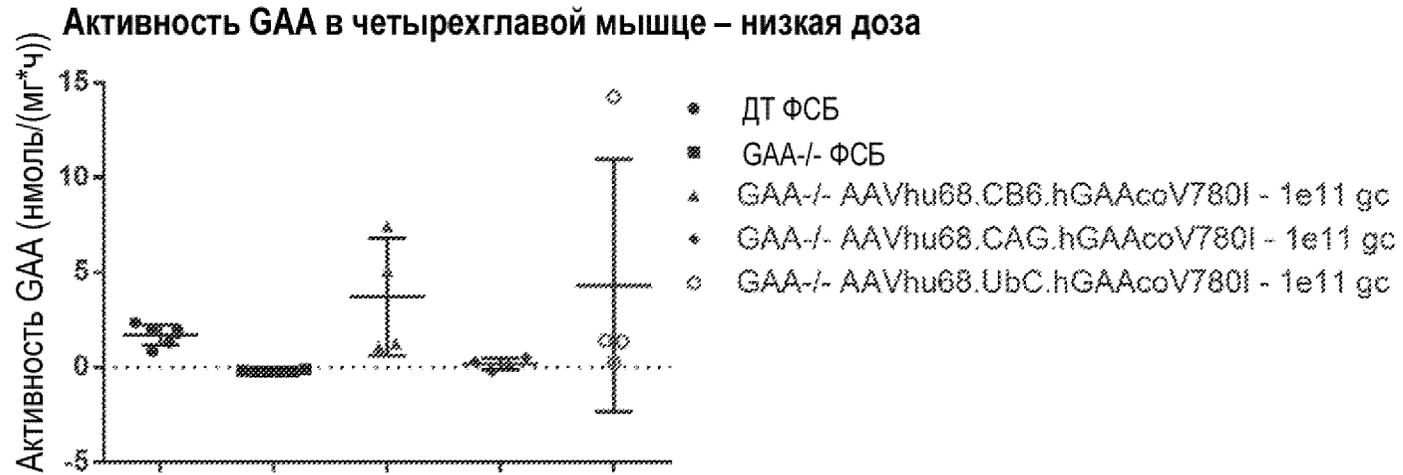
Фиг. 2А



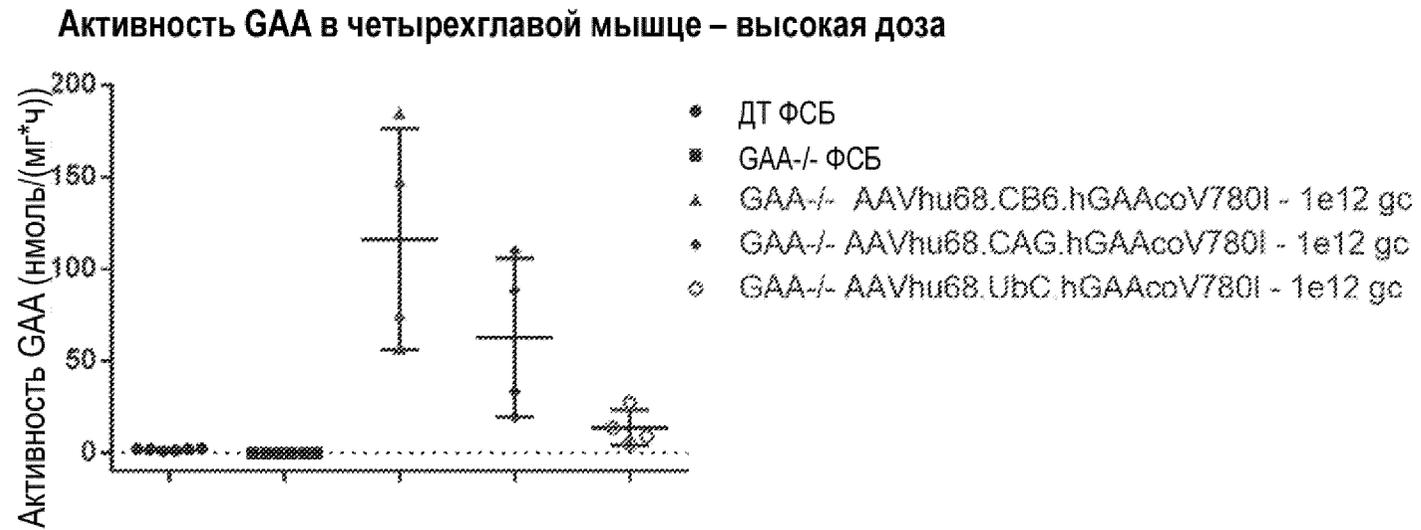
Фиг. 2В



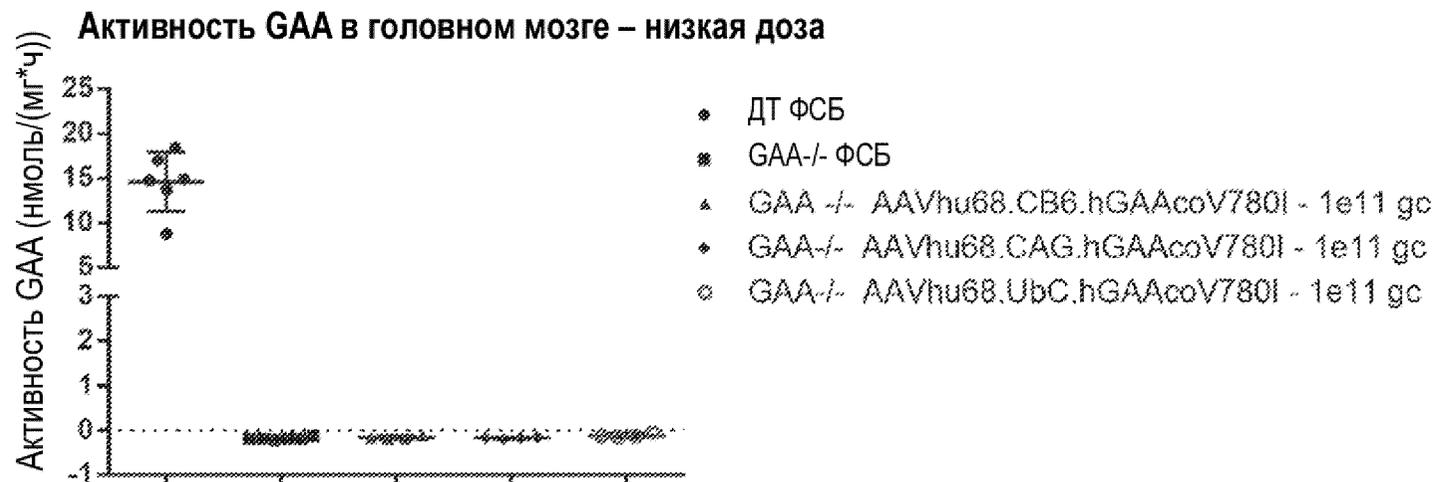
Фиг. 3А



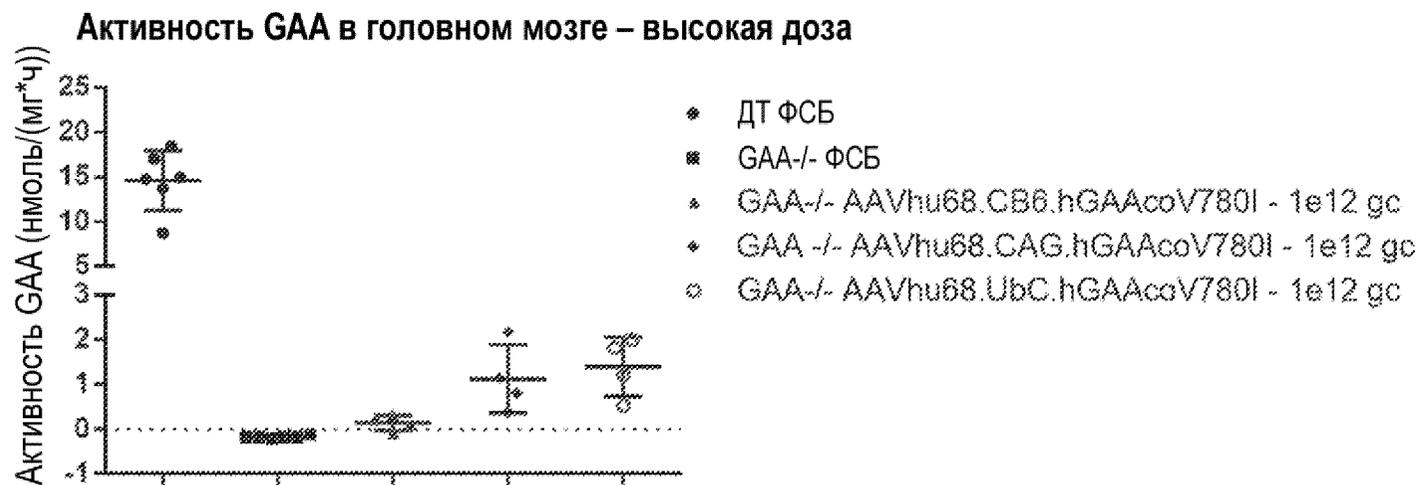
Фиг. 3В



Фиг. 4А

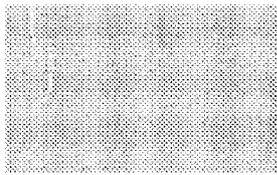


Фиг. 4В



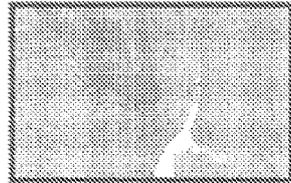
Фиг. 5А

Дикий тип



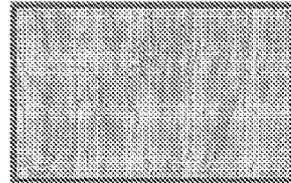
Фиг. 5В

wt hGAA



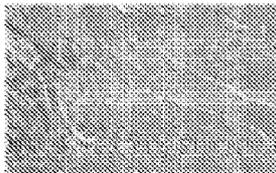
Фиг. 5С

BIP-viGF2-hGAAco



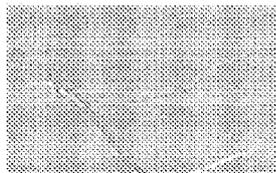
Фиг. 5D

Носитель



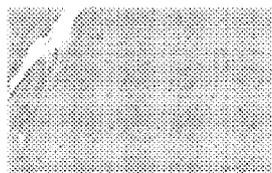
Фиг. 5E

hGAAco V<sup>730</sup>I



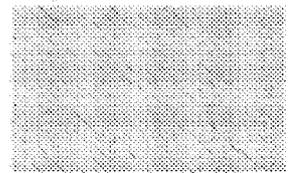
Фиг. 5F

BIP-viGF2-hGAAco V<sup>730</sup>I



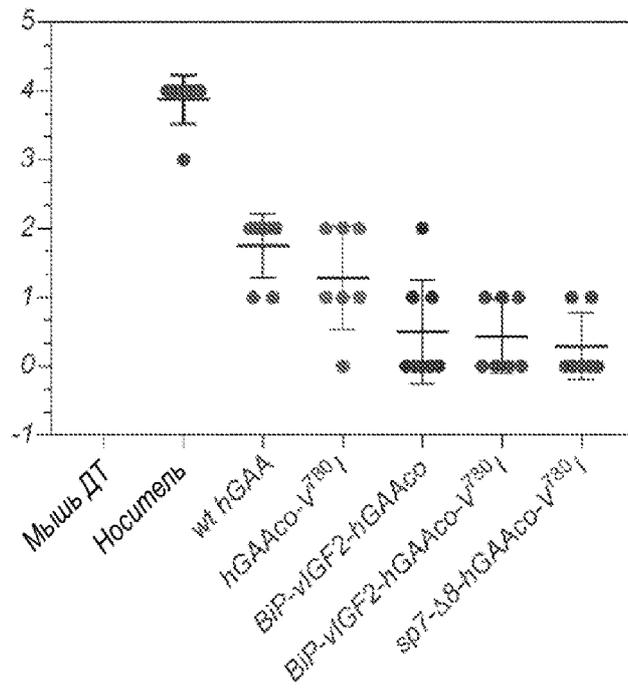
Фиг. 5G

sp7-Δ8-hGAAco V<sup>730</sup>I



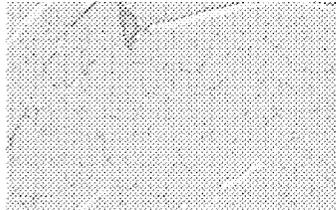
Фиг. 5H

Гистологическая оценка сердца



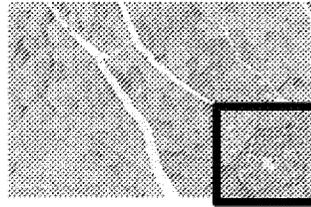
Фиг. 6А

+/+ ОСБ



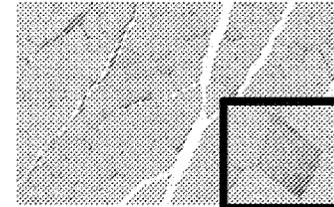
Фиг. 6В

-/- hGAA



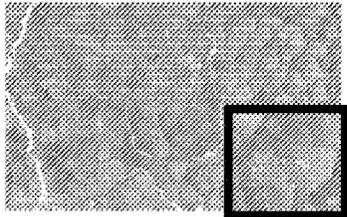
Фиг. 6С

-/- BiP.viGF2.hGAAco



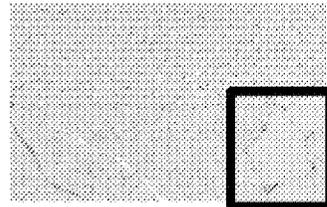
Фиг. 6D

-/- ОСБ



