

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192737** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.27

(51) Int. Cl. *C07K 14/475* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.04.10

(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ

(31) 62/831,846; 62/934,450; 62/954,089;
62/960,471; 62/988,665

(72) Изобретатель:
**Абелиович Аса, Хекман Лора, Вон Ли
Чин, Линь Сюань-Ни, Хефти Франц,
Ринн Эрв (US)**

(32) 2019.04.10; 2019.11.12; 2019.12.27;
2020.01.13; 2020.03.12

(33) US

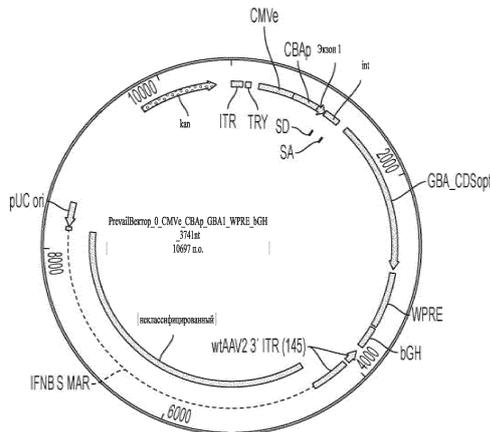
(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(86) PCT/US2020/027764

(87) WO 2020/210698 2020.10.15

(71) Заявитель:
**ПРЕВЭЙЛ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения заболеваний, ассоциированных с aberrантной лизосомальной функцией, таких как лобно-височная деменция (FTD). В настоящем изобретении также предлагаются экспрессионные конструкции, содержащие трансген, кодирующий програнулин, или его часть. В настоящем изобретении предлагаются способы лечения FTD путем введения таких экспрессионных конструкций субъекту, нуждающемуся в этом.



A1

202192737

202192737

A1

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/988,665, поданной 12 марта 2020 г., предварительной заявке на патент США № 62/960 471, поданной 13 января 2020 г., предварительной заявке на патент США № 62/954089, поданной 27 декабря 2019 г. предварительной заявке на патент США № 62/934450, поданной 12 ноября 2019 г., и предварительной заявке на патент США № 62/831 846, поданной 10 апреля 2019 г. Описание каждой из этих заявок полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Содержание текстового файла, представленного в электронном виде, полностью включено в данный документ посредством ссылки: Копия Перечня последовательностей в машиночитаемом формате (имя файла: PRVL_010_05WO_SeqList.txt, Дата записи: 10 апреля 2020 г.; размер файла: ~612902 байт).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к области генной терапии и способам ее применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Болезнь Гоше представляет собой редкое врождённое нарушение метаболизма гликофинголипидов из-за дефицита β -глюкоцереброзидазы лизосомальной кислоты (Гказа, «GBA»). Пациенты страдают от симптомов, не связанных с ЦНС, включая гепатоспленомегалию, недостаточность функции костного мозга, приводящую к панцитопении, заболеваниям легких и фиброзу, а также дефекты костей. Кроме того, значительное число пациентов страдает неврологическими проявлениями, включая патологические саккадические движения глаз и взгляда, судороги, когнитивные нарушения, задержку развития и двигательные расстройства, включая болезнь Паркинсона. Существует несколько терапевтических средств, направленных на лечение периферических заболеваний и основных клинических проявлений при нарушении кроветворной функции костного мозга и внутренних органов, включая заместительную ферментативную терапию, как описано ниже, шапероноподобные низкомолекулярные препараты, которые связываются с дефектной Гказой и повышают стабильность, а также субстрат-редуцирующая терапия, которая блокирует продуцирование субстрата, накапливающегося при болезни Гоше, что приводит к появлению симптомов и патологических изменений. Однако другие аспекты болезни Гоше (особенно те, которые ассоциированы с влиянием на скелет и мозг), по-видимому, не поддаются лечению.

[0005] Програнулин (PGRN) представляет собой дополнительный белок, связанный с лизосомальной функцией. PGRN кодируется *GRN* геном. Гипофункция *GRN* у людей приводит примерно к 90% риску развития FTD-GRN (лобно-височной деменции с мутацией *GRN*), нейродегенеративного заболевания, характеризующегося нарушением исполнительской функции, изменениями в поведении и языковыми трудностями, сопровождающимися атрофией лобной и височной долей. Для пациентов с FTD не существует лечения, модифицирующего заболевание.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем изобретении предлагается Способ лечения субъекта, имеющего лобно-височную деменцию с мутацией GRN или подозрением на ее наличие, при этом указанный способ включает введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего: (i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок PGRN, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; и (ii) капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят субъекту в дозе от около 1×10^{13} геномов вектора (vg) до около 7×10^{14} vg. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят путем инъекции в мозжечково-мозговую цистерну.

[0007] В некоторых вариантах осуществления промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок PGRN, представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA). В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV дополнительно содержит энхансер цитомегаловируса (CMV). В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE). В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV дополнительно содержит сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса, фланкирующие экспрессионную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления каждая ITR-последовательность представляет собой ITR-последовательность AAV2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вектор rAAV дополнительно содержит TRY-область между 5' ITR и экспрессионной конструкцией, при этом TRY-область содержит SEQ ID NO: 28.

[0008] В настоящем изобретении предлагается Способ лечения субъекта, имеющего лобно-височную деменцию с мутацией GRN или подозрением на ее наличие, при этом указанный способ включает введение субъекту rAAV, содержащего: (i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' до 3':

(a) AAV2 ITR; (b) энхансер CMV; (c) промотор CBA; (d) вставку трансгена, кодирующую белок PGRN, при этом указанная вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; (e) WPRE; (f) сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота; и (g) AAV2 ITR; а также

(ii) капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят субъекту в дозе от около 1×10^{13} vg до около 7×10^{14} vg. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят путем инъекции в мозжечково-мозговую цистерну.

[0009] В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят в составе, содержащем около 20 mM Трис, pH 8,0, около 1 mM MgCl₂, около 200 mM NaCl и около 0,001% полоксамера 188 (мас./об.).

[0010] В настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (i) rAAV, содержащий: (a) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок PGRN, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; и (b) капсидный белок AAV9; и (ii) около 20 mM Трис, pH 8,0, (iii) около 1 mM MgCl₂, (iv) около 200 mM NaCl, и (v) около 0,001% мас./об. полоксамера 188.