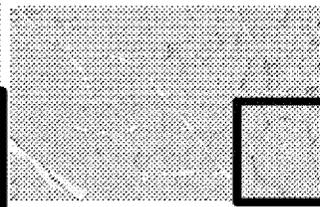
Фиг. 6Е

-/- hGAAcoV780I



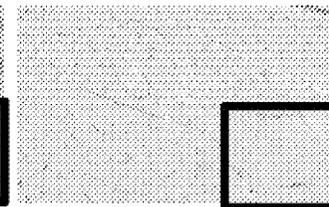
Фиг. 6F

-/- Sp7.Δ8.hGAAcoV780I

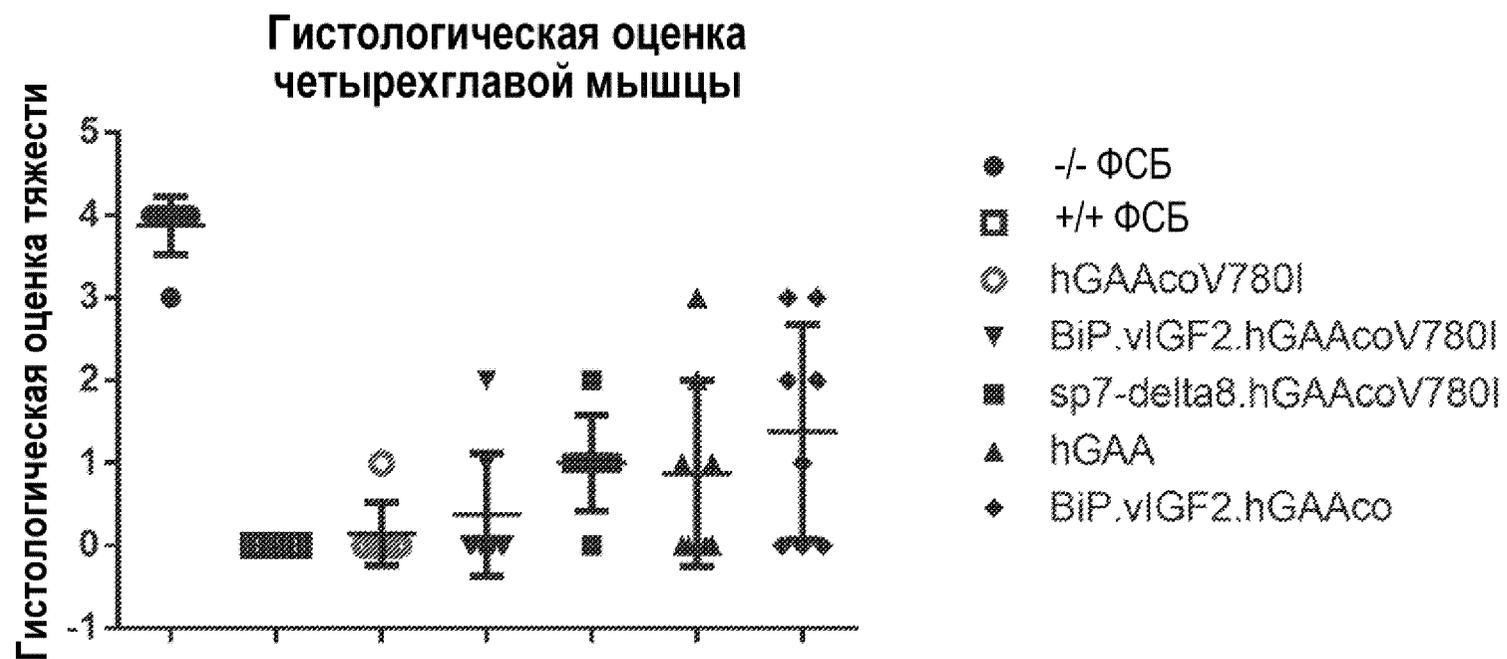


Фиг. 6G

-/- BiP.viGF2.hGAAcoV780I

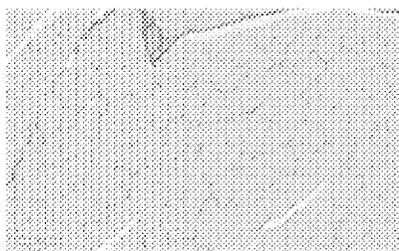


Фиг. 6H



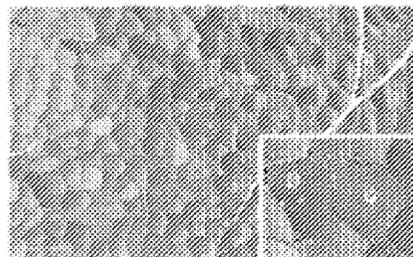
Фиг. 7А

+/+ ФСБ



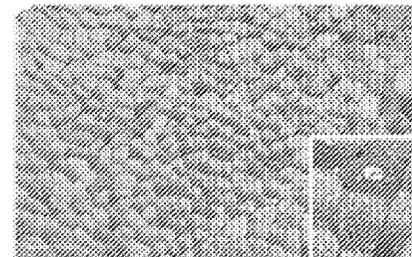
Фиг. 7В

-/- hGAA

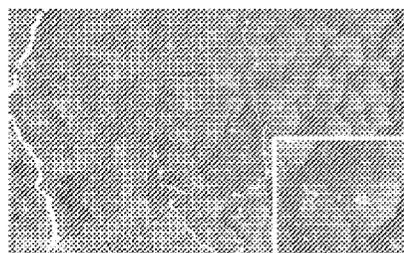


Фиг. 7С

-/- BiP.viGF2.hGAAco

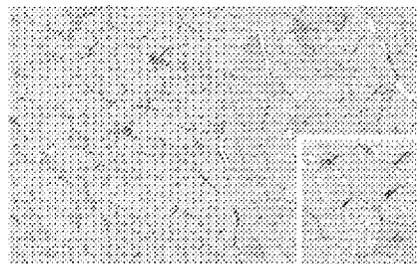


-/- ФСБ



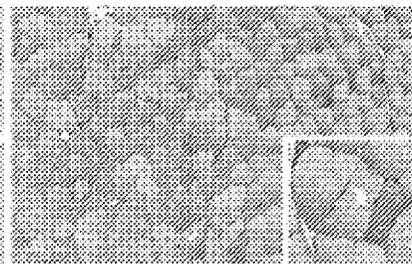
Фиг. 7D

-/- hGAAcoV780I



Фиг. 7E

-/- Sp7.Δ8.hGAAcoV780I



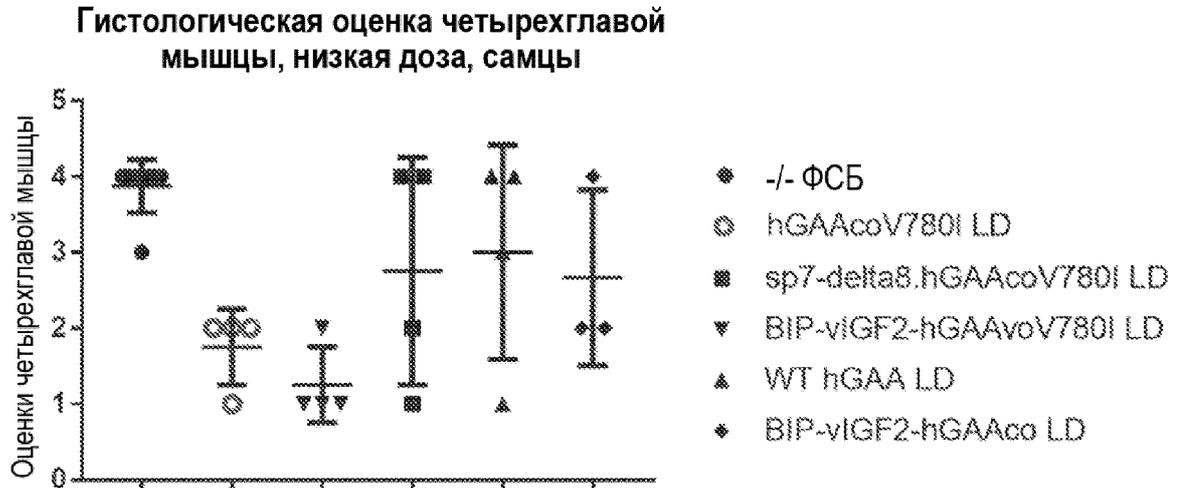
Фиг. 7F

-/- BiP.viGF2.hGAAcoV780I

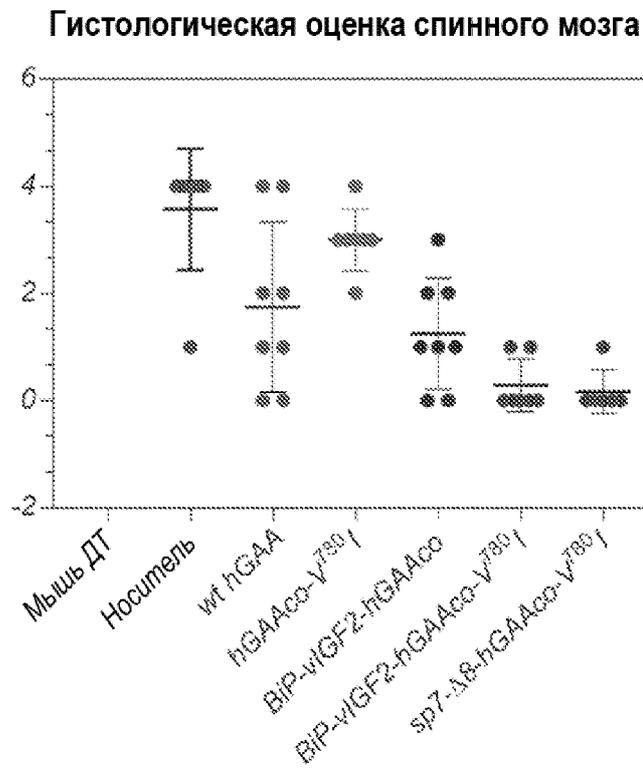


Фиг. 7G

Фиг. 7H

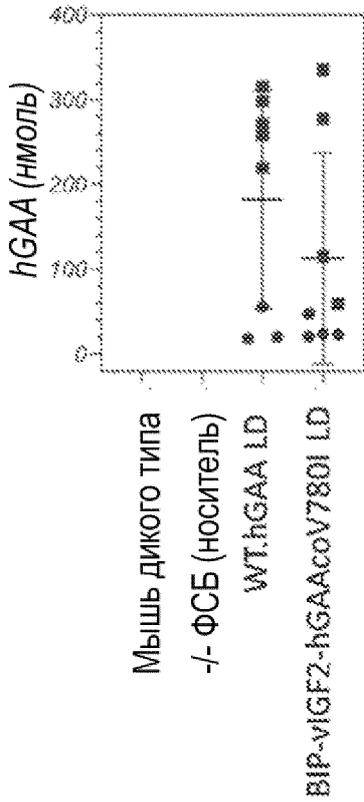


Фиг. 8



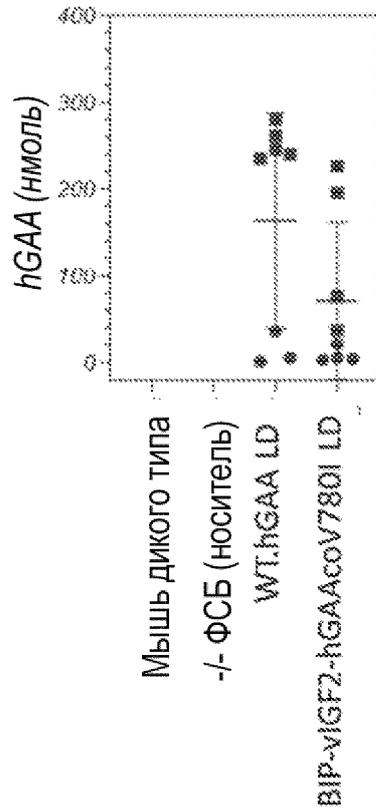
Фиг. 9А

Активность

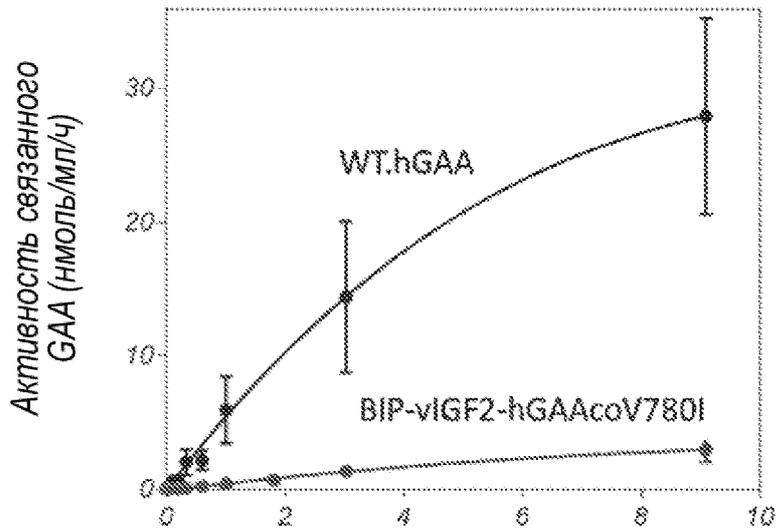


Фиг. 9В

Сигнатурный пептид MS

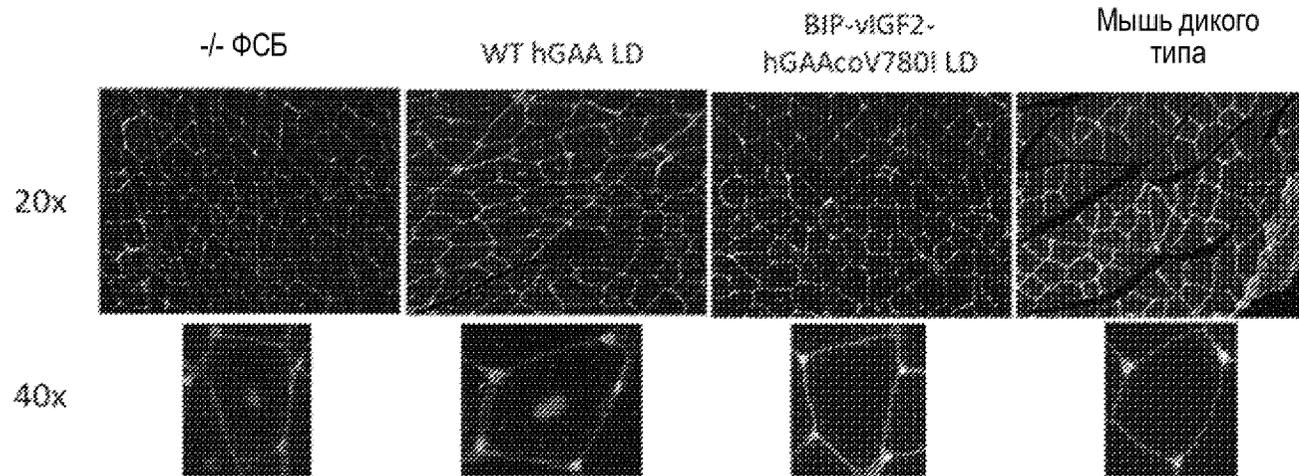


Фиг. 9С



Фиг. 10

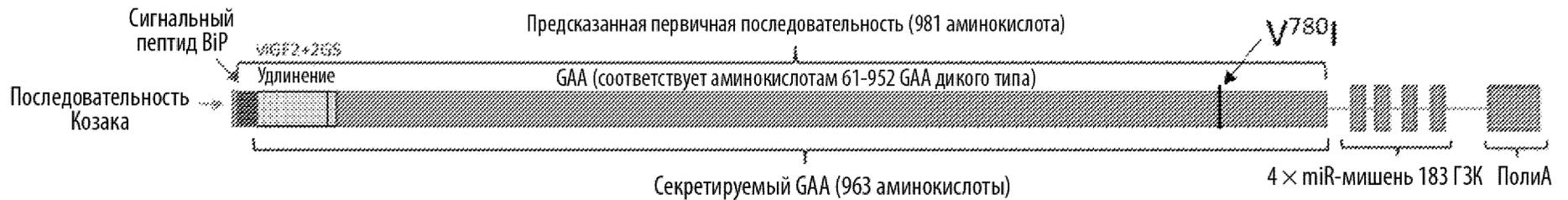
LC3b (маркер аутофагальных вакуолей) и лектин (мембрана)



11/46

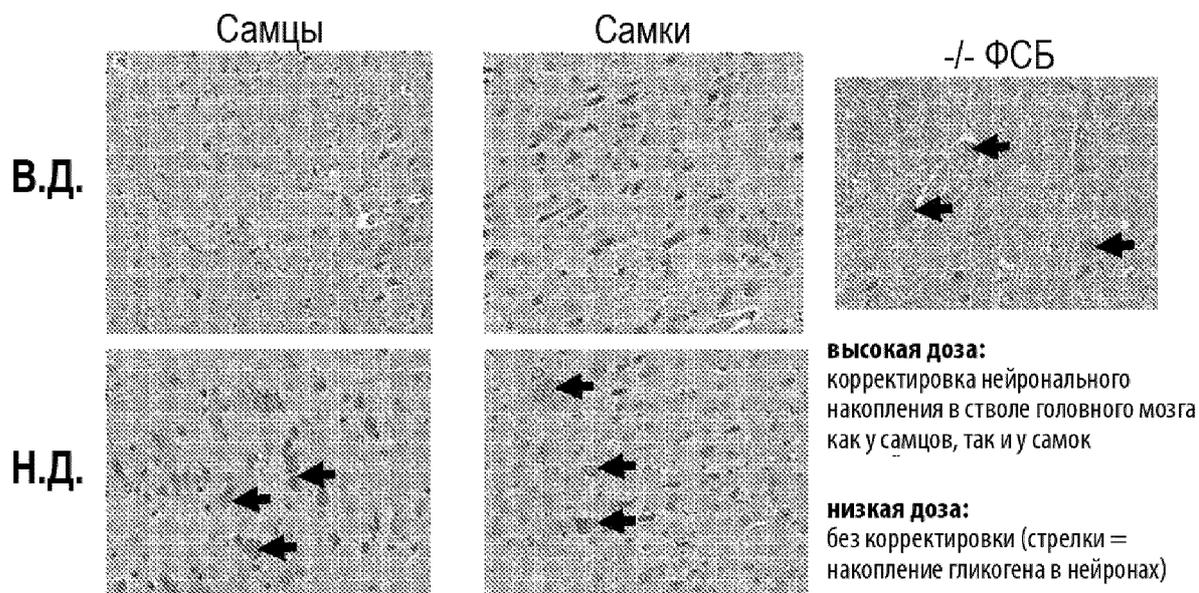
Фиг. 11

BiP-vIGF2.hGAAcoV780I.4xmiR183



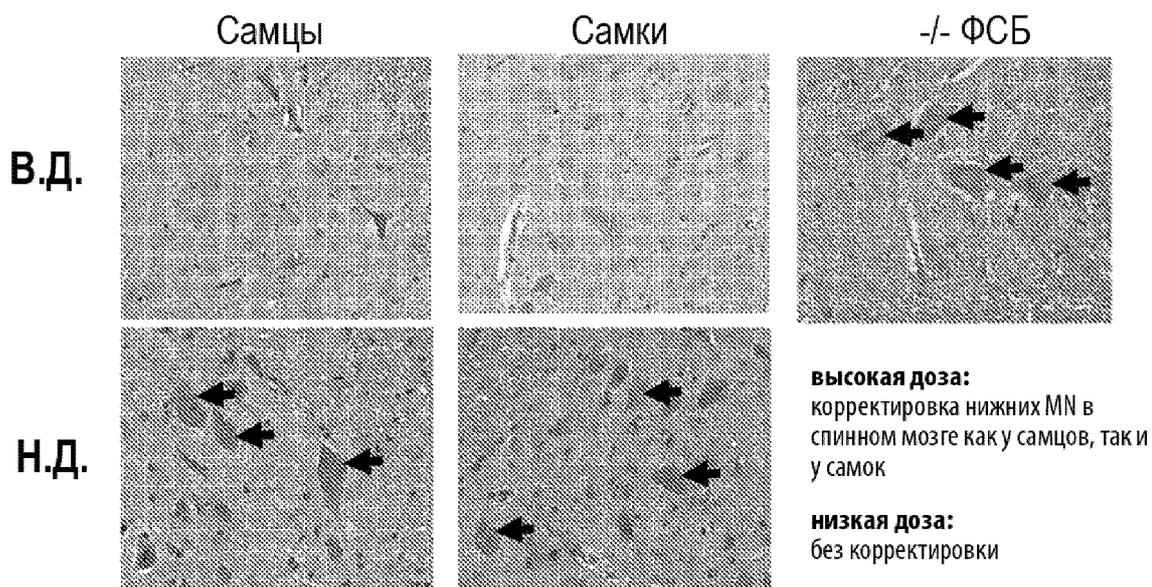
Фиг. 12

## Ствол головного мозга



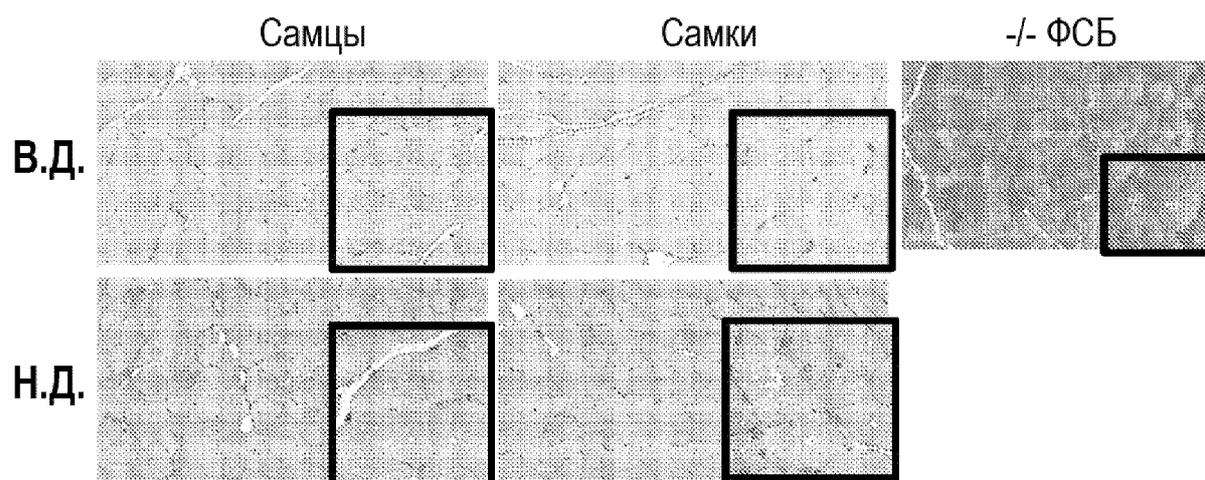
Фиг. 13

## Спинной мозг



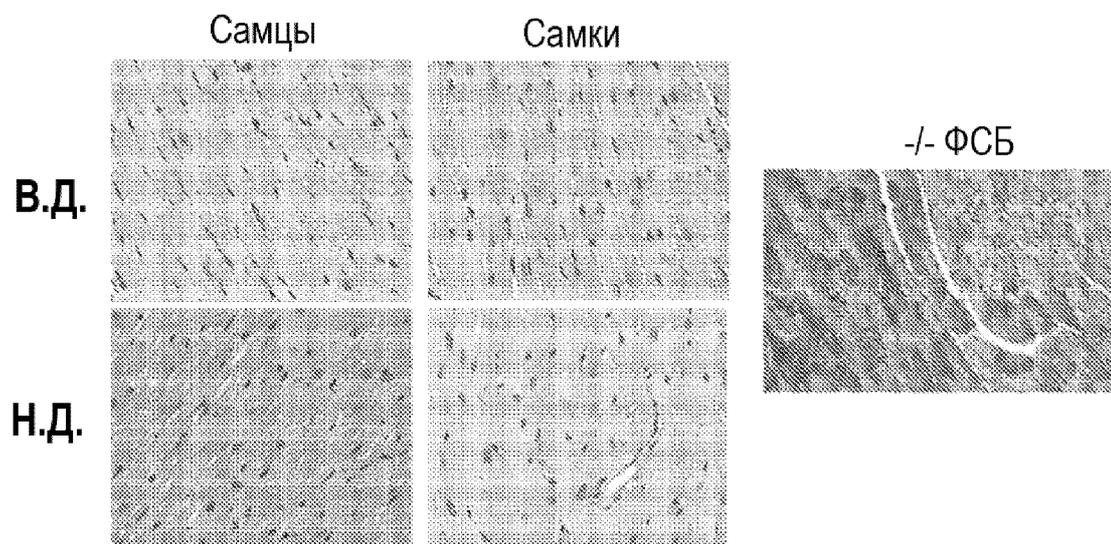
Фиг. 14

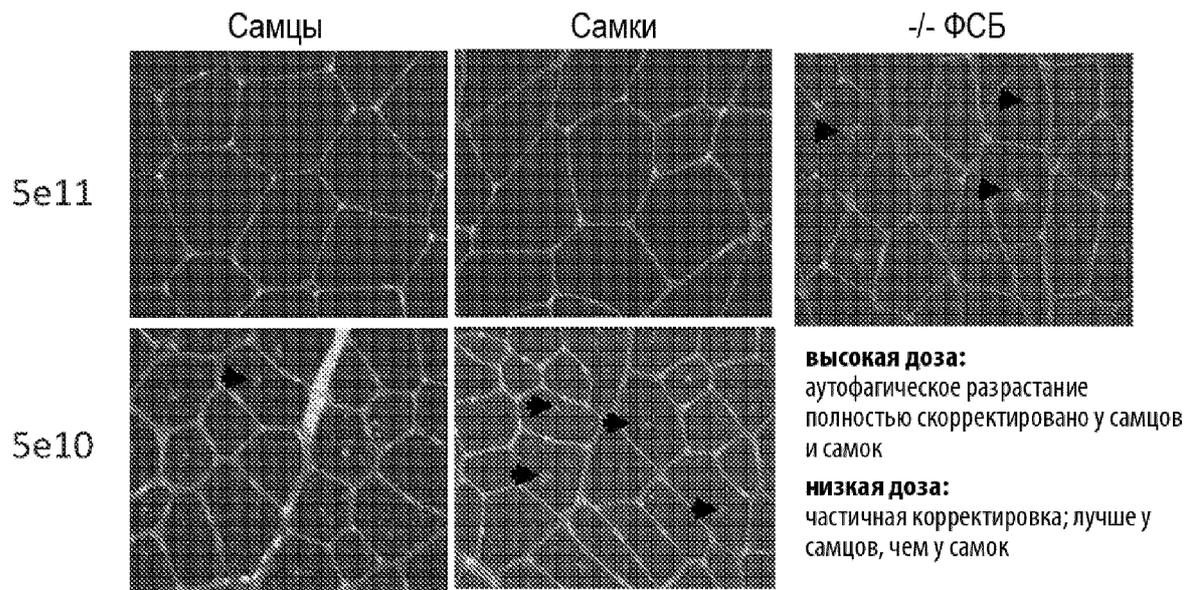
## Четырехглавая мышца



Фиг. 15

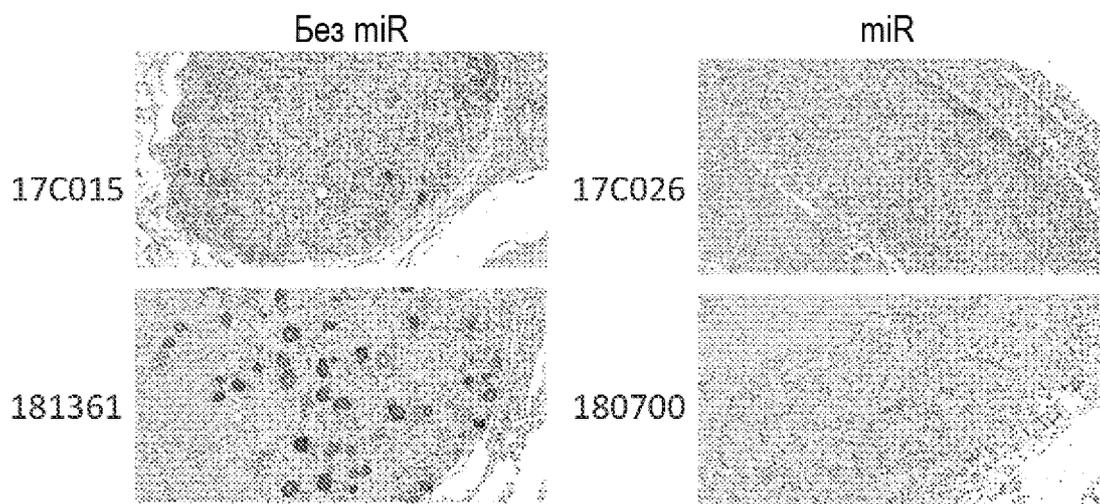
## Сердце





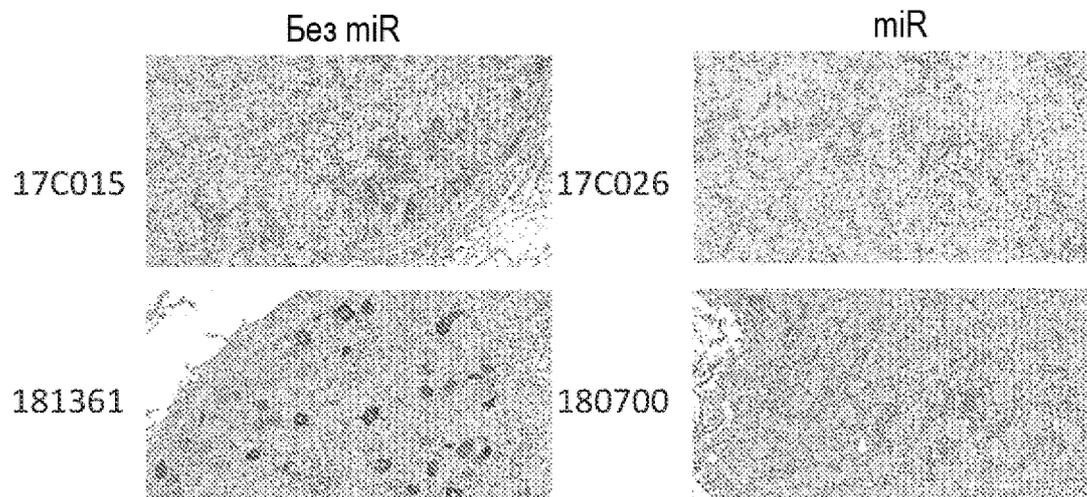
Фиг. 16

Фиг. 17 ИНС hGAA ГЗК шейного отдела

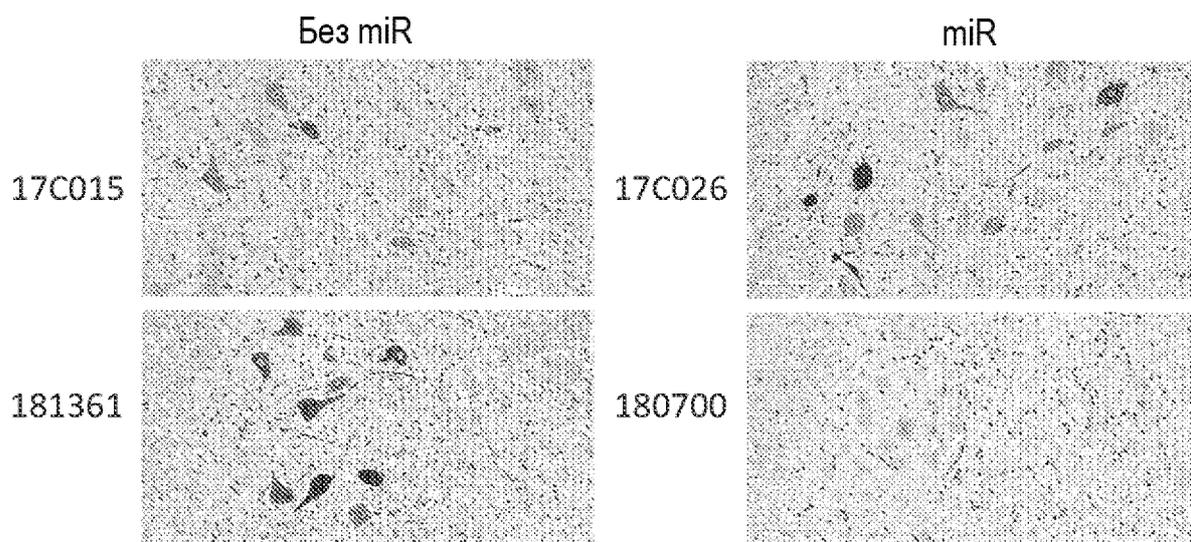


Фиг. 18

ИНС hGAA ГЗК поясничного отдела

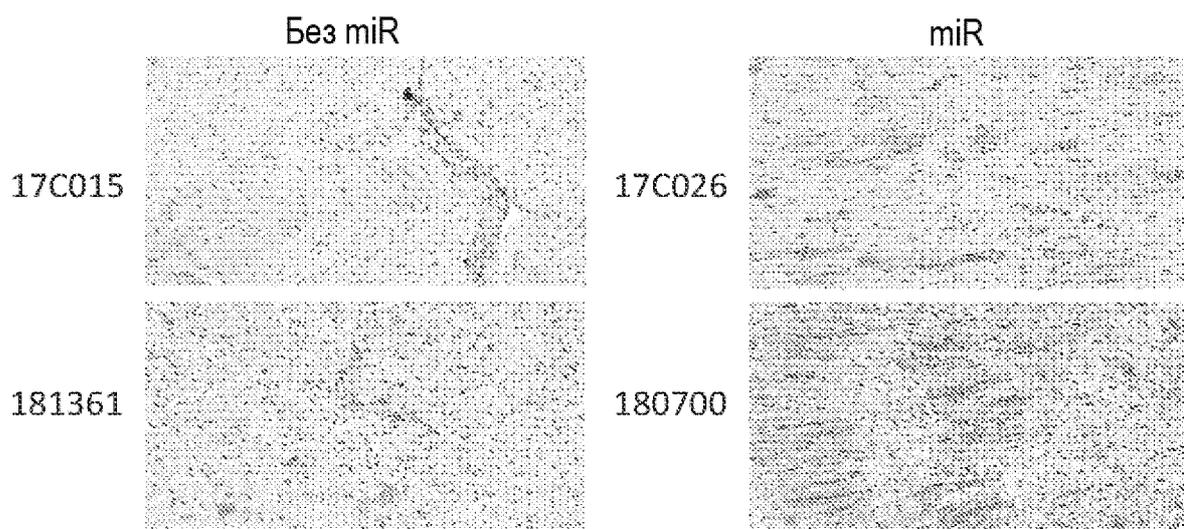


Фиг. 19 ИНС hGAA в нижних двигательных нейронах шейного отдела спинного мозга

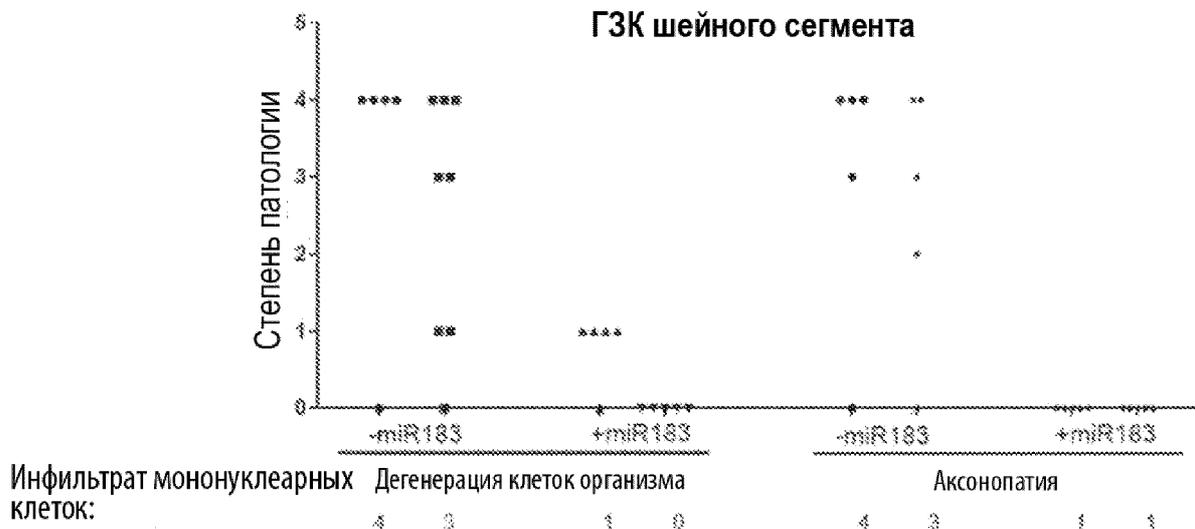


Фиг. 20

ИНС hGAA в сердце



Фиг. 21А

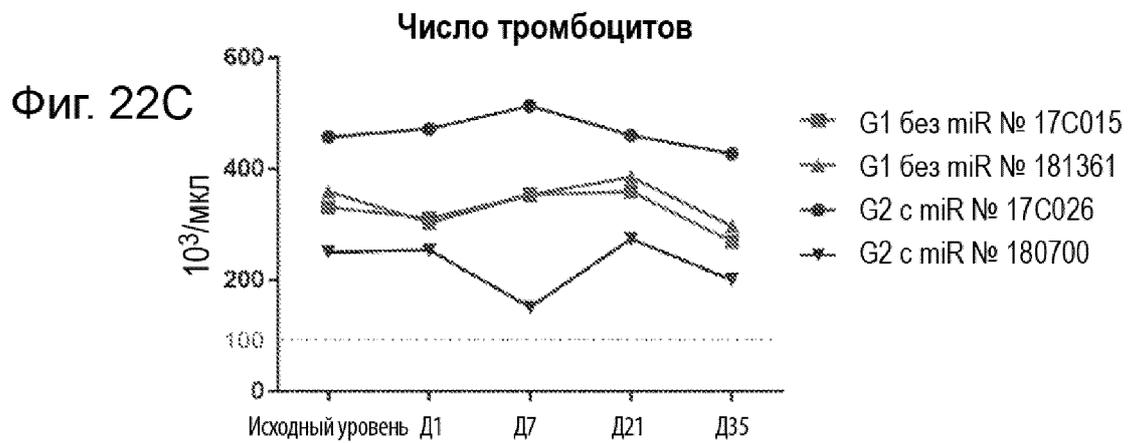
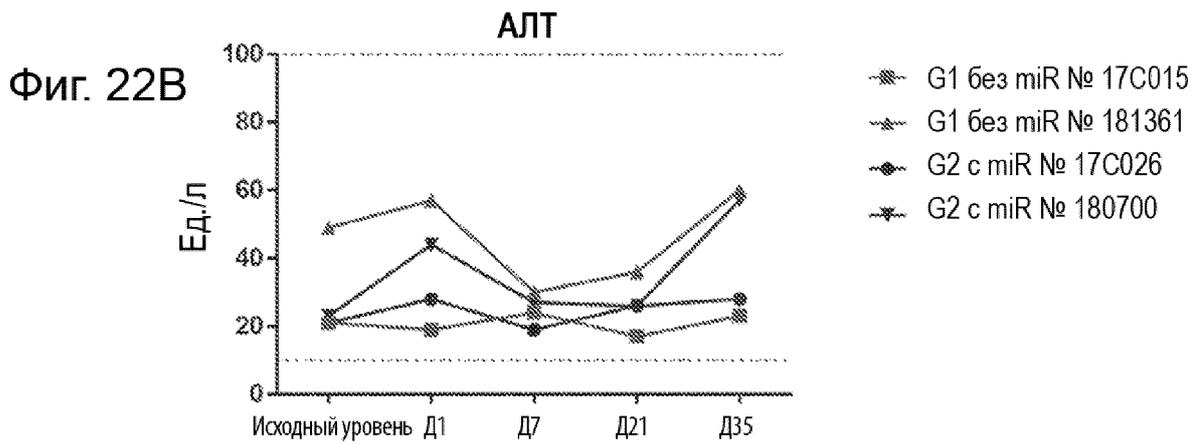
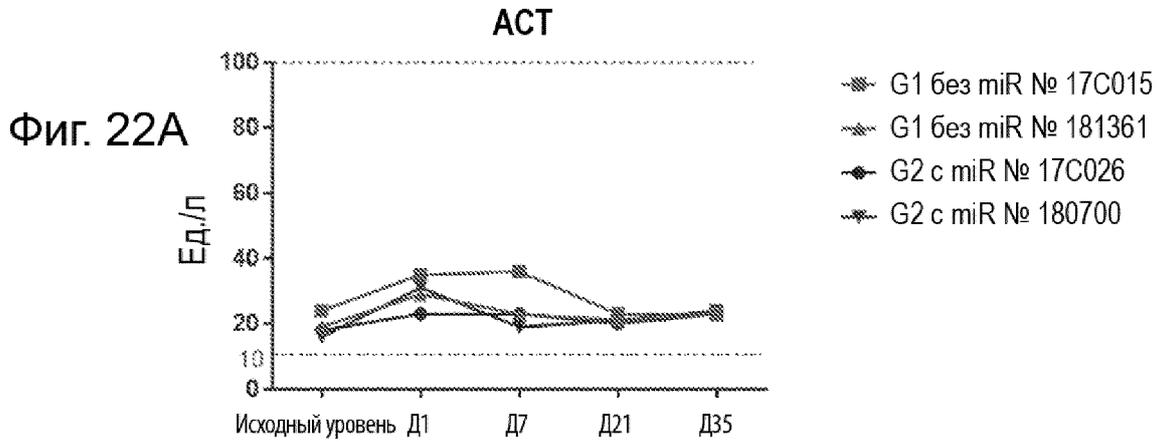