[0011] В настоящем изобретении предлагается rAAV, содержащий: (a) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально

связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок PGRN, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; и (b) капсидный белок AAV9 для применения в способе лечения лобно-височной деменции с мутацией *GRN* у субъекта.

[0012] В настоящем документе предлагается способ количественной оценки уровня белка PGRN в образце спинномозговой жидкости (СМЖ), включающий: (1) разбавление образца СМЖ в основной смеси, содержащей дитиотреитол (ДТТ) и буфер для образца; (2) загрузку разбавленного образца СМЖ, антитела против програнулина, вторичного антитела, которое обнаруживает антитело против програнулина, люминол и пероксид, в лунки капиллярного картриджа; (3) загрузку капиллярного картриджа в автоматический прибор для иммуноанализа вестерн-блоттинга; (4) использование автоматического прибора для иммуноанализа вестерн-блоттинга для расчета интенсивности сигнала, площади пика и отношения сигнал/шум; и (5) количественное определение уровня белка програнулина в образце СМЖ как площади пика иммунореактивности к антителу против програнулина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0013] Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *G*казу (например, *GBA1* или ее часть).

[0014] Фиг. 2 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *G*казу (например, *GBA1* или ее часть) и LIMP2 (SCARB2) или его часть. Кодированные последовательности *G*казы и LIMP2 разделены внутренним участком посадки рибосомы (IRES).

[0015] Фиг. 3 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *G*казу (например, *GBA1* или ее часть) и LIMP2 (SCARB2) или его часть. Каждая экспрессия кодируемых последовательностей *G*казы и LIMP2 управляется отдельным промотором.

[0016] Фиг. 4 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *G*казу (например, *GBA1* или ее часть), LIMP2 (SCARB2) или его часть, а также интерферирующую РНК для α -Syn.

[0017] Фиг. 5 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *G*казу (например, *GBA1* или ее часть), просапозин (например, *PSAP* или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn.

[0018] Фиг. 6 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *G*казу (например, *GBA1* или ее часть) и просапозин (например, *PSAP* или его часть). Кодированные последовательности *G*казы и просапозина разделены внутренним участком посадки рибосомы (IRES).

[0019] Фиг. 7 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *G*казу (например, *GBA1* или ее часть). В этом варианте осуществления вектор содержит промоторный элемент СВА (СВА), состоящий из четырех частей: энхансера CMV (CMVe), промотора СВА (СВАp), экзона 1 и интрона (int) для постоянной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности *GBA1* человека. 3'-область также содержит регуляторный элемент WPRE, за которым следует bGH полиА хвост. На 5' конце промоторной области включены три сайта активации транскрипции: TATA, RBS и YY1. Фланкирующие ITR позволяют правильно

упаковывать вставочные последовательности. Оценивали два варианта 5' ITR-последовательности (вставка); они имеют несколько нуклеотидных различий в 20-нуклеотидной области «D» ITR AAV2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вектор gAAV содержит нуклеотидную последовательность домена «D», приведенную в верхней строке. В некоторых вариантах осуществления Вектор gAAV содержит мутантный домен «D» (например, домен «S», изменения нуклеотидов приведены в нижней строке).

[0020] Фиг. 8 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов осуществления вектора, продемонстрированного на Фиг. 6

[0021] Фиг. 9 демонстрирует репрезентативные данные относительно доставки gAAV, содержащего трансген, кодирующий Gказу (например, *GBA1* или ее часть), в модели болезни Паркинсона на СВЕ мышах. Ежедневную IP доставку носителя PBS, 25 мг/кг СВЕ, 37,5 мг/кг СВЕ или 50 мг/кг СВЕ (слева направо) начинали в P8. Выживаемость (вверху слева) проверяли два раза в день, а вес (вверху справа) проверяли ежедневно. Все группы начинали с $n = 8$. Поведение оценивали по общему пройденному расстоянию в открытом поле (внизу слева) в P23 и способности удерживаться на вращающемся барабане (внизу в центре) в P24. Уровни субстратов Gказы анализировали в коре головного мозга мышей в группах лечения PBS и 25 мг/кг СВЕ как с отменой СВЕ (День 3), так и без отмены СВЕ (День 1). Совокупные уровни GluSph и GalSph (внизу справа) приведены в пмоль на мг веса свежей ткани. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, номинальные p -значения для групп лечения методом линейной регрессии.

[0022] Фиг. 10 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов дизайна исследования максимальной дозы gAAV в модели мышцы СВЕ. Вкратце, gAAV вводили путем инъекции ICV в P3, а ежедневное лечение СВЕ начинали в P8. Поведение оценивали в анализах открытого поля и способности удерживаться на вращающемся барабане в P24-25, а уровни субстрата измеряли в P36 и P38.

[0023] Фиг. 11 демонстрирует репрезентативные данные для оценки максимальной дозы gAAV при жизни в модели мышцы СВЕ. В P3, мышам вводили либо вспомогательное вещество, либо 8,8e9 vg gAAV-GBA1 посредством ICV доставки. Ежедневную IP доставку PBS или 25 мг/кг СВЕ начинали в P8. В конце исследования половину мышей умерщвляли через день после получения ими последней дозы СВЕ в P36 (день 1), в то время как для оставшейся половины отменяли СВЕ в течение 3 дней перед умерщвлением в P38 (День 3). Все группы лечения (вспомогательное вещество + PBS $n = 8$, gAAV-GBA1 + PBS $n = 7$, вспомогательное вещество + СВЕ $n = 8$ и вариант + СВЕ $n = 9$) взвешивали ежедневно (вверху слева) и анализировали вес в P36 (вверху справа). Поведение оценивали по общему пройденному расстоянию в открытом поле в P23 (внизу слева) и по периоду времени до падения из вращающегося барабана в P24 (внизу справа), что оценивалось для каждого животного как медианное значение за 3 испытания. Учитывая летальность, $n = 7$ для группы «вспомогательное вещество + СВЕ» для анализов поведения, и $n = 8$ для всех остальных групп. Представлены средние значения по животным. Планки погрешностей представляют собой SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, номинальные p -значения для групп лечения методом линейной регрессии у животных, получавших СВЕ.