Фиг. 21В

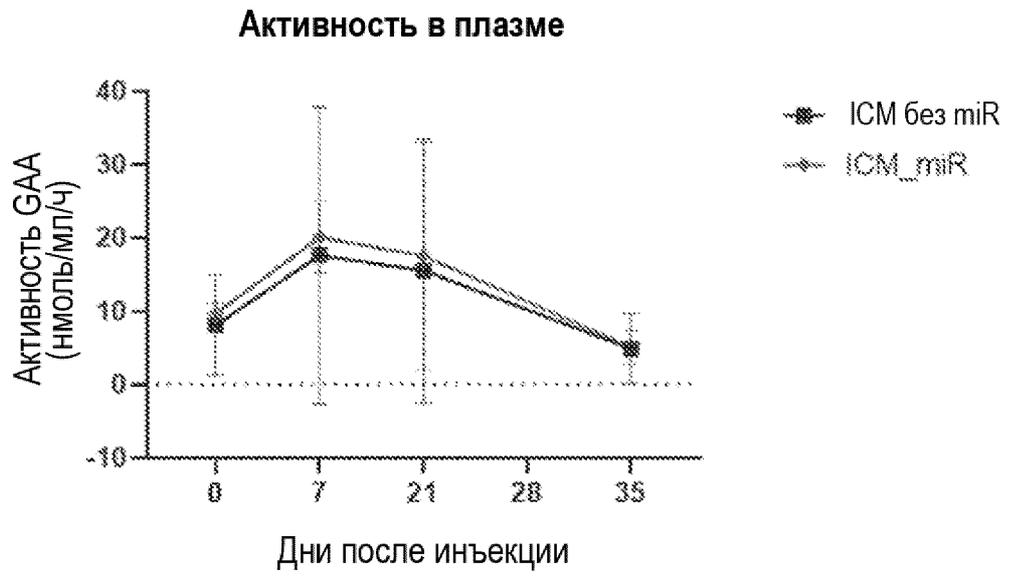


Фиг. 21С





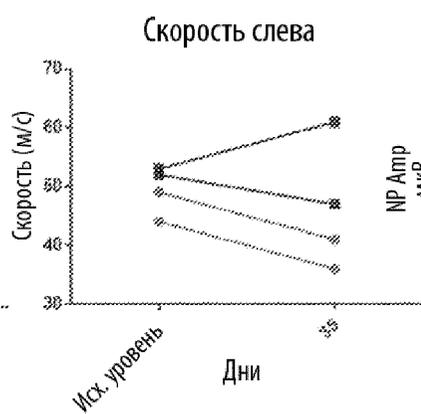
Фиг. 23



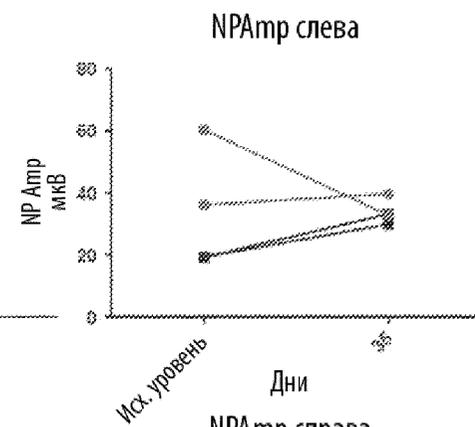
Фиг. 24А



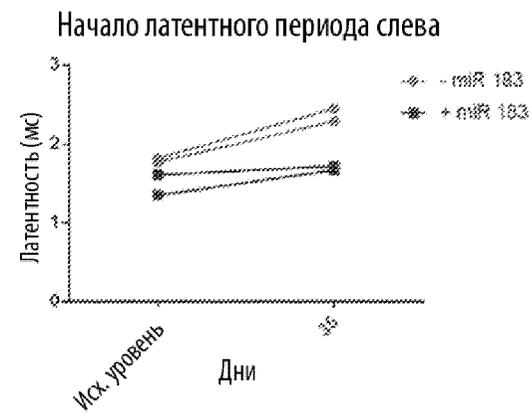
Фиг. 24В



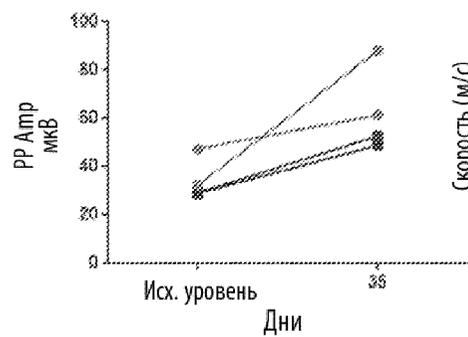
Фиг. 24С



Фиг. 24D

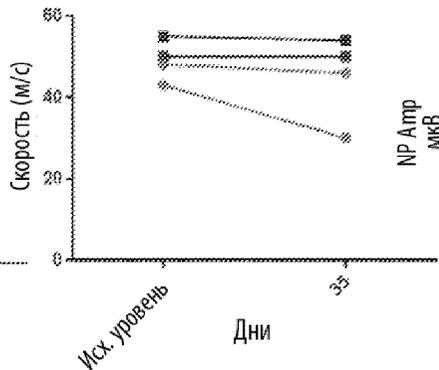


Срединный нерв справа PPAmp



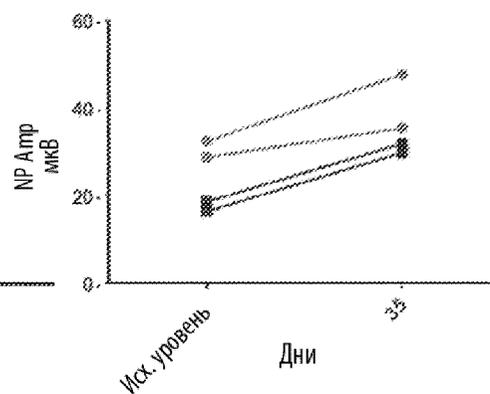
Фиг. 24Е

Скорость справа



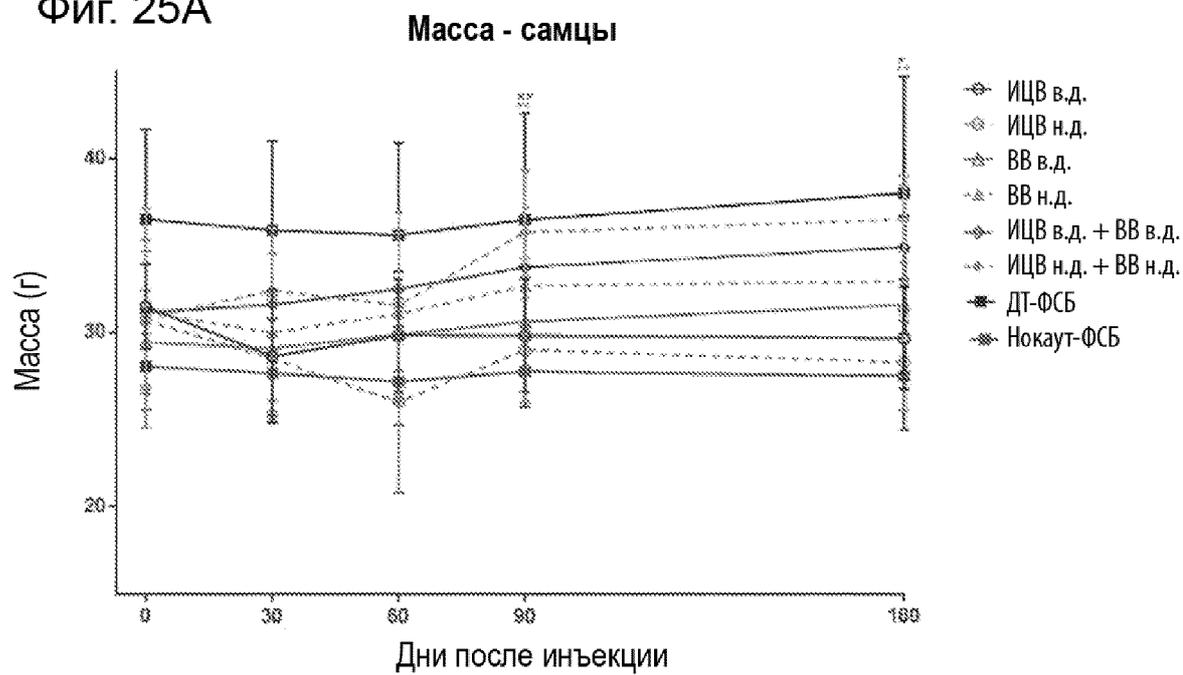
Фиг. 24F

NP Amp справа

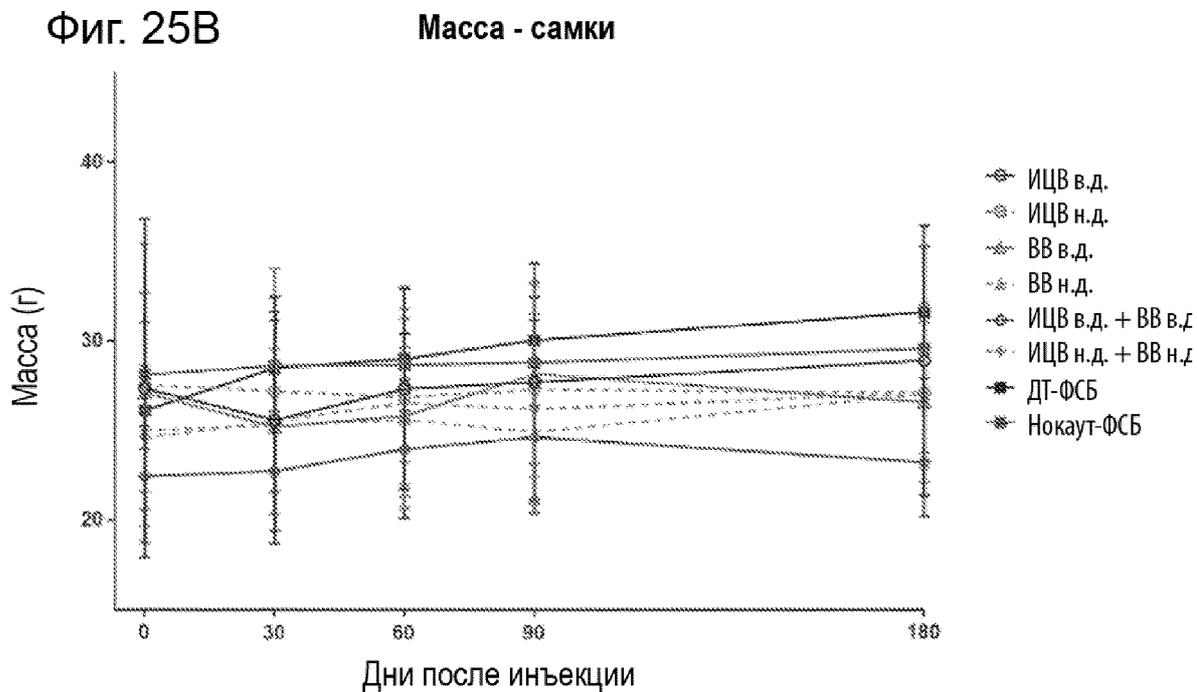


Фиг. 24G

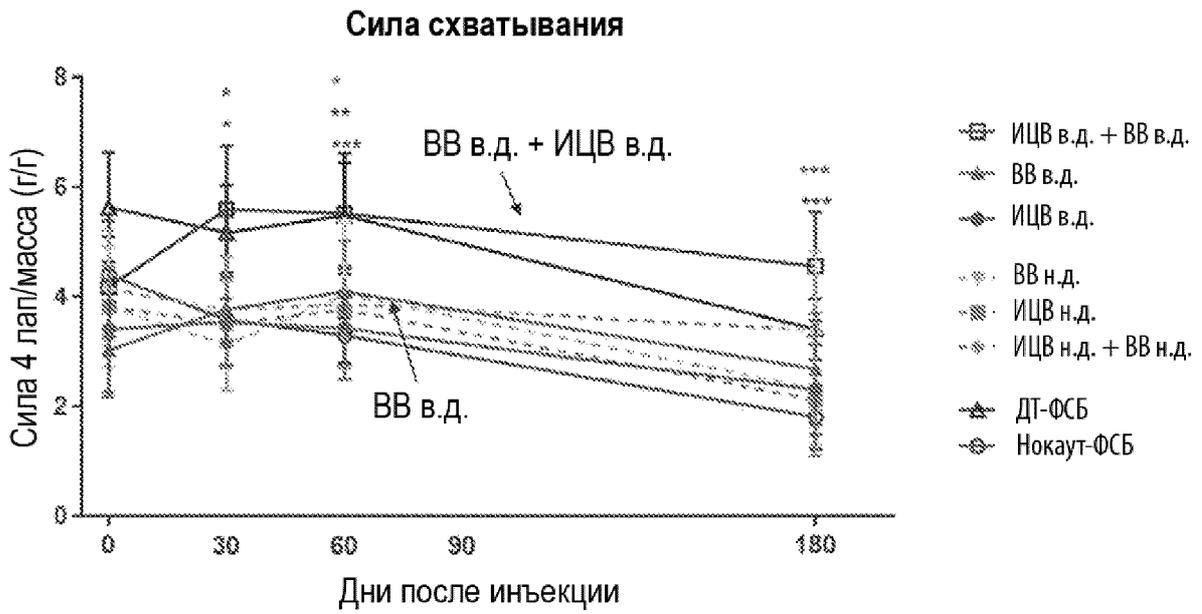
Фиг. 25А



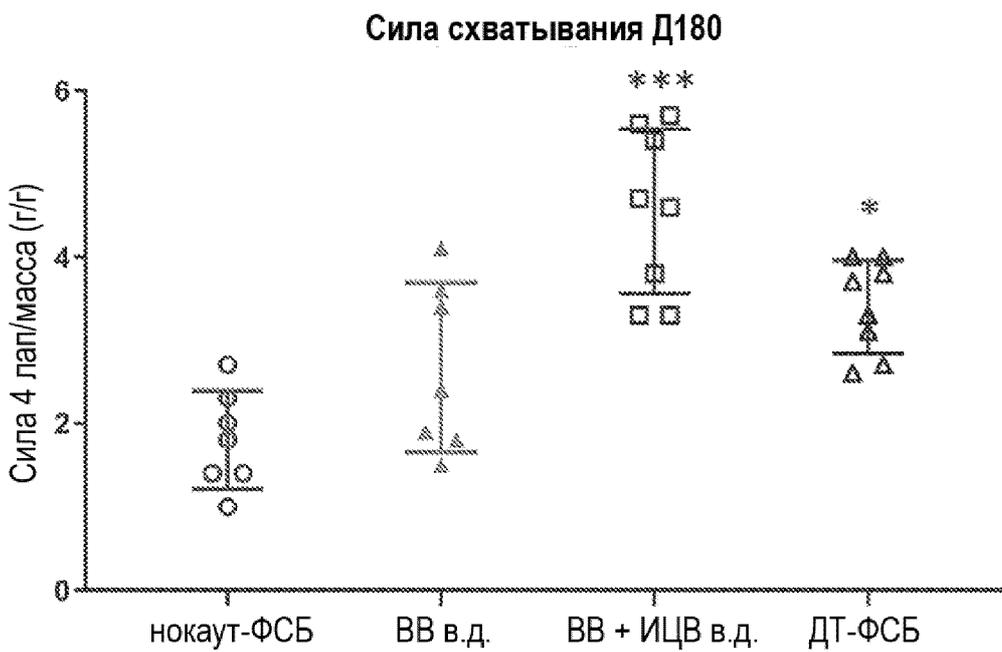
Фиг. 25В



Фиг. 26

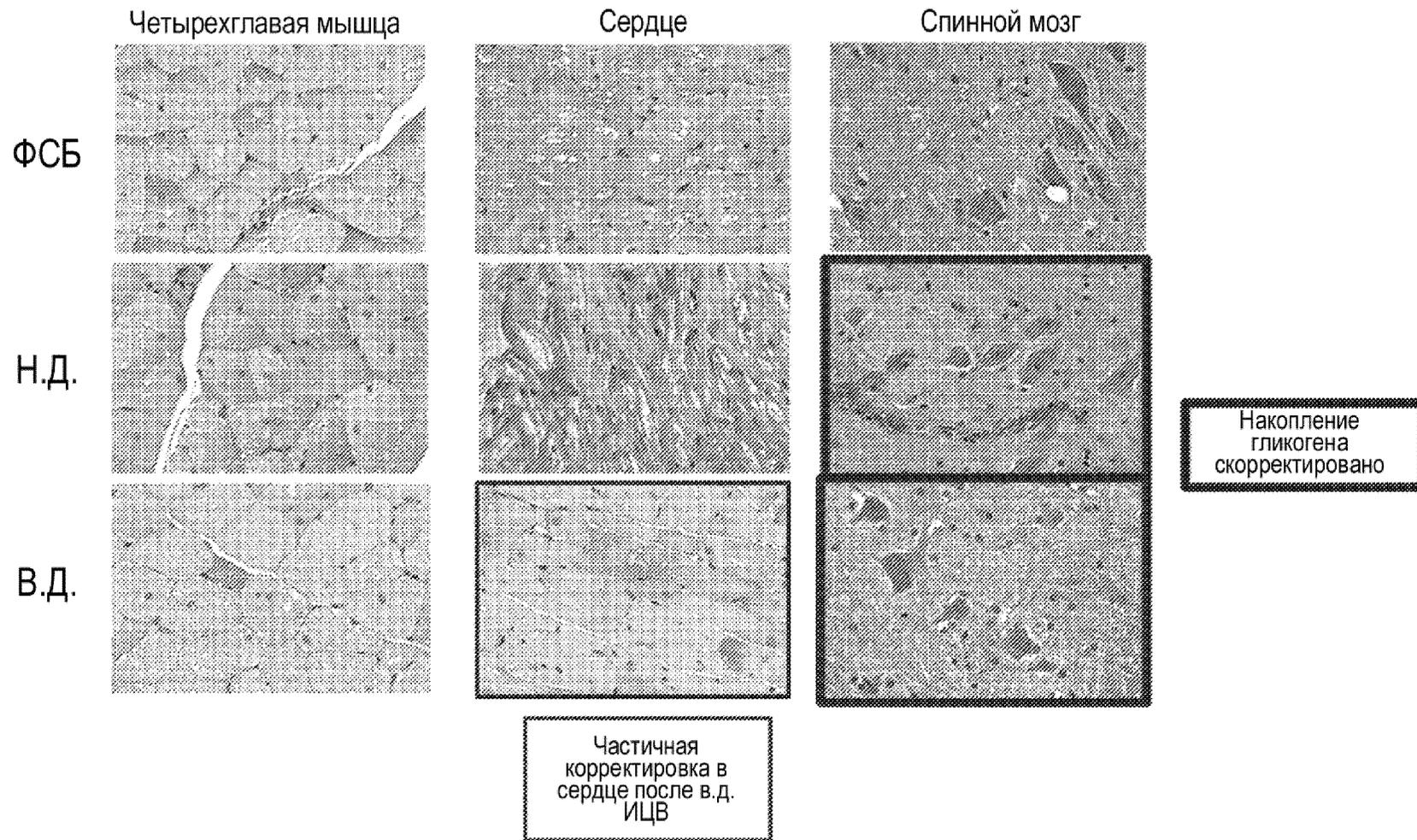


Фиг. 27



Фиг. 28

Мыши с болезнью Помпе после появления симптомов – ИЦВ путь



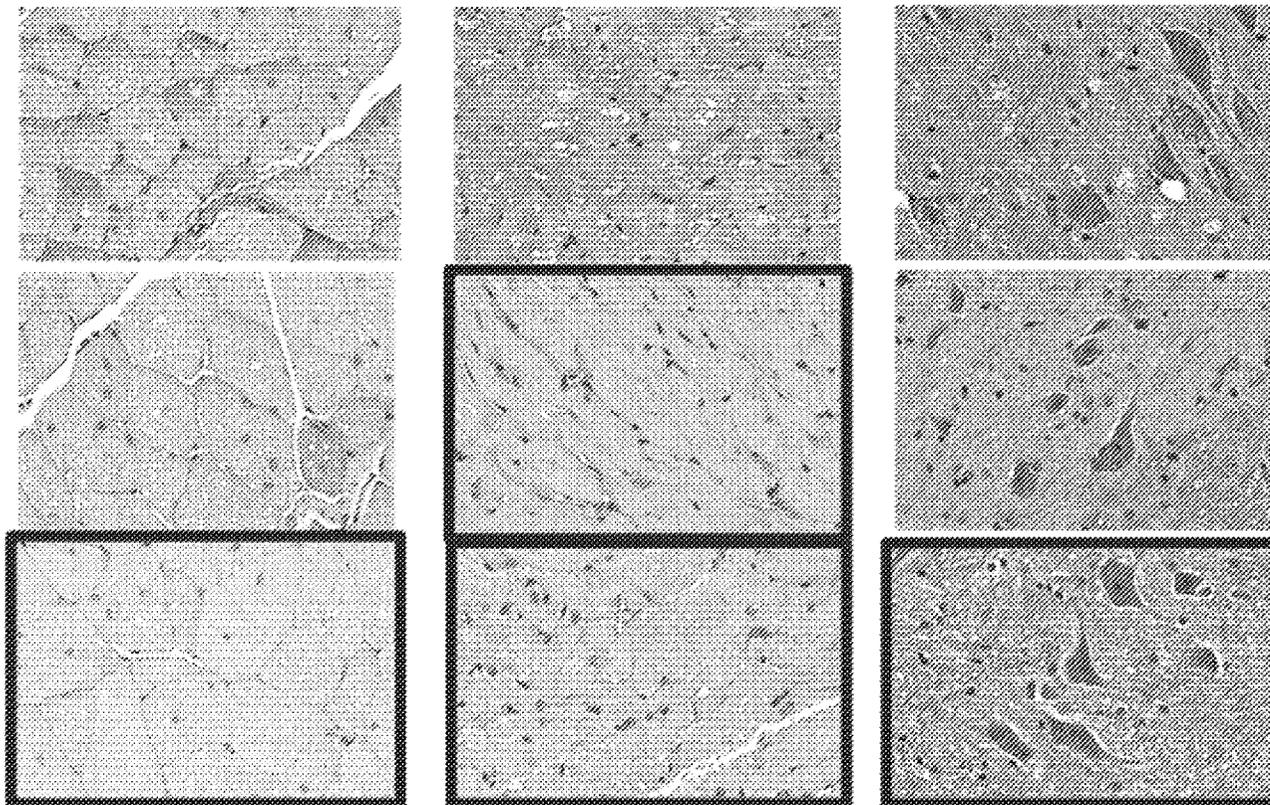
Фиг. 29

Взрослые мышцы с болезнью Помпе после появления симптомов – ВВ путь

Четырехглавая мышца

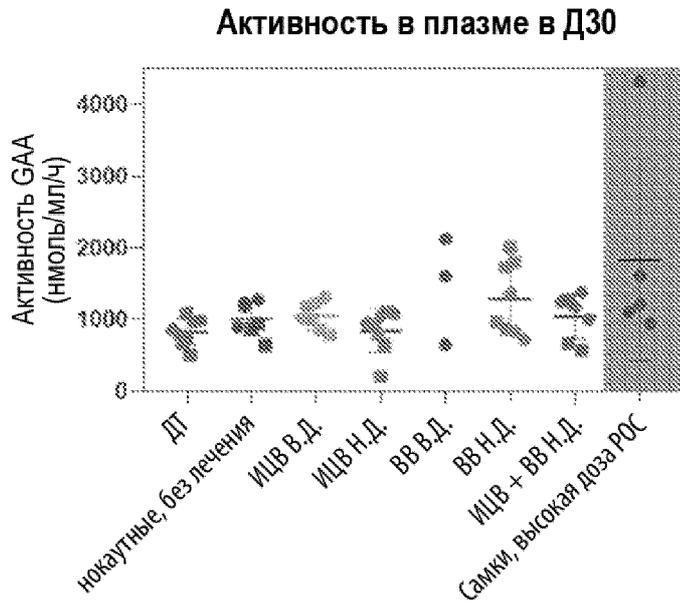
Сердце

Спинной мозг

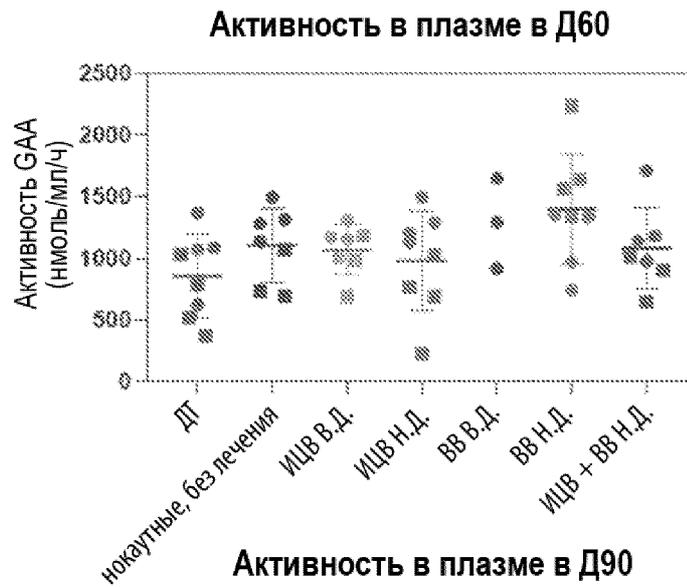


Накопление гликогена  
скорректировано

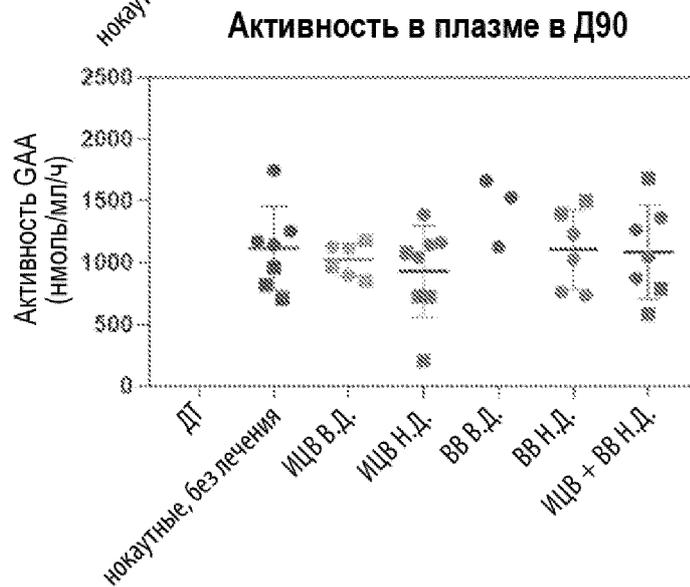
Фиг. 30А



Фиг. 30В



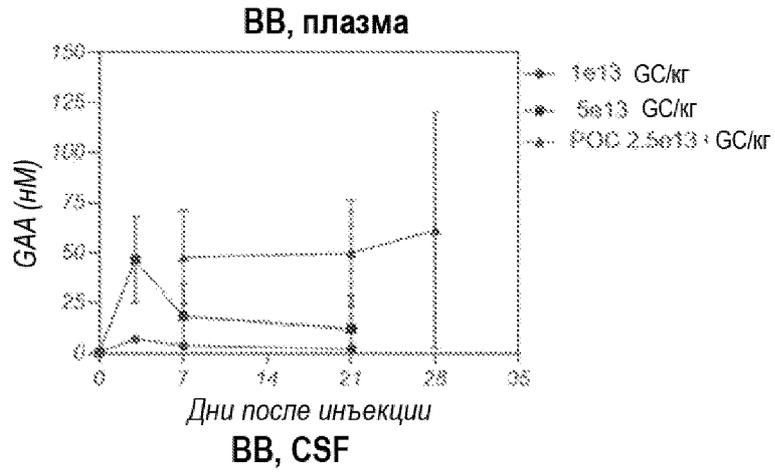
Фиг. 30С



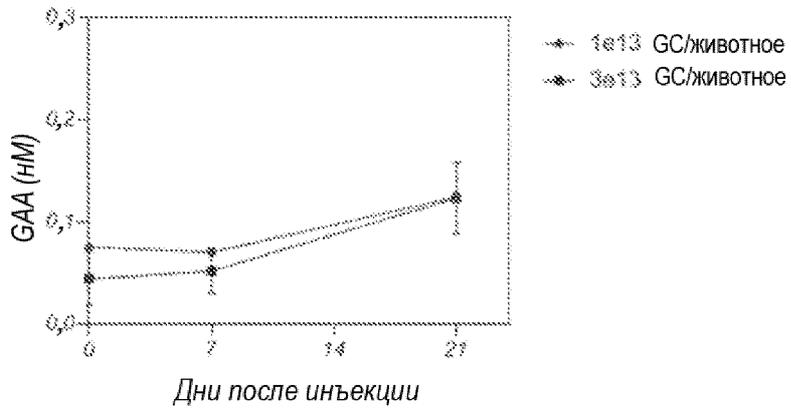
Фиг. 31

		День									
		-21	-10 (приблиз.)	0	3	7	21	29	35	60	
		Исходный уровень Clinpath NAV Неврологическое обследование	Предск.	Введение вектора Clinpath Плазма/CSF NAV/PBMC	Clinpath Плазма	Clinpath Плазма/CSF	Clinpath Плазма/CSF	Предск. ослабление	Clinpath Плазма/CSF Неврологическое обследование	Вскрытие Clinpath Плазма/CSF NAV/PBMC Неврологическое обследование	
Обозначение группы		1	2	3	4	5	6*				
N/группа		2	2	2	2	2	2	2			
Путь введения		BB н.д.	BB в.д.	ICM н.д.	ICM в.д.	BB в.д. ICM в.д.	BB в.д. ICM н.д.				
Доза вектора		1e13 GC/kg	5e13 GC/kg	1e13 GC	3e13 GC	5E13 GC/kg 3e13 GC	1E14 GC/kg 1e13 GC				