[0024] Фиг. 12 демонстрирует репрезентативные данные для биохимической оценки максимальной дозы gAAV при жизни в модели мышцы СВЕ. Кору головного мозга всех групп лечения (вспомогательное вещество + PBS $n = 8$, вариант + PBS $n = 7$, вспомогательное вещество + СВЕ $n = 7$ и вариант + СВЕ $n = 9$) использовали для измерения активности Gказы (вверху слева), уровней GluSph (вверху справа), уровней GluCer (внизу слева) и геномов вектора (внизу справа) в группах до (День 1) или после (День 3) отмены СВЕ. Биораспределение представлено в виде геномов вектора на 1 мкг геномной ДНК. Приведены средние

значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. (*) $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, номинальные p -значения для групп лечения методом линейной регрессии у животных, получавших СВЕ, с поправками на дни сбора и пол в качестве ковариант.

[0025] Фиг. 13 демонстрирует репрезентативные данные относительно поведенческих и биохимических корреляций в модели мышей СВЕ после введения для следующих групп: вспомогательное вещество + PBS, вспомогательное вещество + СВЕ и вариант + СВЕ. Во всех группах лечения способность удерживаться на вращающемся барабане отрицательно коррелировала с накоплением GluCer (A, $p = 0,0012$ по методу линейной регрессии), а накопление GluSph отрицательно коррелировало с увеличением активности Gказы (B, $p = 0,0086$ по методу линейной регрессии).

[0026] Фиг. 14 демонстрирует репрезентативные данные относительно биораспределения варианта в модели мышей СВЕ. Наличие геномов вектора оценивали в печени, селезенке, почках и гонадах для всех групп лечения (вспомогательное вещество + PBS $n = 8$, вариант + PBS $n = 7$, вспомогательное вещество + СВЕ $n = 7$ и вариант + СВЕ $n = 9$). Биораспределение представлено в виде геномов вектора на 1 мкг геномной ДНК. Присутствие генома вектора количественно оценивали с помощью количественной PCR с помощью эталонной стандартной кривой вектора; концентрацию геномной ДНК оценивали путем измерения оптической плотности A260. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. (*) $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, номинальные p -значения для групп лечения методом линейной регрессии у животных, получавших СВЕ, с поправками на дни сбора и пол в качестве ковариант.

[0027] Фиг. 15 демонстрирует репрезентативные данные для оценки максимальной дозы гAAV при жизни в модели мыши СВЕ. Мыши получали вспомогательное вещество или одну из трех различных доз гAAV-GBA1 путем ICV-доставки в P3: $3,2e9$ vg, $1,0e10$ vg или $3,2e10$ vg. В P8 начали ежедневное IP-введение в дозе 25 мг/кг СВЕ. Мыши, которым вводили вспомогательное вещество и СВЕ или вспомогательное вещество и PBS, служили контролем. Все группы лечения начинали с $n = 10$ (5M/5F) на группу. Всех мышей умерщвляли через день после введения последней дозы СВЕ (P38-P40). Все группы лечения взвешивали ежедневно, и их вес анализировали в P36. Двигательную активность оценивали по периоду времени до падения из вращающегося барабана в P24 и по периоду времени до разворота на сужающейся балке в P30. Из-за ранней летальности количество мышей, участвовавших в поведенческих анализах, составляло: вспомогательное вещество + PBS $n = 10$, вспомогательное вещество + СВЕ $n = 9$ и $3,2e9$ vg гAAV-GBA1 + СВЕ $n = 6$, $1,0e10$ vg гAAV-GBA1 + СВЕ $n = 10$, $3,2e10$ vg гAAV-GBA1 + СВЕ $n = 7$. Приведены способы. Планки погрешностей представляют собой SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ для номинальных p -значений для групп лечения, получавших СВЕ, по методу линейной регрессии, с поправкой на пол в качестве ковариаты.

[0028] Фиг. 16 демонстрирует репрезентативные данные для биохимической оценки максимальной дозы гAAV при жизни в модели мыши СВЕ. В коре головного мозга животных из всех групп лечения (вспомогательное вещество + PBS $n = 10$, вспомогательное вещество + СВЕ $n = 9$ и $3,2e9$ vg гAAV-GBA1 + СВЕ $n = 6$, $1,0e10$ vg гAAV-GBA1 + СВЕ $n = 10$, $3,2e10$ vg гAAV-GBA1 + СВЕ $n = 7$) измеряли активность Gказы, уровни GluSph, уровни GluCer и геномы вектора. Активность Gказы приведена как нг Gказы на мг общего белка. Уровни GluSph и GluCer приведены в пмоль на мг веса свежей ткани. Биораспределение представлено в виде геномов вектора на 1 мкг геномной ДНК. Присутствие генома вектора количественно оценивали с помощью количественной PCR с помощью эталонной стандартной кривой вектора; концентрацию геномной ДНК оценивали путем измерения оптической плотности A260. Наличие генома вектора также измеряли в печени (E). Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют

собой SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ для номинальных p -значений для групп лечения, получавших СВЕ, по методу линейной регрессии, с поправкой на пол в качестве ковариаты.

[0029] Фиг. 17 демонстрирует репрезентативные данные для анализа поведения на сужающейся балке при максимальной дозе гAAV-GBA1 на генетической модели мыши. Двигательную активность групп лечения (WT + вспомогательное вещество, $n = 5$), 4L/PS-NA + вспомогательное вещество ($n = 6$) и 4L/PS-NA + гAAV-GBA1 ($n = 5$)) оценивали с помощью теста ходьбы по балке через 4 недели после введения гAAV-GBA1. Суммарные количества соскальзываний и активное время приведены как общее количество за 5 испытаний на разных балках. Скорость и соскальзывание на скорость приведены как среднее значение за 5 испытаний на разных балках. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM.

[0030] Фиг. 18 демонстрирует репрезентативные данные относительно экспрессии *in vitro* конструкций гAAV, кодирующих белок програнулин (PGRN). На левой панели приведена стандартная кривая ИФА-анализа програнулина (PGRN). На нижней панели приведена реакция «доза-ответ» экспрессии PGRN, измеренная с помощью ИФА-анализа в клеточных лизатах клеток HEK293T, трансдуцированных гAAV. MOI = множественность заражения (геномов вектора на клетку).