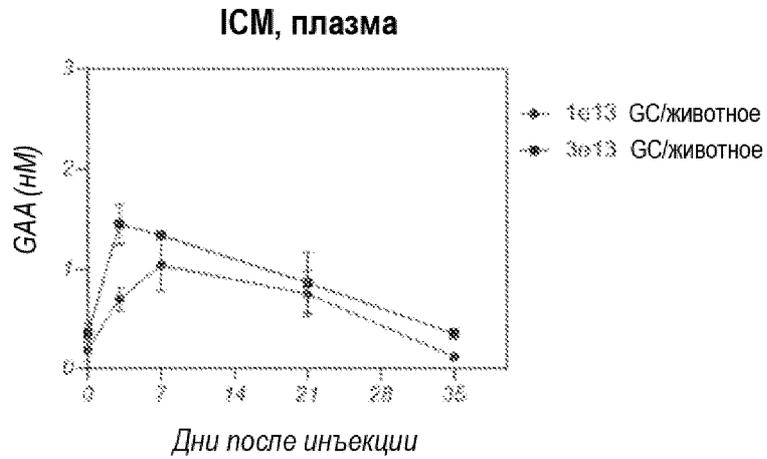
Фиг. 32А



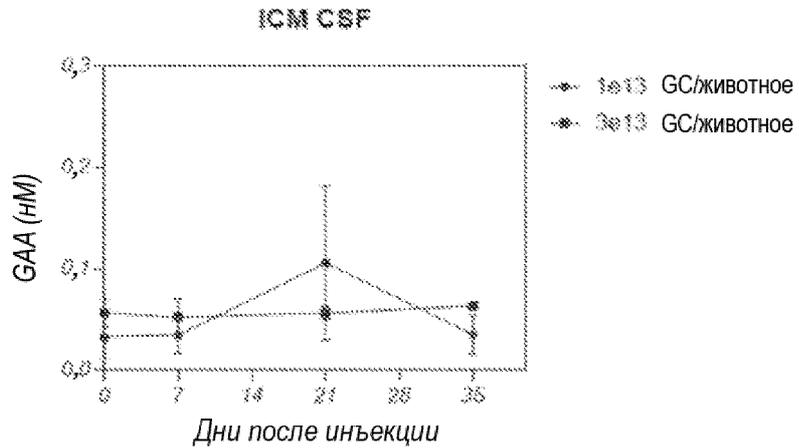
Фиг. 32В



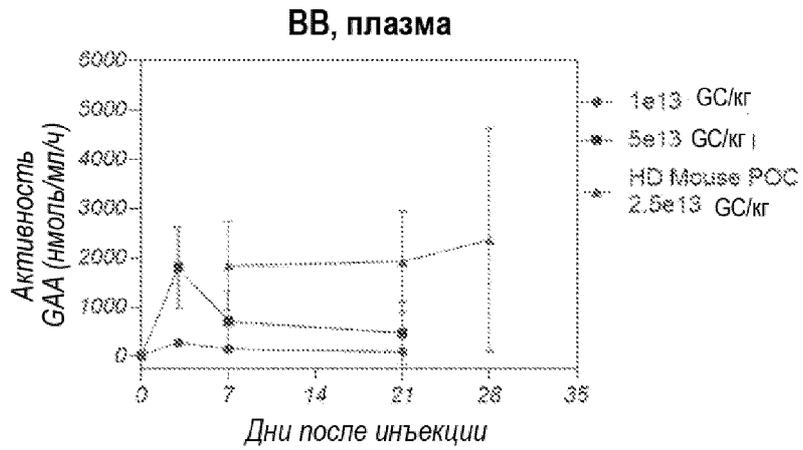
Фиг. 32С



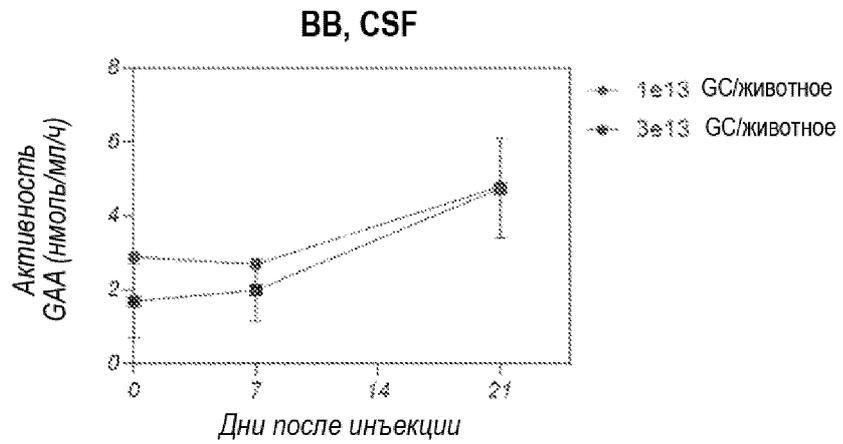
Фиг. 32D



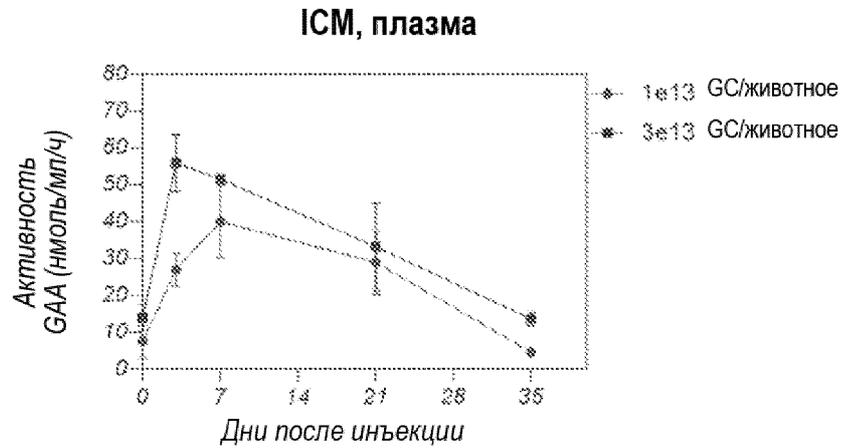
Фиг. 32Е



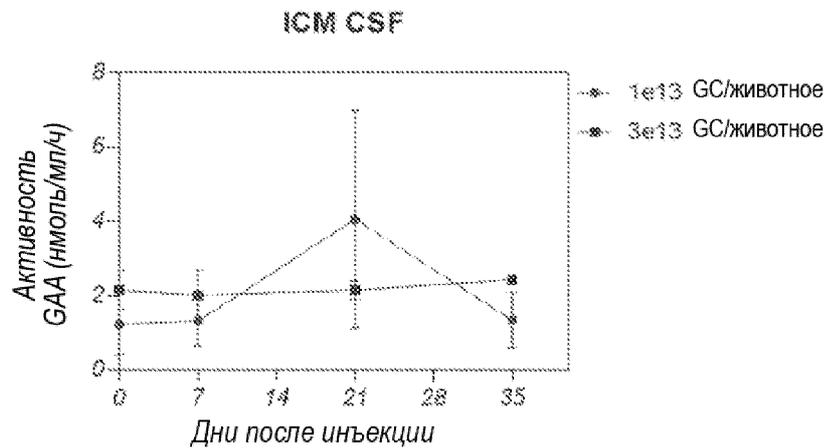
Фиг. 32F



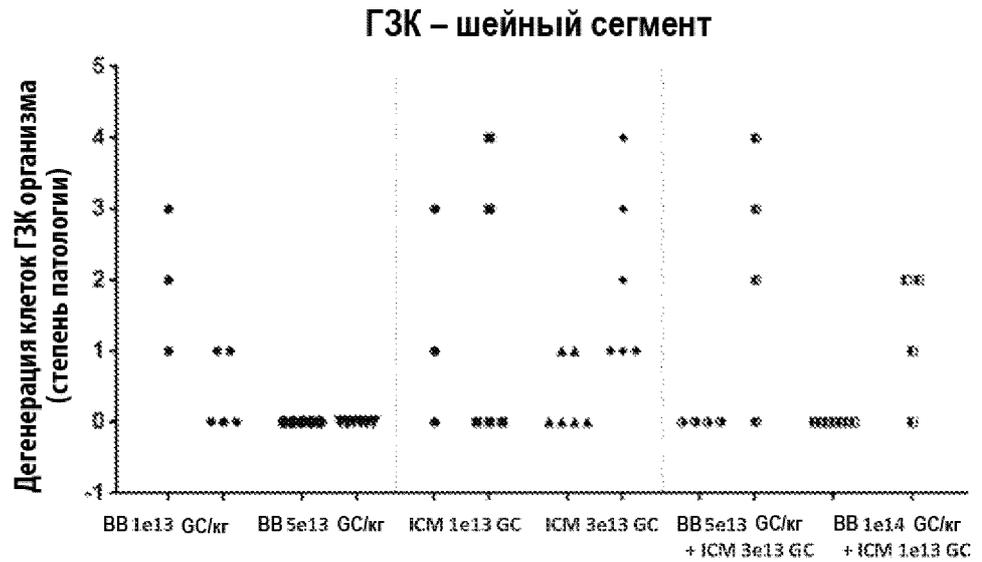
Фиг. 32G



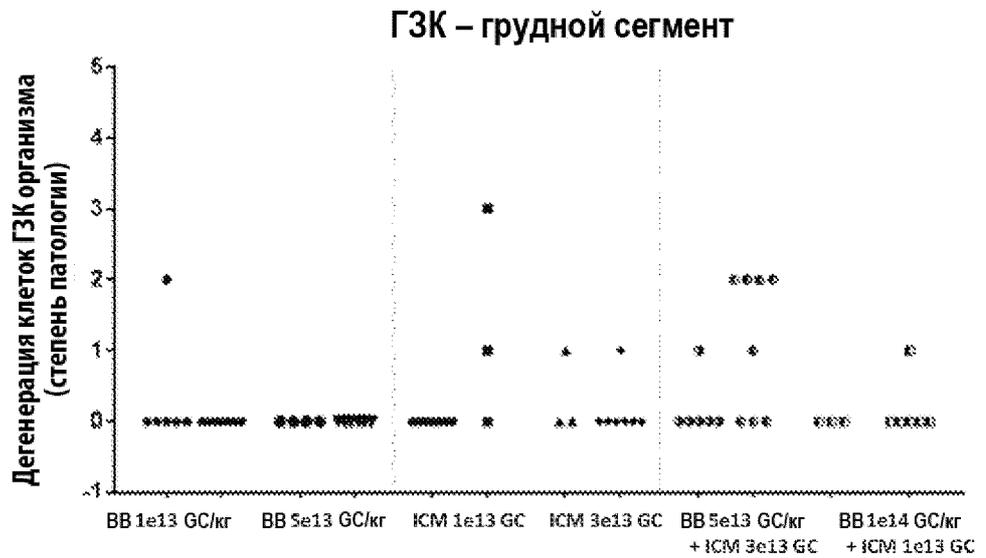
Фиг. 32H



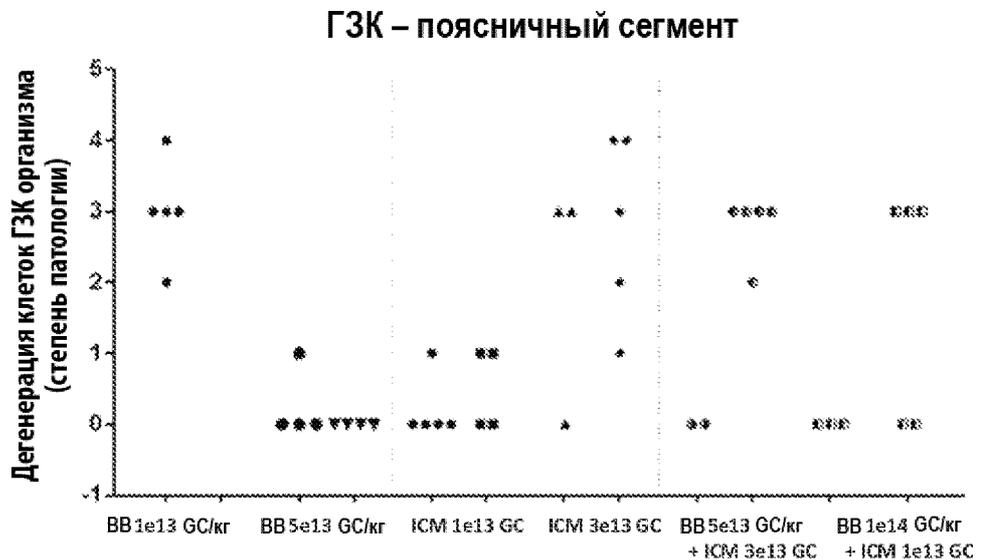
Фиг. 33А



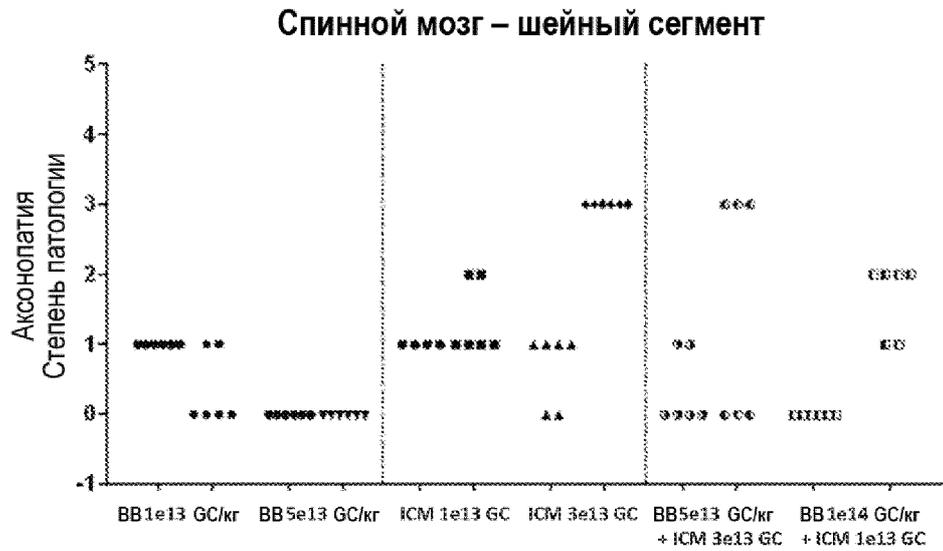
Фиг. 33В



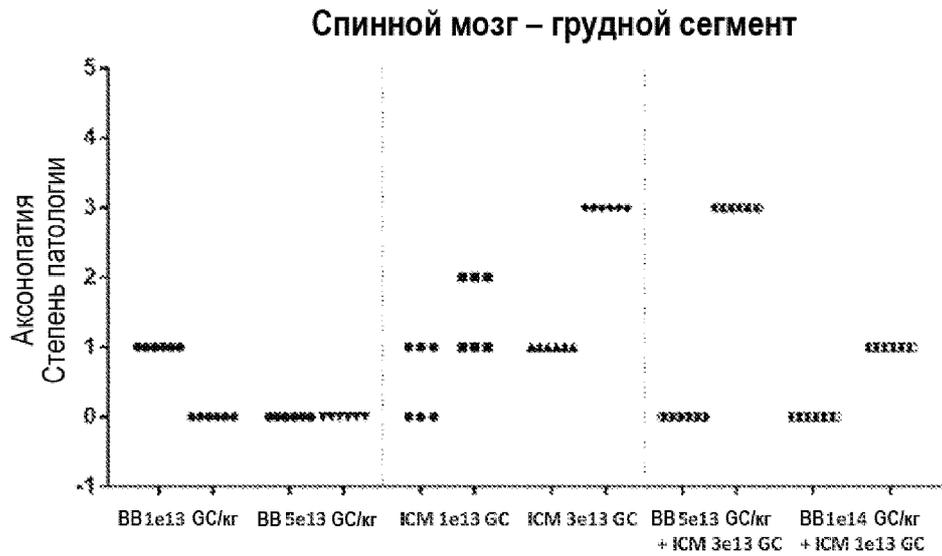
Фиг. 33С



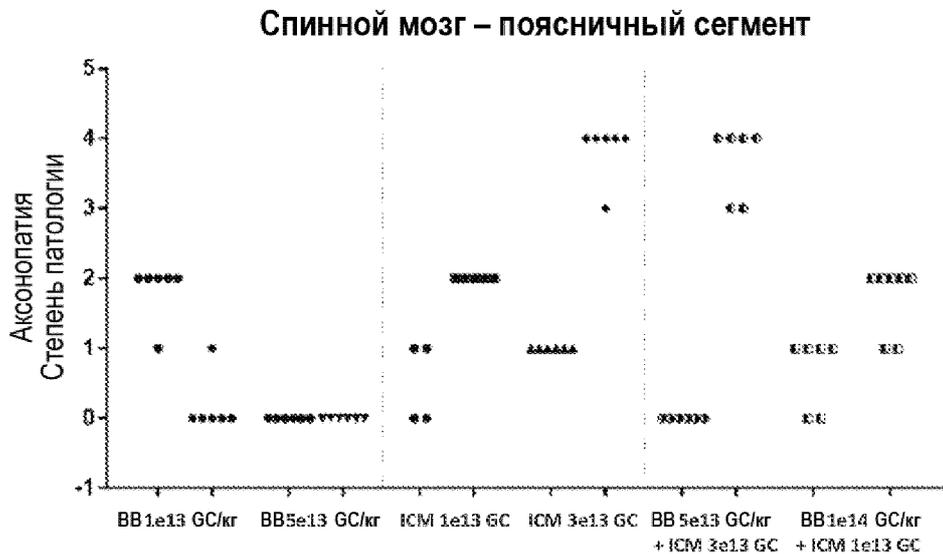
Фиг. 33D



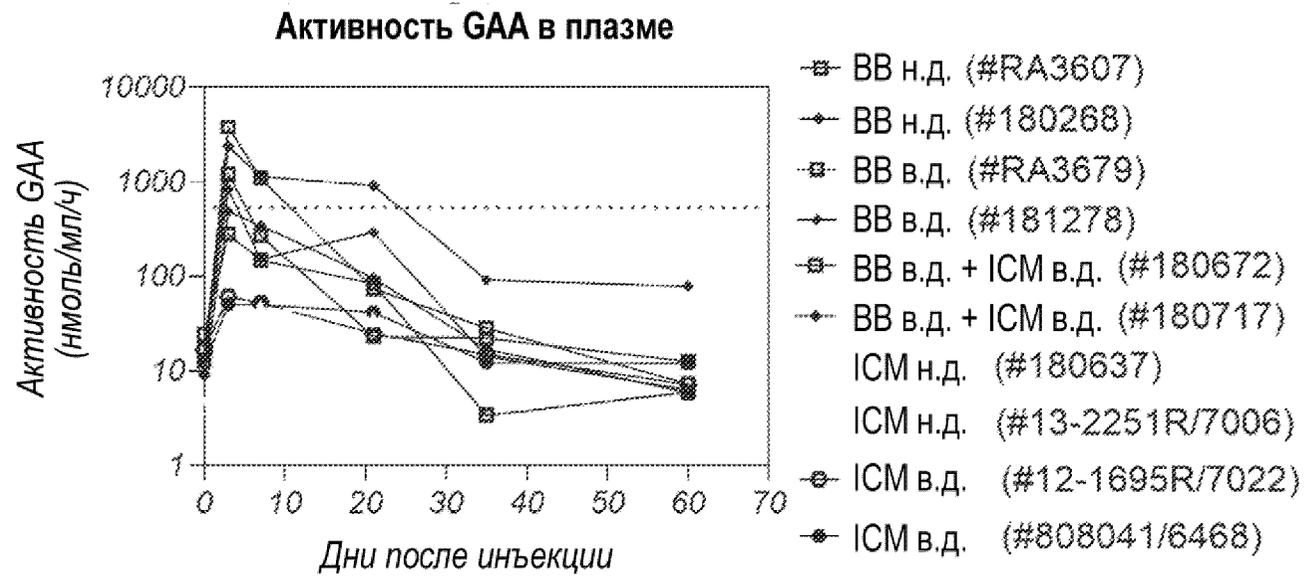
Фиг. 33E



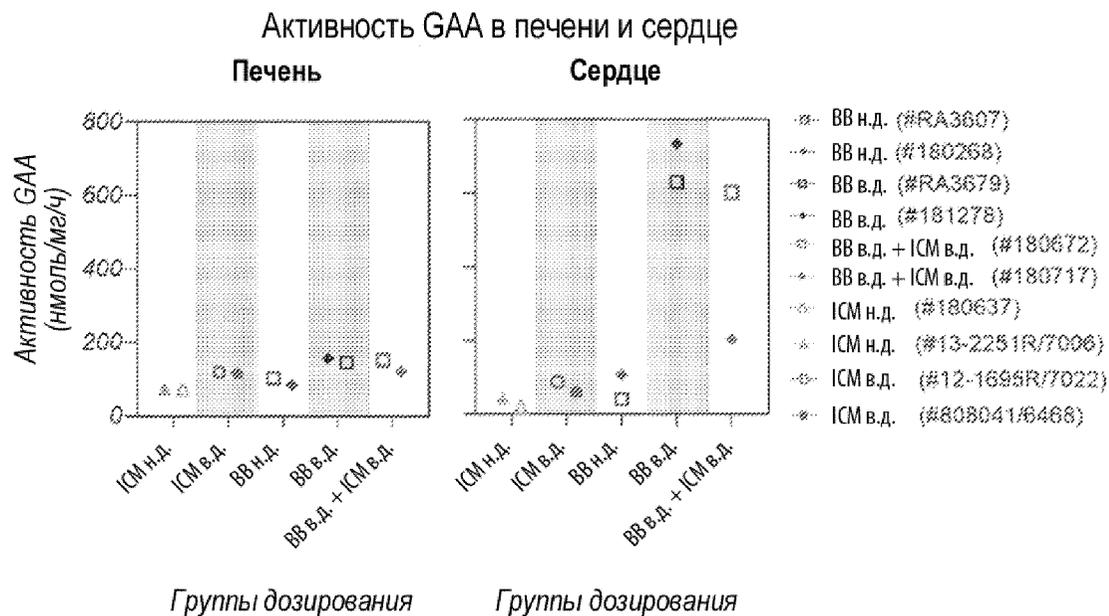