[0031] Фиг. 19 демонстрирует репрезентативные данные относительно экспрессии *in vitro* конструкций гAAV, кодирующих *GBA1* в комбинации с просапозином (*PSAP*), *SCARB2*, и/или одной или большим количеством ингибирующих нуклеиновых кислот. Данные указывают на то, что трансфекция клеток HEK293 каждой из конструкций приводила к сверхэкспрессии представляющих интерес трансгенов по сравнению с ложно трансфицированными клетками.

[0032] Фиг. 20 представляет собой схему, изображающую векторы гAAV, содержащие область «D», расположенную «с наружной стороны» ITR (например, проксимальнее конца ITR относительно вставки трансгена или экспрессионной конструкции) (вверху) и векторы гAAV дикого типа, имеющие ITR на «с внутренней стороны» вектора (например, проксимальнее вставки трансгена в вектор).

[0033] Фиг. 21 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *GBA2* или ее часть, а также интерферирующую РНК для α -Syn.

[0034] Фиг. 22 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *Gказу* (например, *GBA1* или ее часть) и галактозилцерамидазу (например, *GALC* или ее часть). Экспрессия кодирующих последовательностей *Gказу* и галактозилцерамидазы разделена последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

[0035] Фиг. 23 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *Gказу* (например, *GBA1* или ее часть) и галактозилцерамидазу (например, *GALC* или ее часть). Экспрессия кодирующих последовательностей *Gказу* и галактозилцерамидазы разделена последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

[0036] Фиг. 24 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *Gказу* (например, *GBA1* или ее часть), катепсин В (например, *CTSB* или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn. Экспрессия кодирующих последовательностей *Gказу* и катепсина В разделена последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

[0037] Фиг. 25 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую *Gказу* (например, *GBA1* или ее часть),

сфингомиелин фосфодиэстеразы 1 (*например, SMPD1* или ее часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn.

[0038] Фиг. 26 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (*например, GBA1* или ее часть) и галактозилцерамидазу (*например, GALC* или ее часть). Кодированные последовательности Gказы и галактозилцерамидазы разделены внутренним участком посадки рибосомы (IRES).

[0039] Фиг. 27 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (*например, GBA1* или ее часть) и катепсин В (*например, CTSB* или его часть). Каждая экспрессия кодируемых последовательностей Gказы и катепсина В управляется отдельным промотором.

[0040] Фиг. 28 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (*например, GBA1* или ее часть), GCH1 (*например, GCH1* или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn. Кодированные последовательности Gказы и GCH1 разделены последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

[0041] Фиг. 29 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (*например, GBA1* или ее часть), RAB7L1 (*например, RAB7L1* или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn. Кодированные последовательности Gказы и RAB7L1 разделены последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

[0042] Фиг. 30 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (*например, GBA1* или ее часть), GCH1 (*например, GCH1* или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn. Экспрессия кодируемых последовательностей Gказы и GCH1 представляет собой внутренний участок посадки рибосомы (IRES).

[0043] Фиг. 31 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую VPS35 (*например, VPS35* или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn и TMEM106B.

[0044] Фиг. 32 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (*например, GBA1* или ее часть), IL-34 (*например, IL34* или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn. Кодированные последовательности Gказы и IL-34 разделены последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

[0045] Фиг. 33 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (*например, GBA1* или ее часть) и IL-34 (*например, IL34* или его часть). Кодированные последовательности Gказы и IL-34 разделены внутренним участком посадки рибосомы (IRES).

[0046] Фиг. 34 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (*например, GBA1* или ее часть) и TREM2 (*например, TREM2* или его часть). Каждая экспрессия кодируемых последовательностей Gказы и TREM2 управляется отдельным промотором.

[0047] Фиг. 35 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (*например, GBA1* или ее часть) и IL-34 (*например, IL34* или его часть). Каждая экспрессия кодируемых последовательностей Gказы и IL-34 управляется отдельным промотором.

[0048] Фиг. 36А - Фиг. 36В демонстрируют репрезентативные данные для сверхэкспрессии TREM2 и GBA1 в клетках HEK293 по сравнению с контрольными трансдуцированными клетками, что измерено с помощью qPCR и ИФА. Фиг. 36А демонстрирует данные относительно сверхэкспрессии TREM2. Фиг. 36В демонстрирует данные относительно сверхэкспрессии GBA1 из той же конструкции.

[0049] Фиг. 37 демонстрирует репрезентативные данные, указывающие на успешный сайлесинг SNCA *in vitro*, посредством анализа репортера GFP (вверху) и анализа α -Syn (внизу).

[0050] Фиг. 38 демонстрирует репрезентативные данные, указывающие на успешный сайлесинг TMEM106B *in vitro* посредством анализа репортера GFP (вверху) и анализа α -Syn (внизу).

[0051] Фиг. 39 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN.

[0052] Фиг. 40 демонстрирует данные относительно трансдукции клеток HEK293 с применением gAAV, имеющих ITR с диким (кружки) или альтернативным (например, «с наружной стороны»; квадраты) размещением последовательности «D». gAAV, имеющие ITR, размещенные «с наружной стороны», были способны трансдуцировать клетки так же эффективно, как и gAAV, имеющие ITR дикого типа.

[0053] Фиг. 41 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (например, GBA1 или ее часть).

[0054] Фиг. 42 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (например, GBA1 или ее часть).

[0055] Фиг. 43 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (например, GBA1 или ее часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn.

[0056] Фиг. 44 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN.

[0057] Фиг. 45 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN.

[0058] Фиг. 46 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN, и интерферирующую РНК для белка тау, ассоциированного с микротрубочками (МАРТ).

[0059] Фиг. 47 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (например, GBA1 или ее часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn.

[0060] Фиг. 48 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PSAP.

[0061] Фиг. 49 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (например, GBA1 или ее часть).

[0062] Фиг. 50 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (например, GBA1 или ее часть) и галактозилцерамидазу (например, GALC или ее часть).

[0063] Фиг. 51 представляет собой схематическое изображение одного варианта плазмиды, содержащей вектор gAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую Gказу (например, *GBA1* или ее часть), просапозин (например, PSAP или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn.