Фиг. 33F



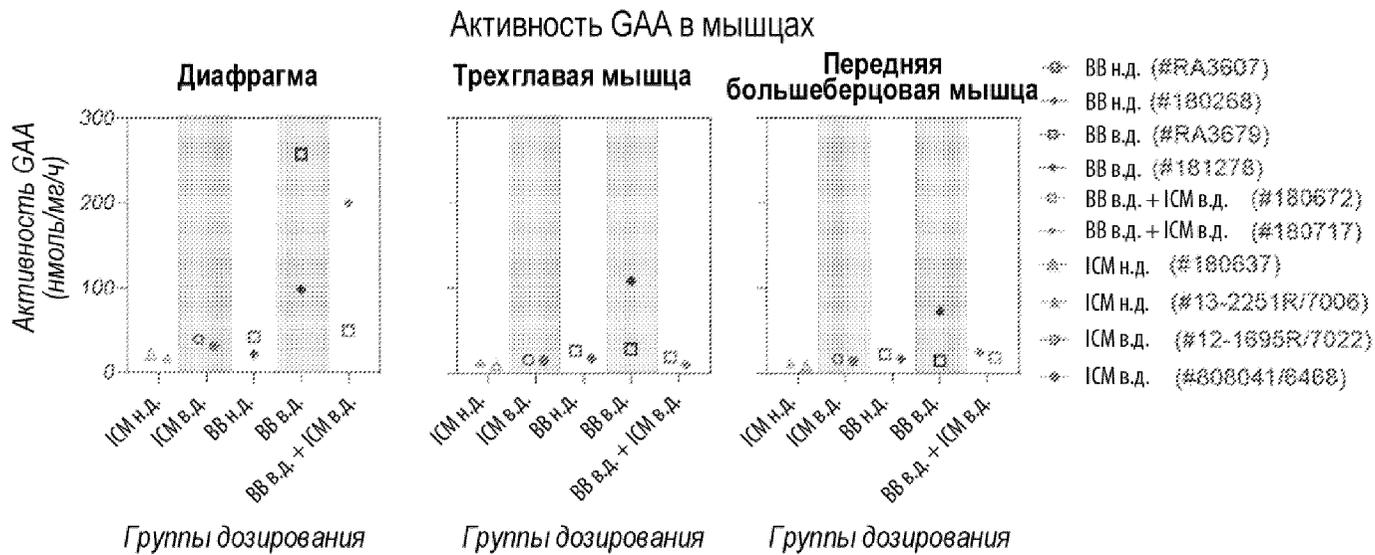
Фиг. 34



Фиг. 35А

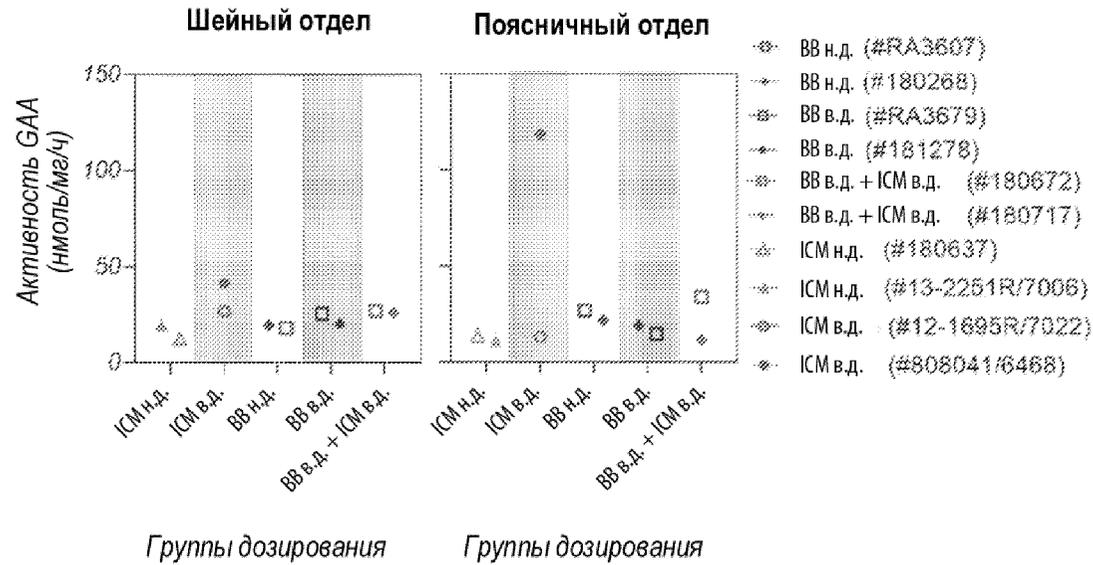


Фиг. 35В



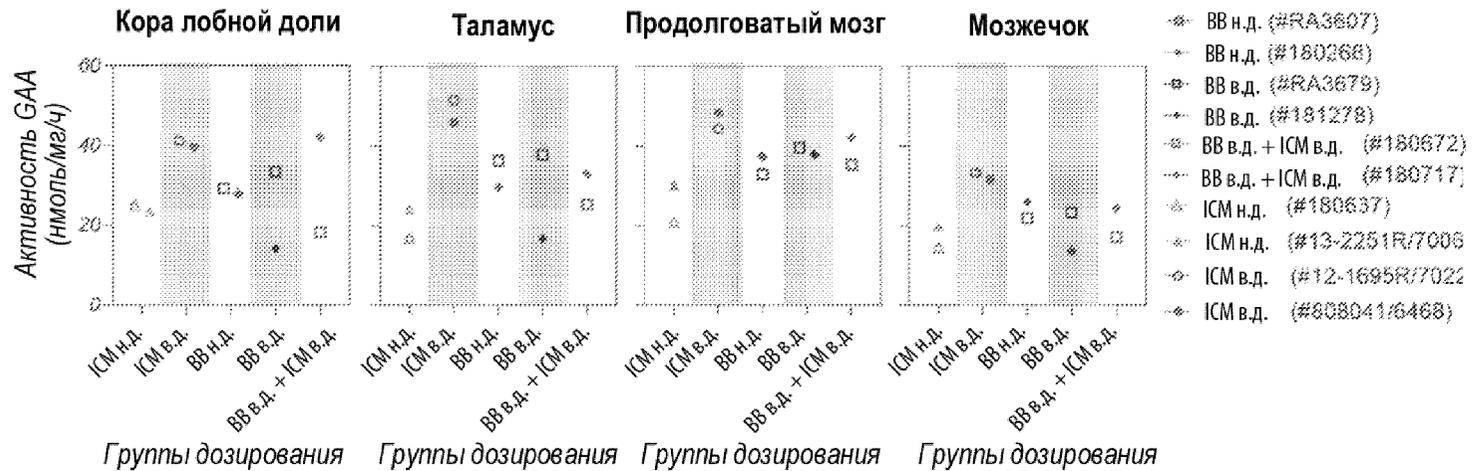
Активность ГАА в спинном мозге

Фиг. 35С



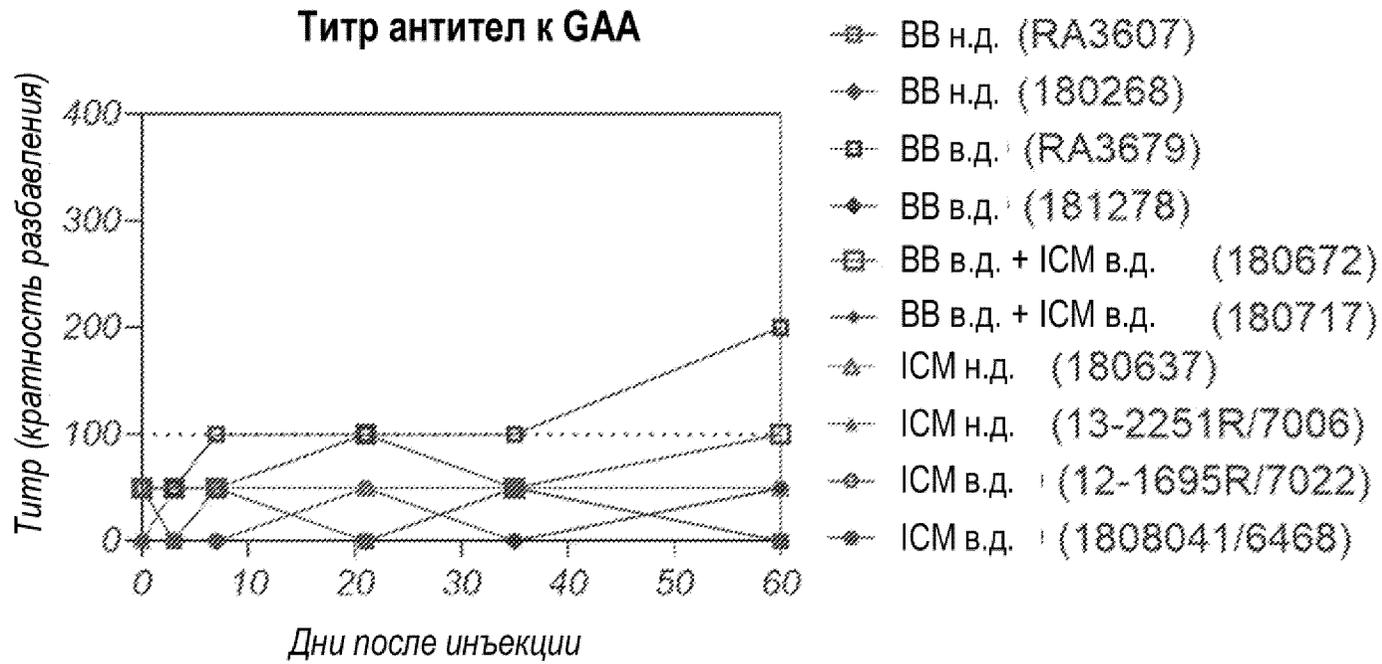
Фиг. 35D

Активность ГАА в головном мозге



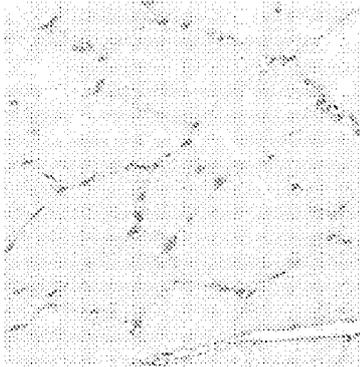
Фиг. 36

Последовательное разведение от 1:50 до 1:51200



Фиг. 37

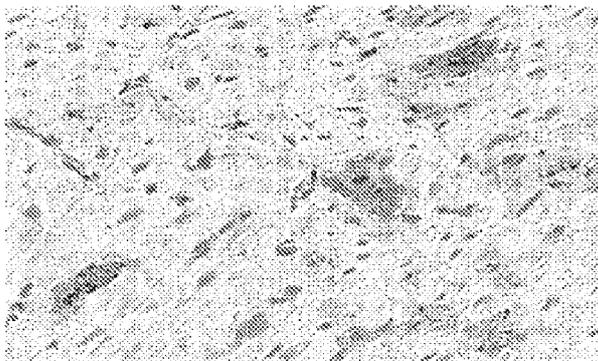
Четырехглавая мышца  
ННР, которым не  
осуществляли инъекцию



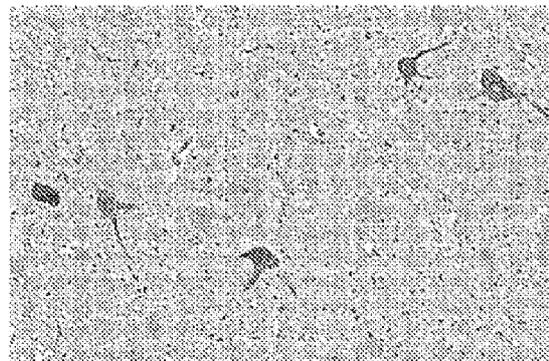
Четырехглавая мышца  
ВВ 1e13 GC/кг



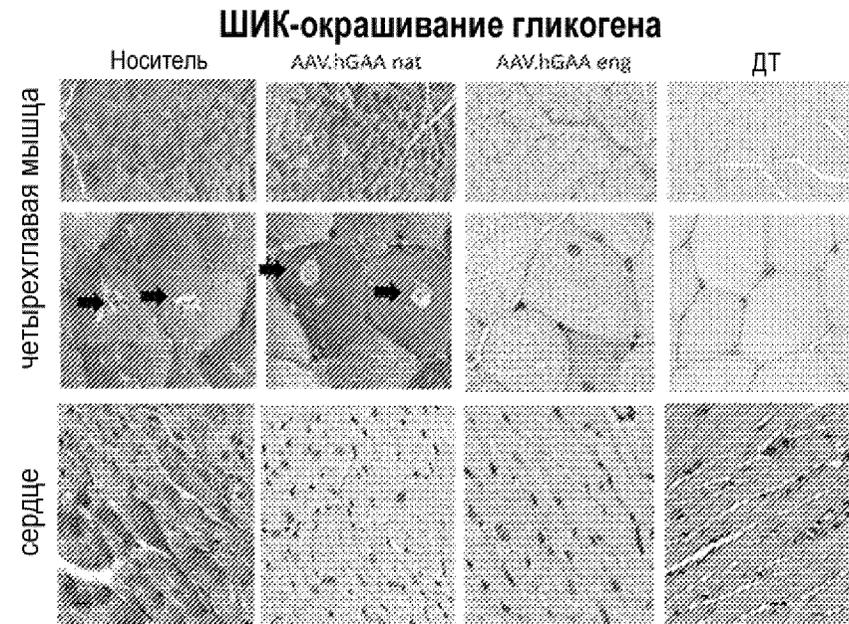
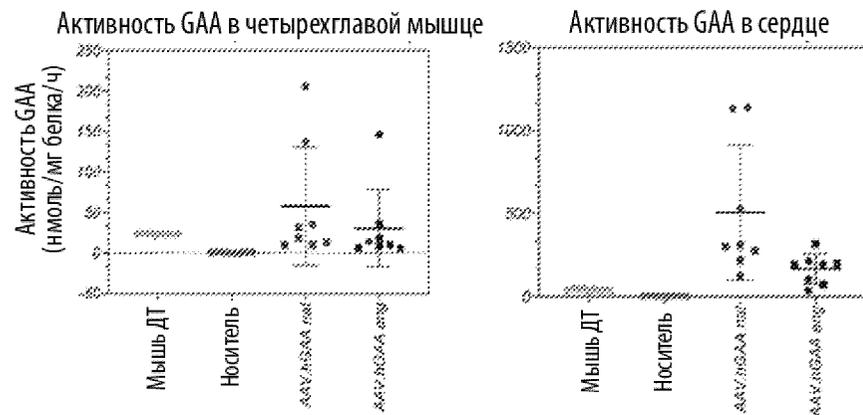
Сердце  
ВВ 1e13 GC/кг