[0064] Фиг. 52А демонстрирует, что линии нейрональных стволовых клеток (NSC), полученные из iPSC, от пациентов с мутациями FTD-GRN, секретируют меньше програнулина, чем линии NSC, полученные от здоровых контрольных субъектов. Статистические данные определяли с помощью непарного t-критерия; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

[0065] Фиг. 52В демонстрирует результаты трансдукции PR006А в диапазоне доз в культурах нейронов носителей мутации FTD-GRN. NSC высевали с одинаковой плотностью и дифференцировали в нейроны. На 7 день нейроны трансдуцировали вспомогательным веществом или указанными количествами PR006А в течение 72 часов. Экспрессию секретируемого програнулина измеряли в клеточной среде с помощью ИФА и нормализовали по объему ($n = 3-4$; среднее значение \pm SEM). Черная пунктирная линия представляет эндогенные уровни програнулина, секретируемого контрольными нейронами (обработанными вспомогательным веществом). Секретируемый програнулин не обнаруживался в нейронах FTD-GRN, обработанных вспомогательным веществом. Статистические данные определяли с помощью ANOVA с последующим критерием HSD Тьюки, и проведенное статистическое сравнение каждого состояния с контрольными нейронами, обработанными вспомогательным веществом, приведено на графике, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$. LLOQ = нижний предел количественного определения; MOI = множественность заражения.

[0066] Фиг. 52С демонстрирует, что обработка PR006 культур нейронов сохраняла дефектное созревание ключевой лизосомальной протеазы, катепсина D, в культурах нейронов FTD-GRN. NSC высевали в равных концентрациях и дифференцировали в нейроны. На 7 день нейроны трансдуцировали вспомогательным веществом или PR006А при MOI $5,3 \times 10^5$ в течение 72 часов. Нейроны лизировали, и лизаты анализировали на системе Protein Simple Western Jess с первичным антителом против катепсина D (CTSD). Были обнаружены полосы, соответствующие как зрелому катепсину D (matCTSD), так и прокатепсину D (proCTSD), и площадь под кривой определяли количественно для каждой полосы и нормализовали по внутреннему сигналу нормализации общего белка. Определяли соотношение matCTSD/proCTSD в нейронах FTD-GRN, обработанных вспомогательным веществом или PR006А; на оси ординат приведено соотношение matCTSD/proCTSD в виде процента от отношения контрольных нейронов, обработанных вспомогательным веществом ($n = 3$; среднее значение \pm SEM). Статистические данные определяли с помощью парного t-критерия; * = $p < 0,05$.

[0067] Фиг. 52D и Фиг. 52F демонстрируют, что PR006А снижает патологию TDP-43 в культурах нейронов FTD-GRN. NSC высевали в равных концентрациях и дифференцировали в нейроны. На 7 день нейроны трансдуцировали вспомогательным веществом или PR006А при MOI $5,3 \times 10^5$ и собирали через 21 день после трансдукции. Фиг. 52D: Нейроны лизировали, фракцию нерастворимого белка Triton-X выделяли и анализировали на системе Protein Simple Western Jess с антителом против TDP-43 (# 12892-AP-1). Обнаруживалась полоса, соответствующая TDP-43, и площадь под кривой определяли количественно для каждой полосы и нормировали на общую концентрацию белка в нерастворимой фракции. На оси у продемонстрировано количество нерастворимого TDP-43 в процентах от уровней при обработке вспомогательным веществом, нормализованных отдельно для каждой клеточной линии FTD-GRN ($n = 3$; среднее значение \pm SEM). Фиг. 52D демонстрирует, что обработка PR006 снижает нерастворимый TDP-43, признак патологии FTD-GRN, в культурах нейронов FTD-GRN. Фиг. 52F: Количественная оценка ядерного

сигнала TDP-43 из иммунофлуоресцентных изображений нейронов, полученных из iPSC, обработанных PR006A. Определяли интенсивность сигнала TDP-43 на ядро в нейронах FTD-GRN, обработанных вспомогательным веществом или PR006A; на оси y изображена интенсивность сигнала TDP-43 на ядро как процент от интенсивности сигнала TDP-43 на ядро контрольных нейронов, обработанных вспомогательным веществом (n = 145-306 клеток; среднее значение \pm SEM). TDP-43 измеряли с применением антитела анти-TDP-43 (# 12892-AP-1), а площадь ядра определяли с помощью окрашивания DAPI. Фиг. 52F демонстрирует, что, обработка PR006 увеличивала уровни ядерной экспрессии TDP-43 в культурах нейронов FTD-GRN до уровней, близких к контрольным уровням дикого типа. Статистические данные определяли с помощью непарного t-критерия; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

[0068] Фиг. 52E демонстрирует, что линии NSC, полученные из iPSC, от пациентов с мутациями FTD-GRN, экспрессировали меньше програнулина, чем линии NSC, полученные от здоровых контрольных субъектов. Статистические данные определяли с помощью непарного t-критерия; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

[0069] Фиг. 52G представляет собой серию изображений, демонстрирующих, что линии нейрональных стволовых клеток (NSC) из линий FTD-GRN человека и линий контрольных клеток человека успешно дифференцировались в культуры нейронов. Контрольные линии и линии NSC FTD-GRN (FTD-GRN # 1 и FTD-GRN # 2) дифференцировались в нейроны через 7 дней, на что указывают морфология клеток и иммунофлуоресцентное окрашивание на нейрональные маркеры (NeuN [красный]; MAP2 или Tau, как отмечено слева [зеленый]). DAPI (синий) применяли для окрашивания ядра.

[0070] Фиг. 53A – Фиг. 53C представляют собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов по анализу биораспределения и экспрессии програнулина в ЦНС в исследовании с подбором оптимальной дозы на модели взрослых мышей PR006A FTD-GRN с диапазоном доз. Четырехмесячным мышам *Grn* КО вводили PR006A или вспомогательное вещество путем ICV-введения. Мышей умерщвляли через 3 месяца после лечения вспомогательным веществом (красный) или PR006A в дозе $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (синий) для биохимических критериев оценки в ЦНС. Фиг. 53A: Наличие геномов вектора оценено в коре головного мозга и спинном мозге, и биораспределение продемонстрировано в виде геномов вектора на мкг гДНК на логарифмической шкале (n = 8-10/группа; среднее значение \pm SEM). Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонную стандартную кривую вектора. Пунктирная линия (50 геномов вектора/мкг гДНК) представляет порог положительного наличия вектора. Фиг. 53B: Экспрессию PR006A-кодируемой *GRN* РНК оценивали с помощью количественной RT-PCR (qRT-PCR) в коре головного мозга (n = 8-10/группа; среднее значение \pm SEM). Число копий *GRN* (специфичных для нашей кодон-оптимизированной последовательности PR006A) было нормализовано к 1 мкг общей РНК и продемонстрировано на логарифмической шкале. Фиг. 53C: Уровни белка програнулина измеряли с применением специфического для человека ИФА для програнулина в головном и спинном мозге (n = 8-10/группа; среднее значение \pm SEM). Уровни тканевого програнулина были нормализованы до концентрации общего белка. Нижний предел количественного определения (LLOQ) обозначен пунктирной серой линией. Для ИФА-анализов тканей, значения LLOQ (нг/мг) определяли путем деления значения LLOQ анализа (нг/мл) на среднюю концентрацию общего белка для всех образцов. Простая линия, соответствующая цвету легенды экспериментальной группы на оси x без планок погрешностей, указывает на то, что все животные в этой группе были 0. Статистический анализ проводили с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета

для сравнения с группой мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное вещество; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. vg = геномы вектора; LLOQ = нижний предел количественного определения; SC = спинной мозг.

[0071] Фиг. 53D – Фиг. 53E представляют собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов по анализу биораспределения и экспрессии програнулина в периферических тканях в исследовании с подбором оптимальной дозы на модели взрослых мышей PR006A FTD-GRN. Четырехмесячным мышам *Grn* KO вводили PR006A или вспомогательное вещество путем ICV-введения. Мышей умерщвляли через 3 месяца после лечения вспомогательным веществом (красный) или PR006A в дозе $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (синий) для биохимических критериев оценки в печени, сердце, легких, почках, селезенке и гонадных железах. Фиг. 53D: Оценено наличие геномов вектора, и биораспределение продемонстрировано в виде геномов вектора на мкг гДНК на логарифмической шкале ($n = 8-10$ /группа; среднее значение \pm SEM). Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонную стандартную кривую вектора. Пунктирная линия (50 геномов вектора/мкг гДНК) представляет порог положительного наличия вектора. Фиг. 53E: Уровни белка програнулина измеряли с помощью ИФА ($n = 8-10$ /группа; среднее значение \pm SEM). Уровни тканевого програнулина были нормализованы до концентрации общего белка. Простая линия, соответствующая цвету легенды экспериментальной группы на оси x без планок погрешностей, указывает на то, что все животные в этой группе были 0. Статистический анализ проводили с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета для сравнения с группой мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное вещество; * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$. vg = геномы вектора.

[0072] Фиг. 53F представляет собой гистограмму, изображающую результаты экспериментов по анализу уровней програнулина в плазме в исследовании с подбором оптимальной дозы на модели взрослых мышей PR006A FTD-GRN. Четырехмесячным мышам *Grn* KO вводили PR006A или вспомогательное вещество путем ICV-введения. Мышей умерщвляли через 3 месяца после лечения вспомогательным веществом (красный) или PR006A в дозе $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (синий) для биохимических критериев оценки в плазме. Уровни белка програнулина измеряли с применением специфического для человека ИФА для програнулина в плазме ($n = 8-10$ /группа; среднее значение \pm SEM). Уровни в плазме приведены на логарифмической шкале. Нижний предел количественного определения (LLOQ) обозначен пунктирной серой линией. Статистический анализ проводили с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета для сравнения с группой мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное вещество; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. LLOQ = нижний предел количественного определения. vg = геномы вектора.

[0073] Фиг. 53G – Фиг. 53H представляют собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов, демонстрирующих уменьшение лизосомальных и невропатологических дефектов в исследовании с подбором оптимальной дозы на модели взрослых мышей PR006A FTD-GRN. Четырехмесячным мышам *Grn* KO вводили PR006A или вспомогательное вещество путем ICV-введения. Мышей умерщвляли через 3 месяца после лечения вспомогательным веществом (красный) или PR006A в дозе $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (синий). Липофусциноз анализировали двумя независимыми методами: (1) оценка патоморфологом срезов мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, и (2) количественная оценка аутофлуоресценции липофусцина из срезов ИГХ. Фиг. 53G: Накопление липофусцина (аутофлуоресцентные

гранулы липофусцина) оценивали полуколичественно в Н&Е-окрашенных срезах в различных областях мозга «заслепленным» сертифицированным патоморфологом в соответствии со следующей схемой оценки: 0 = липофусцин не определялся; 1 = очень маленькие гранулы липофусцина (<2 мкм), разбросанные по всей области; 2 = повышенная плотность скопления мелких гранул и/или формирование более крупных гранул (> 2–3 мкм); 3 = мультифокальные области с высокой плотностью гранул липофусцина, видимые при малом увеличении объектива; 4 = обширное накопление липофусцина. Приведены бальные показатели накопления липофусцина в коре головного мозга, гиппокампе и областях мозга таламус/гипоталамус (n = 8-10/группа). Фиг. 53Н: ИГХ-анализ для убиквитина и количественная оценка наличия убиквитина в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе. Размер иммунореактивных объектов выше порога (размер иммунореактивных объектов [мкм²] приведен для убиквитина (n = 8-10/группа; среднее значение ± SEM). Статистический анализ проводили с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета для сравнения с группой мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное вещество; * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. vg = геномы вектора ; WT = дикий тип.

[0074] Фиг. 53I – Фиг. 53К представляют собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов, демонстрирующих снижение уровня нейровоспалительных маркеров в исследовании с подбором оптимальной дозы на модели взрослых мышей PR006A FTD-GRN. Четырехмесячным мышам *Grn* KO вводили PR006A или вспомогательное вещество путем ICV-введения. Мышей умерщвляли через 3 месяца после лечения вспомогательным веществом (красный) или PR006A в дозе $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (синий). Фиг. 53I: Экспрессию генов (уровни мРНК) *Tnf* и *Cd68* измеряли с помощью qRT-PCR в соматосенсорной коре (среднее значение ± SEM; n = 8-10/группа). Экспрессию гена нормализовали по гену «домашнего хозяйства» *Ppib*. Фиг. 53J - Фиг. 53К: Выполняли ИГХ-анализ Iba1 (Фиг. 53J) и GFAP (Фиг. 53К), а также количественно определяли их уровень в фиксированных срезах мозга в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе. Приведен процент области, представляющей интерес, покрытой объектами выше порога (иммунореактивная область [%]) (среднее значение ± SEM; n = 8-10/группа). Статистический анализ проводили с помощью ANOVA с поправкой Даннета, сравнивая каждую группу с группой мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное вещество; * = p < 0,05, *** = p < 0,001. vg = геномы вектора ; WT = дикий тип.

[0075] Фиг. 53L – Фиг. 53N представляют собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов, демонстрирующих снижение экспрессии генов лизосомальных и иммунных путей в исследовании с подбором оптимальной дозы на модели взрослых мышей PR006A FTD-GRN. Четырехмесячным мышам *Grn* KO вводили PR006A или вспомогательное вещество путем ICV-введения. Мышей умерщвляли через 3 месяца после лечения вспомогательным веществом (красный) или PR006A в дозе $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (синий). Секвенирование РНК проводили в образцах коры головного мозга мышей *Grn* KO, получавших ICV, и мышей WT C57BL/6J соответствующего возраста (серый). Методологию анализа вариации набора генов (GSVA) применяли для сравнения уровней экспрессии мРНК ранее опубликованных сигнатур генов, которые не регулируются у мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное вещество, по сравнению с мышами WT. Приведенные данные представляют собой баллы активности GSVA для тщательно подобранных наборов генов из двух опубликованных исследований и одного пути HALLMARK. Фиг. 53L: Клеточный компонент: вакуоль (GO: 0005773), Фиг. 53M: лизосома, и Фиг. 53N: система комплемента (путь HALLMARK) (медиана ± диапазон; n = 8-10/группа). Статистический анализ проводили с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета для сравнения с группой мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное

вещество при одновременном контроле уровня ошибок типа I с поправкой на эффект множественных сравнений, *** = $p < 0,001$. GSVA = анализ вариаций набора генов; vg = геномы вектора; WT = дикий тип.

[0076] Фиг. 54А представляет собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов, анализирующих биораспределение трансгена PR006A, количественно определенное с помощью кПЦР. Уровни трансгенов анализировали с помощью методик qPCR в NHP через 182 дня после инъекции ICM либо вспомогательного вещества, либо низкой дозы PR006A ($6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга), либо высокой дозы PR006A ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга). Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm SEM для 3 животных в группе; желтая линия указывает нижний предел количественного определения при 50 мкг/мкг ДНК.

[0077] Фиг. 54В представляет собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов по анализу уровней антител против лекарственного средства к програнулину человека. Антитела к програнулину в образцах сыворотки и СМЖ у NHP в День 29 и в День 182 после обработки либо вспомогательным веществом, либо низкой дозой PR006A ($6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга), либо высокой дозой PR006A ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга). Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

[0078] Фиг. 54С представляет собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов по анализу экспрессии трансгена PR006A (*GRN*). Уровни экспрессии *GRN* определяли в коре головного мозга, гиппокампе и вентральном среднем мозге NHP, собранных на День 183 день, с помощью ОТ-кПЦР. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

[0079] Фиг. 54D представляет собой гистограмму, изображающую результаты экспериментов по анализу уровней програнулина в СМЖ, количественно оцененных с помощью платформы Simple Western™ (Jess). Уровни програнулина определяли в образцах СМЖ у NHP, которые были собраны на День 183, с помощью анализа Simple Western™ (Jess). Образцы СМЖ от NHP, получавших вспомогательное вещество, низкую дозу PR006A ($6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга) или высокую дозу PR006A ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга). Представленные данные представляют собой среднее значение \pm SEM; P-значение: * $p < 0,05$, по данным одностороннего анализа зависимости ответа от дозы с применением критерия тенденции Уильяма.

[0080] Фиг. 55 представляет собой график, демонстрирующий результаты селективности и специфичности для автоматизированного анализа Western Jess. Уровни белка програнулина в образцах СМЖ пациентов с FTD были определены Jess на уровне 58 кДа. Группа (А): гетерозиготные пациенты с FTD и группы (В) и (С): семейные не-носители или нормальные индивидуумы. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Значения SEM приведены в виде вертикальных планок погрешностей.

[0081] Фиг. 56 представляет собой график, демонстрирующий уровни програнулина в образцах СМЖ пациента с FTD, обнаруженные с помощью ИФА. Группа (А): гетерозиготные пациенты с FTD и группы (В) и (С): семейные не-носители или нормальные индивидуумы. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Значения SEM приведены в виде вертикальных планок погрешностей.

[0082] Фиг. 57 представляет собой изображение геля каждого образца СМЖ, выполненного в двух повторностях на автоматизированной платформе Jess Western. Образцы анализировали при 4-кратном разбавлении с применением первичного антитела Adipogen PG-359-7. Первая полоса – это стандарты молекулярной массы, справа – идентификация полосы, используемая для расчета иммунореактивности, представленной в Примере 14.

[0083] Фиг. 58А - Фиг. 58В представляют собой серию графиков, демонстрирующих измерение уровней экспрессии PGRN человека. Уровни экспрессии PGRN человека определяли в образцах СМЖ приматов, не

относящихся к человеку (NHP), которые были собраны на 180 день, с помощью анализа Simple Western™ (Jess). Образцы СМЖ от NHP, получавших вспомогательное вещество («вспомогательное вещество»), низкую дозу PR006A ($6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга, «низкая доза») или высокую дозу PR006 ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга, «высокая доза»). Полученные данные выражены в виде средней площади пика иммунореактивности (Фиг. 58А) или кратного изменения для животных, которым вводили вспомогательное вещество (Фиг. 58В). Каждая точка представляет собой образец СМЖ от одного NHP (среднее значение технического дубликата), а ячейка представляет собой среднее значение +/- стандартная ошибка от трех отдельных NHP.