Спинальный мозг  
ICM 1e13 GC



Фиг. 38

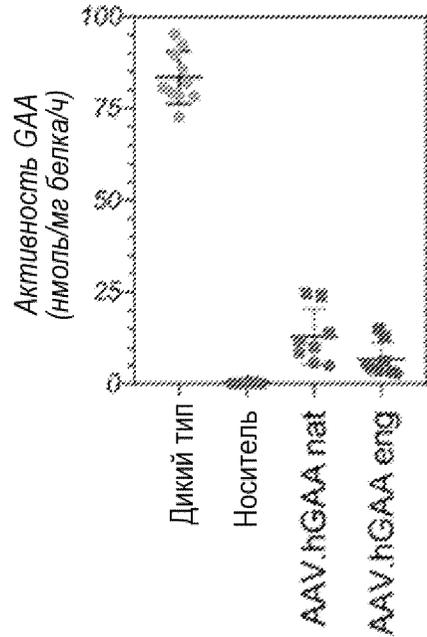


**Н.д. 2,5e12 GC/кг:**

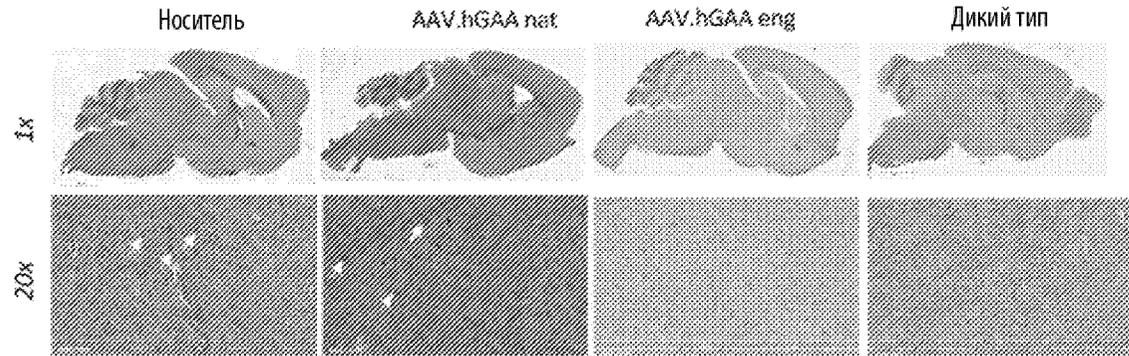
- Мышцы: Корректировка накопления и аутофагического разрастания только для hGAAeng
- Сердце: хорошая корректировка для обоих конструкций hGAA
- Короткосрочное исследование: быстрый клиренс гликогена

Фиг. 39

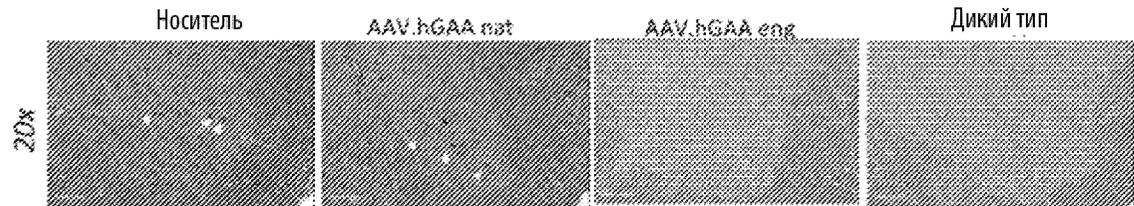
Активность GAA в головном мозге



Люксол/ШИК-окрашивание гликогена – головной мозг



Люксол/ШИК-окрашивание гликогена – шейный отдел спинного мозга



В.д. 2,5e13 GC/кг:

- Корректировка накопления в головном и спинном мозге только для hGAA eng

Фиг. 40

- \* AAV.hGAA eng 2,5e13 GC/кг ВВ
- \* IHC hGAA через 28 дней после инъекции



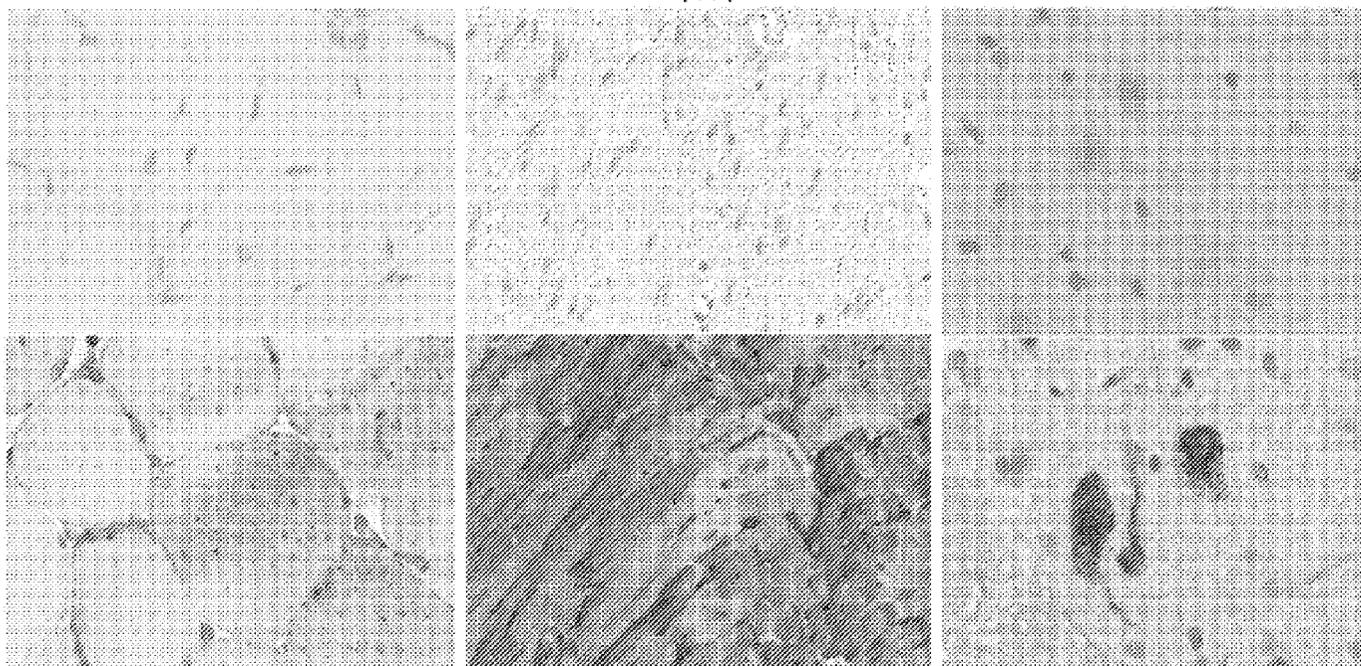
Мышца

IHC hGAA

Сердце

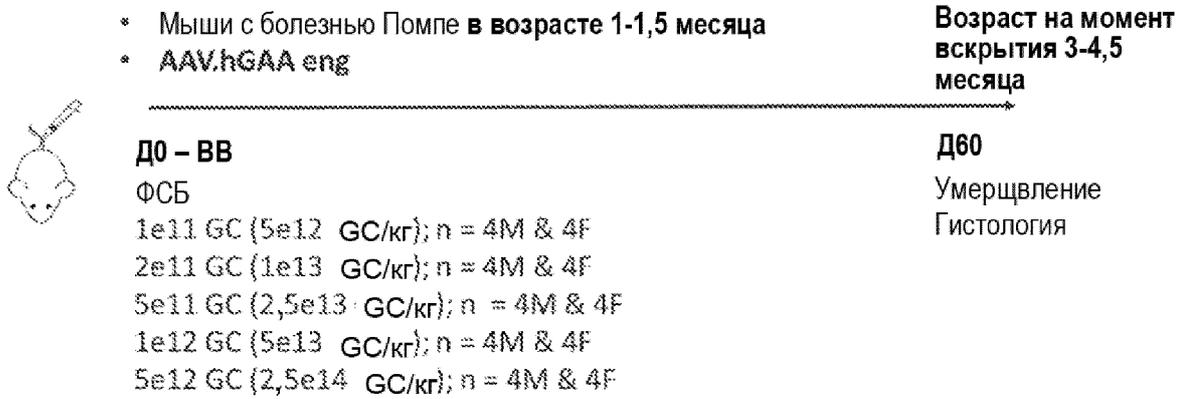
Спинной мозг

Контроль ФСБ

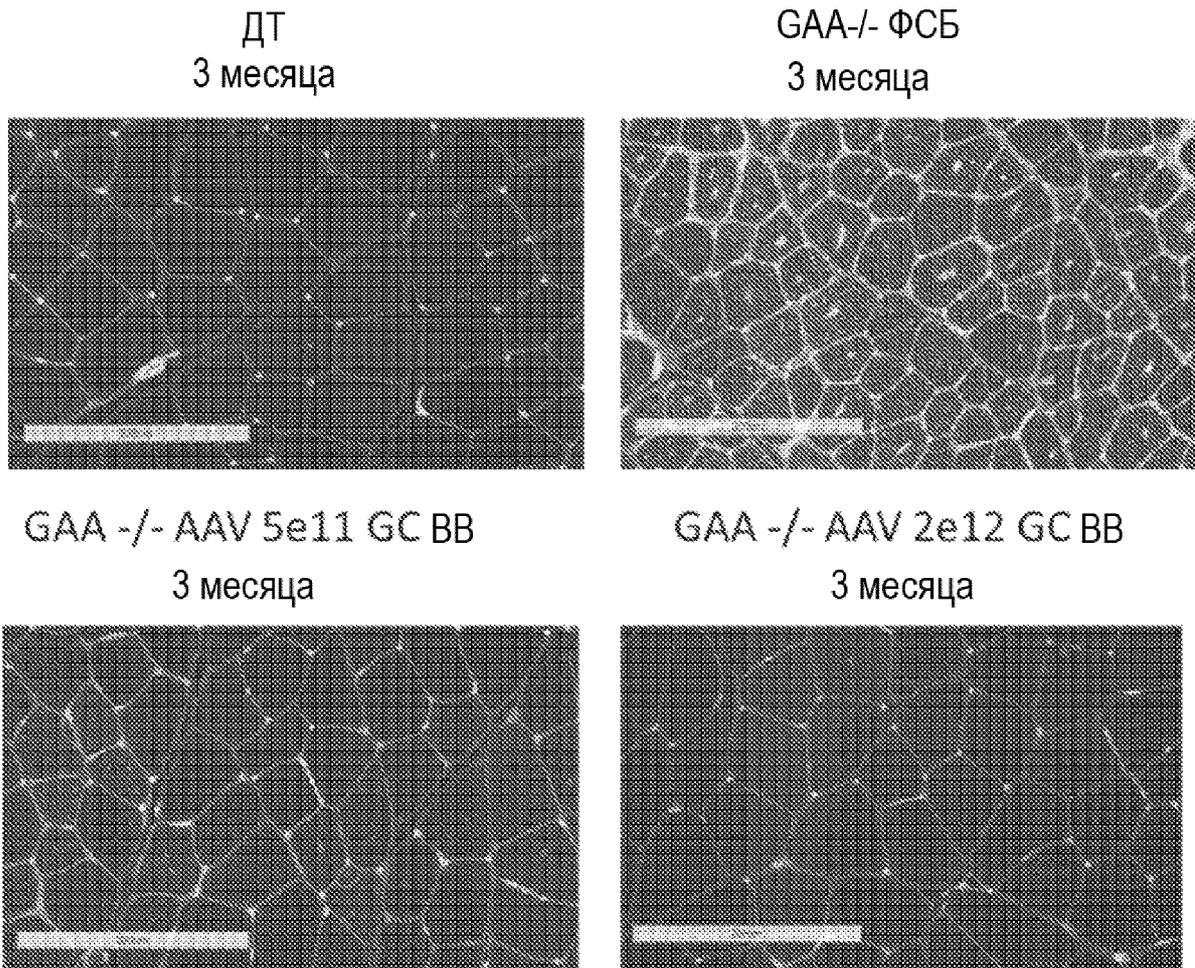


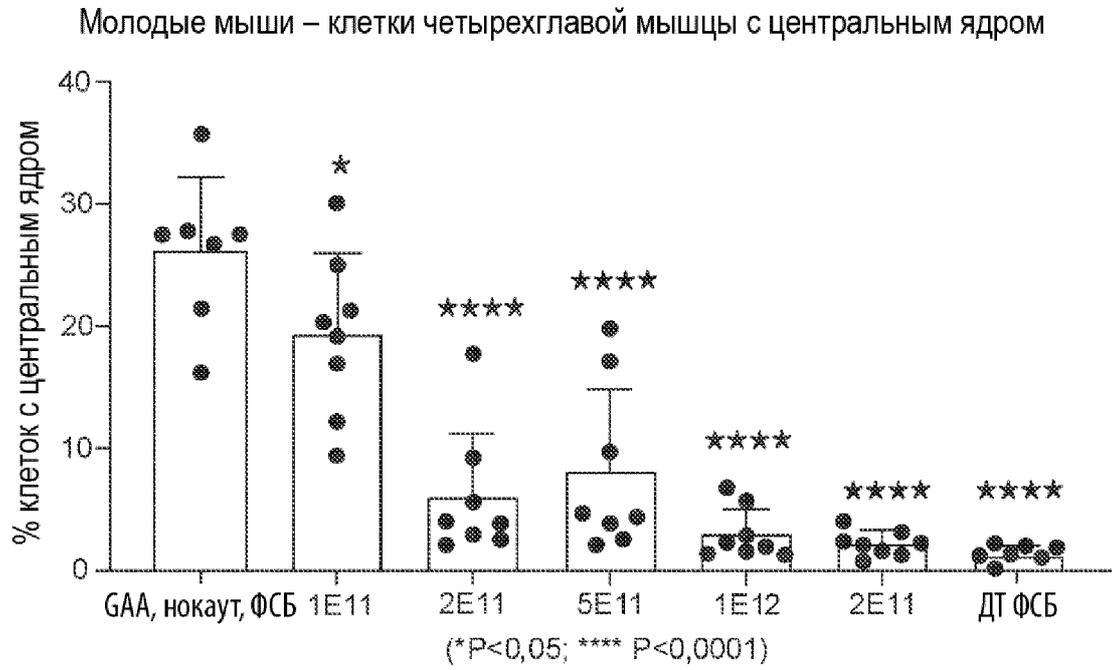
Получавшие лечение AAV

Фиг. 41

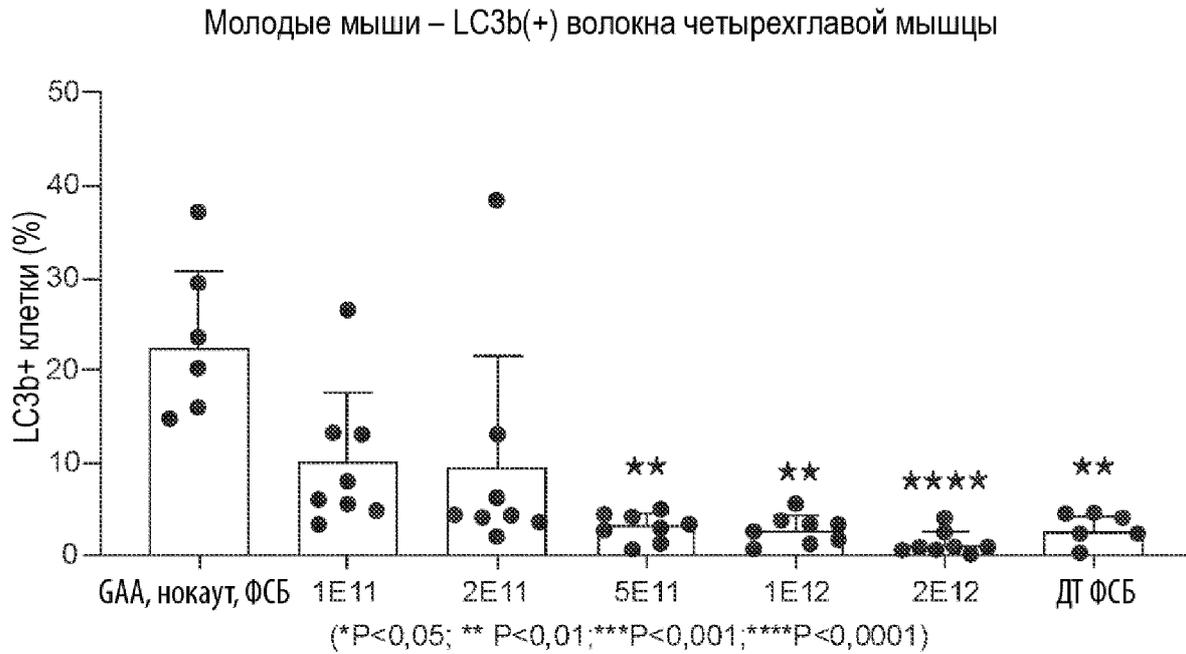


Фиг. 42



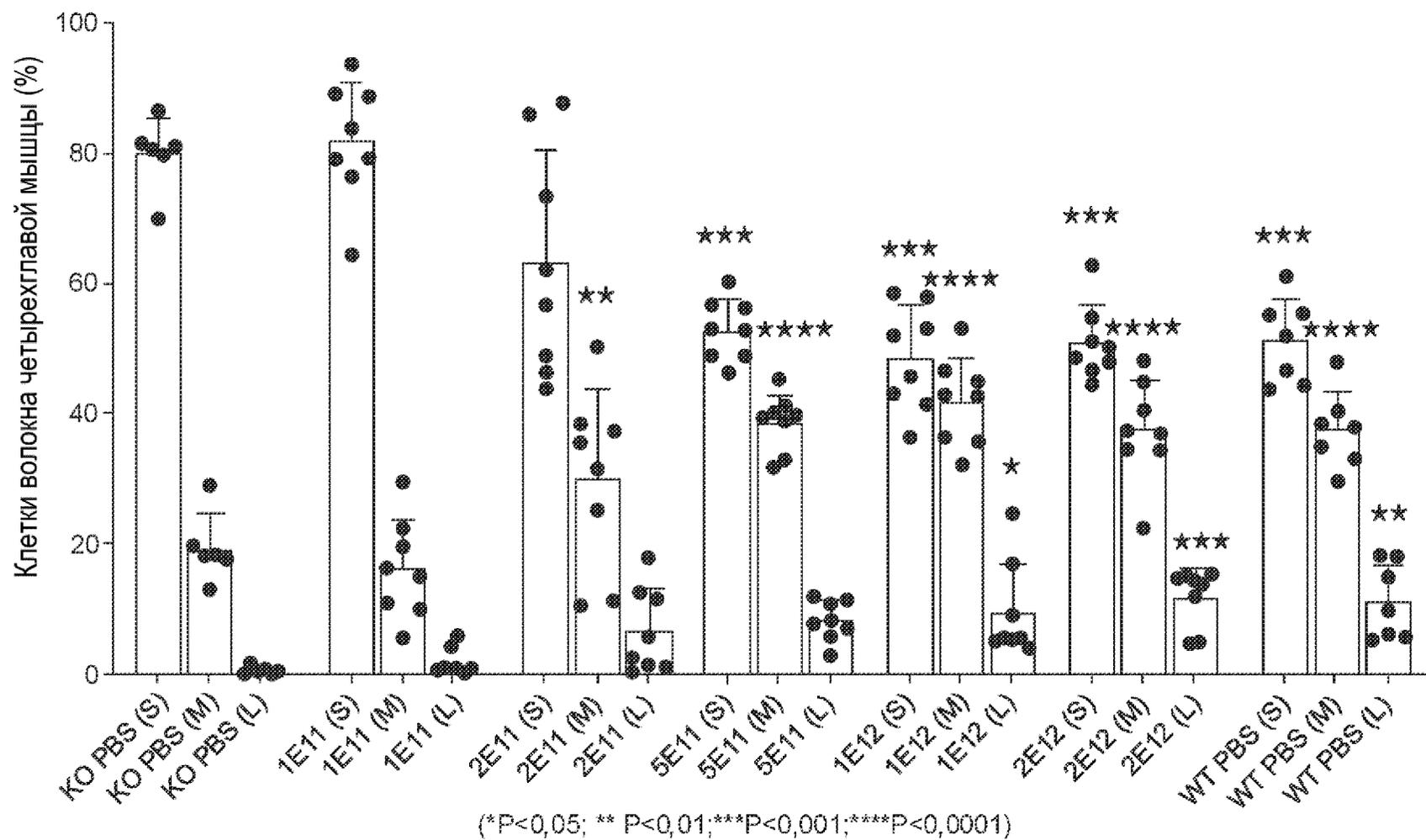


Фиг. 43



Фиг. 44

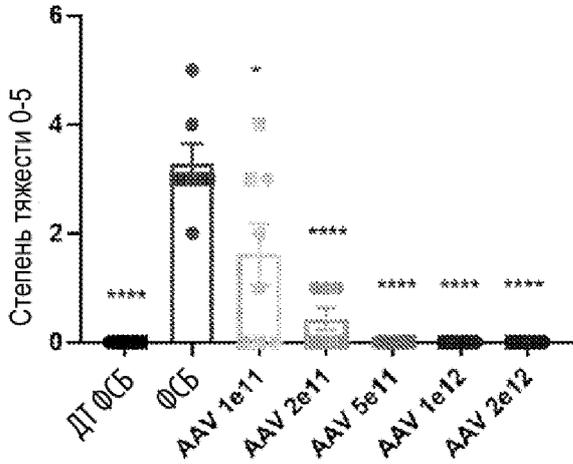
Молодые мыши – Меньший диаметр волокна четырехглавой мышцы



Фиг. 45

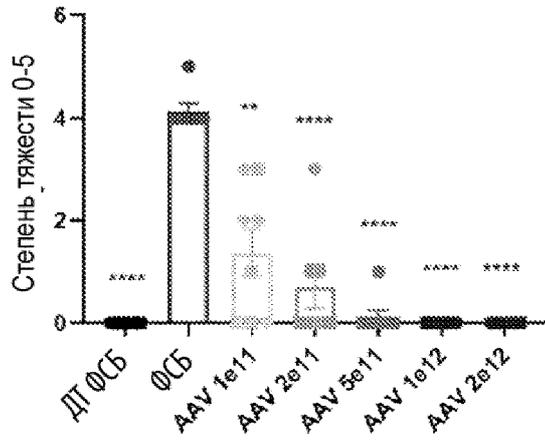
Фиг. 46А

Камбаловидная мышца



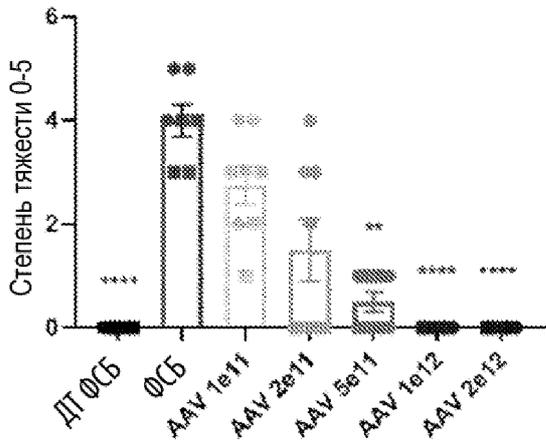
Фиг. 46В

Диафрагма



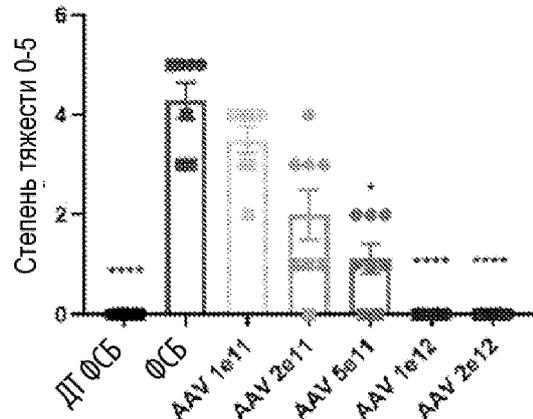
Фиг. 46С

Четырехглавая мышца



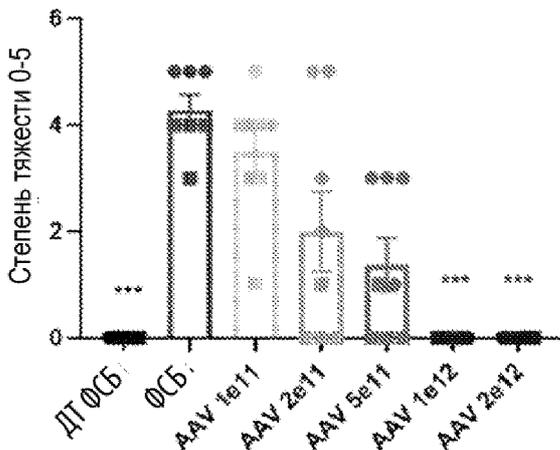
Фиг. 46D

Трехглавая мышца



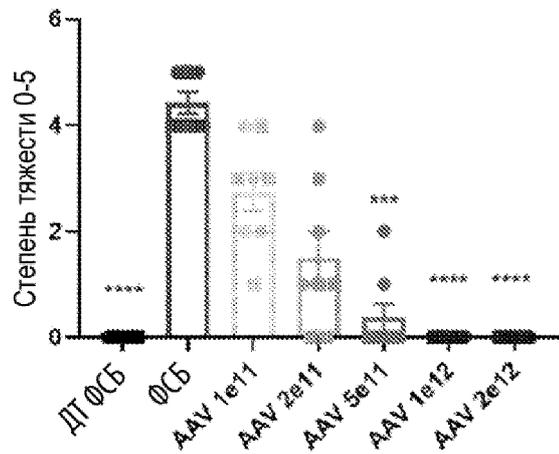
Фиг. 46Е

Икроножная мышца



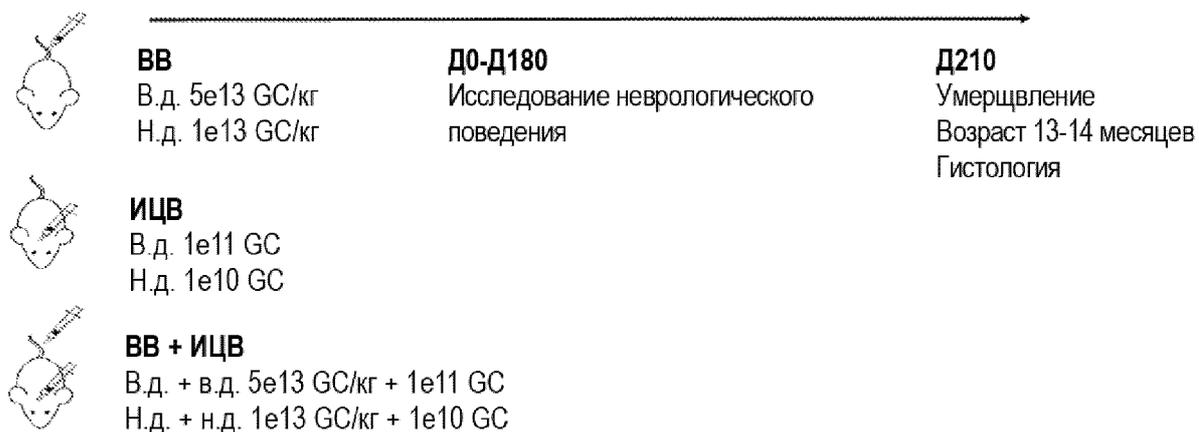
Фиг. 46F

Передняя большеберцовая мышца

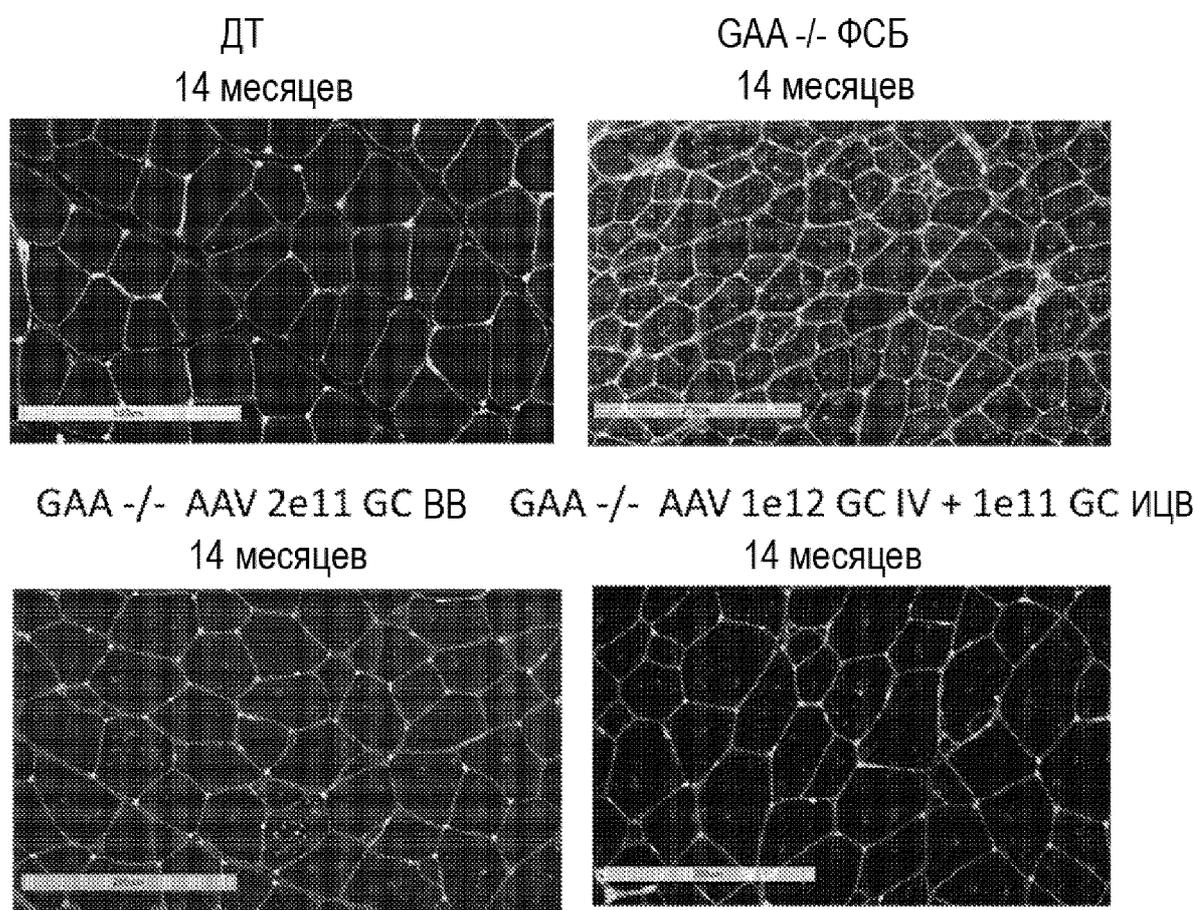


Фиг. 47

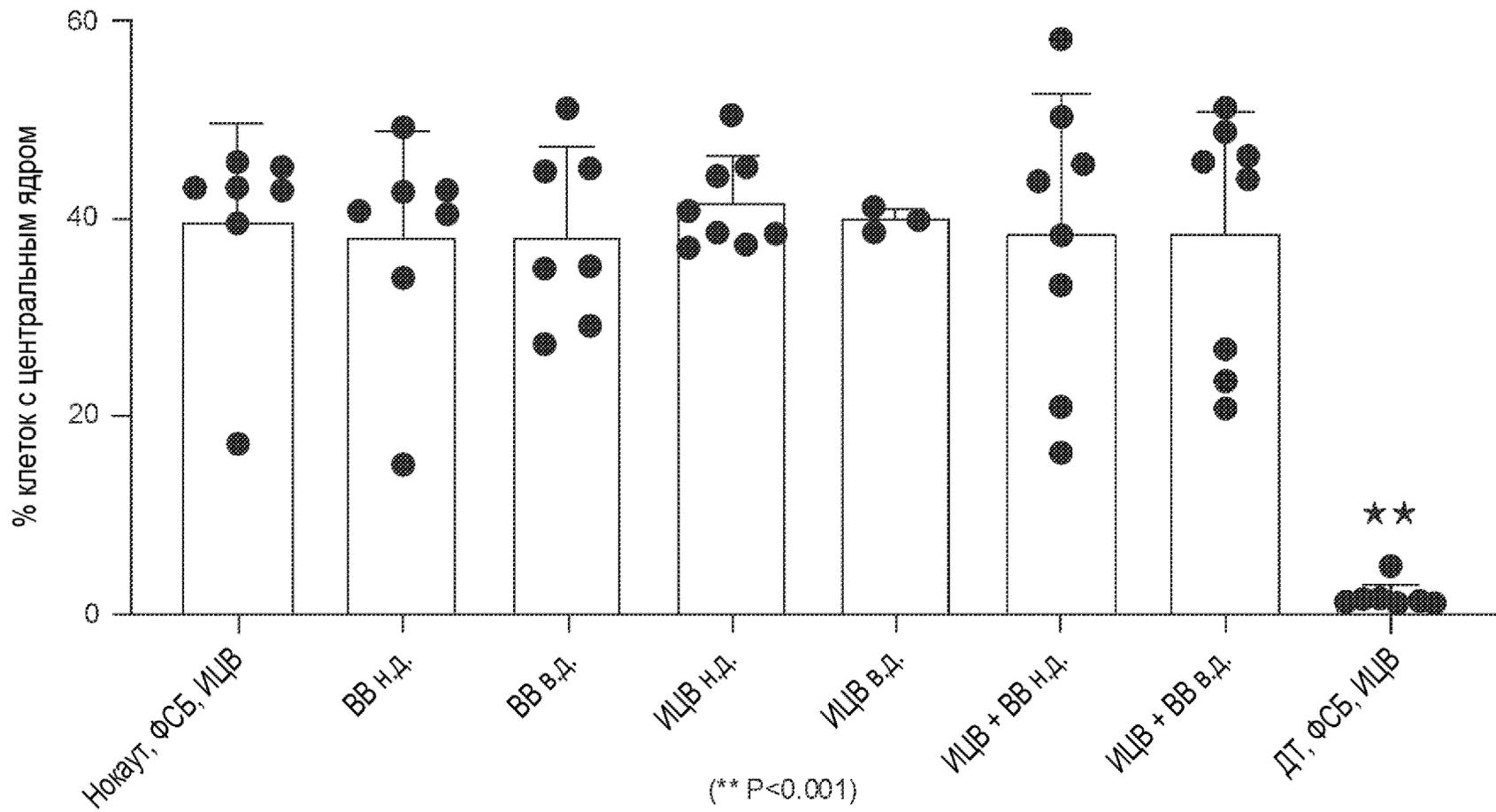
- Мыши с болезнью Помпе в возрасте 6-7 месяцев
- AAV.hGAA eng



Фиг. 48

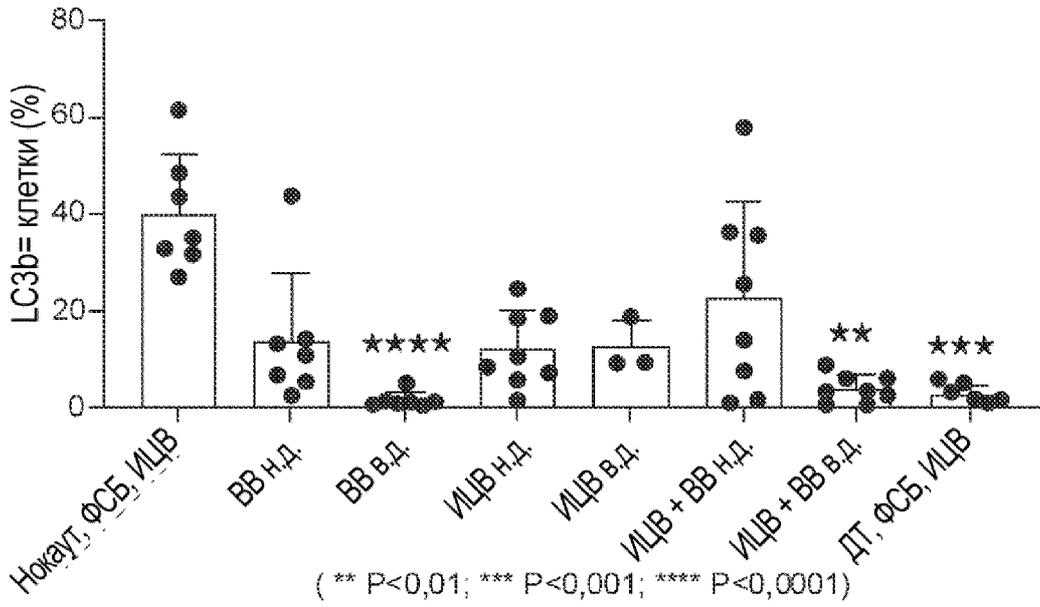


Взрослые мыши – клетки четырехглавой мышцы с центральным ядром



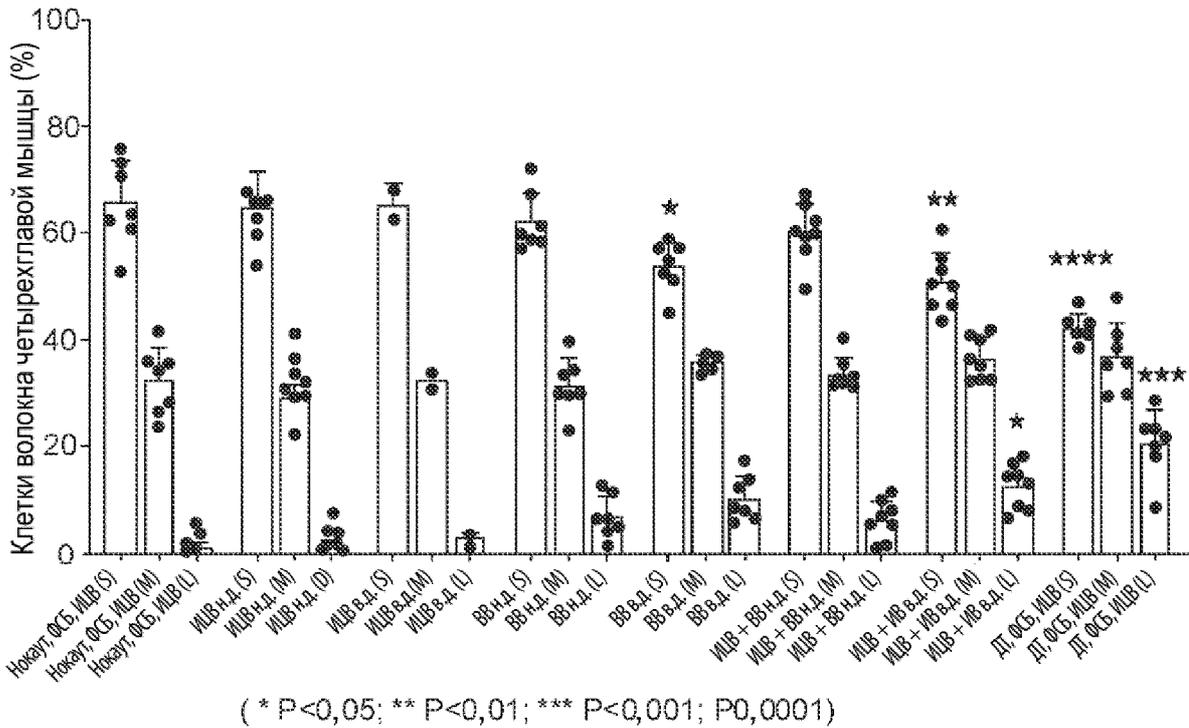
Фиг. 49

Взрослые мыши – LC3b(+) волокна четырехглавой мышцы



Фиг. 50

Взрослые мыши – Меньший диаметр волокна четырехглавой мышцы



Фиг. 51

Фиг. 52

Количество двигательных нейронов hGAA в соответствии с ИНС