[0084] Фиг. 59А – Фиг. 59С представляют собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов по анализу биораспределения и экспрессии програнулина в ЦНС на модели зрелых мышей FTD-GRN после введения PR006A. Образцы тканей собирали у 18-месячных мышей *Grn* КО через 2 месяца после ICV введения вспомогательного вещества (красный) или $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) PR006A (синий). Фиг. 59А: Наличие геномов вектора оценивали в коре головного мозга и спинном мозге (среднее значение \pm SEM; n=4/группа). Биораспределение представлено в виде геномов вектора на 1 мкг гДНК по логарифмической шкале. Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонную стандартную кривую вектора. Пунктирная линия (50 геномов вектора/мкг гДНК) представляет порог положительного наличия вектора. Фиг. 59В - Фиг. 59С: Уровни белка програнулина измеряли с помощью ИФА в тканях ЦНС (головной и спинной мозг (Фиг. 59В)) и в СМЖ (Фиг. 59С) (среднее значение \pm SEM; n = 4/группа). Уровни програнулина в тканях были нормализованы к концентрации общего белка, а уровни програнулина в СМЖ были нормализованы к объему жидкости. Нижний предел количественного определения (LLOQ) обозначен пунктирной серой линией. Для ИФА-анализов тканей, значения LLOQ (нг/мг) определяли путем деления значения LLOQ анализа (нг/мл) на среднюю концентрацию общего белка для всех образцов. Простая красная линия на оси x без планок погрешностей указывает, что все животные в этой группе были 0. Статистический анализ выполняли с помощью метода Краскела-Уоллиса; * = p <0,05, ** = p <0,01, *** = p <0,001. vg = геномы вектора; LLOQ = нижний предел количественного определения; SC = спинной мозг.

[0085] Фиг. 59D – Фиг. 59Е представляют собой серию гистограмм и изображений, демонстрирующих результаты экспериментов, демонстрирующие уменьшение лизосомальных и невропатологических дефектов на модели зрелых мышей FTD-GRN после введения PR006A. Образцы тканей собирали у 18-месячных мышей *Grn* КО через 2 месяца после ICV введения вспомогательного вещества (красный) или $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) PR006A (синий). Липофусциноз был проанализирован патоморфологом путем бальной оценки срезов мозга, окрашенных гематоксилином и эозином. Фиг. 59D: Репрезентативные изображения липофусцина из области таламуса/гипоталамуса срезов мозга. Белые стрелки указывают на примеры накопления липофусцина. Приведены сводные данные о степени накопления липофусцина в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе/гипоталамусе в микроскопических препаратах, окрашенных Н&Е, из срезов мозга, которые оценивались на наличие аутофлуоресцентных гранул липофусцина. Накопление липофусцина полуколичественно оценивал «заслепленный» сертифицированный патоморфолог в соответствии со следующей схемой оценки: 0 = липофусцин не определялся; 1 = очень маленькие гранулы липофусцина (<2 мкм), разбросанные по всей области; 2 = повышенная плотность скопления мелких гранул и/или формирование более крупных гранул (> 2–3 мкм); 3 = мультифокальные области с высокой плотностью гранул липофусцина, видимые при малом увеличении объектива; 4 = обширное накопление липофусцина. Фиг. 59Е: ИГХ-анализ для убиквитина (n=4/группа) и количественная оценка наличия убиквитина в коре

головного мозга, гиппокампе и таламусе. Продемонстрирована положительная плотность клеток (клеток/мм²) для каждой области (среднее значение ± SEM). Статистические данные определяли с помощью t-критерия; * = p<0,05, ** = p<0,01. vg = геномы вектора.

[0086] Фиг. 59F – Фиг. 59I представляют собой серию гистограмм, изображающих результаты экспериментов, демонстрирующие снижение уровня маркеров нейровоспаления в модели зрелых мышей FTD-GRN после введения PR006A. Образцы тканей собирали у 18-месячных мышей *Grn* KO через 2 месяца после ICV введения вспомогательного вещества (красный) или $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) PR006A (синий). Фиг. 59F: Экспрессию генов *Tnf* и *Cd68* измеряли с помощью qRT-PCR в соматосенсорной коре (среднее значение ± SEM; n = 4/группа). Экспрессию гена нормализовали по гену «домашнего хозяйства» *Ppib*. (Фиг. 59G) Экспрессию белка провоспалительного цитокина TNF α измеряли в коре головного мозга с помощью анализа провоспалительных цитокинов у мышей Mesoscale Discovery (среднее значение ± SEM; n = 4/группа). Кору головного мозга гомогенизировали, а уровни экспрессии белка нормализовали по общей концентрации белка в лизатах тканей. Фиг. 59H – Фиг. 59I: Выполняли ИГХ-анализ Iba1 (Фиг. 59H) и GFAP (Фиг. 59I), а также количественно определяли их уровень в фиксированных срезах мозга. Продемонстрирована компиляция положительной плотности клеток (клеток/мм²) из трех проанализированных областей мозга (кора головного мозга, гиппокамп и таламус) (среднее значение ± SEM; n = 3-4/группа). Статистические данные определяли с помощью t-критерия; * = p<0,05. vg = геномы вектора.

[0087] Фиг. 60 представляет собой график, изображающий кривую доза-ответ для клеток HEK293T, трансдуцированных PR006A (n = 2; среднее значение ± SEM). Равное количество клеток трансдуцировали различными количествами PR006A. Через 72 часа уровни белка програнулина в клеточной среде измеряли с помощью ИФА.

[0088] Фиг. 61 представляет собой схему дизайна исследования максимальной дозы PR006A на модели зрелых мышей FTD-GRN. 10 мкл вспомогательного вещества (контроль) или PR006A в дозе $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) доставляли посредством ICV-инъекции двум группам мышей *Grn* KO: (1) в возрасте 16 месяцев на момент инъекции (n = 4-5/группа; PRV-2018-027) и (2) в возрасте 14 месяцев на момент инъекции (n = 1/группа, получавшая вспомогательное вещество; n = 3/группа, получавшая PR006A; PRV-2019-002) Через два месяца после инъекции животных умерщвляли. ЦНС и периферические ткани собирали для анализа биораспределения PR006A (кПЦР), экспрессии белка програнулина (ИФА) и гистопатологической характеристики (H&E). Экспрессию провоспалительных маркеров, накопление липофусцина и накопление убиквитина оценивали в головном мозге.

[0089] Фиг. 62A – Фиг. 62B представляют собой гистограммы, изображающие результаты биораспределения в периферических тканях и экспрессию програнулина на модели зрелых мышей FTD-GRN после введения PR006A. Образцы тканей собирали у 18-месячных мышей *Grn* KO через 2 месяца после ICV введения вспомогательного вещества (красный) или $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) PR006A (синий). Фиг. 62A: Наличие геномов вектора оценивали в печени, сердце, легких, почках, селезенке и гонадных железах (среднее значение ± SEM; n = 4/группа). Биораспределение представлено в виде геномов вектора на мкг гДНК по логарифмической шкале. Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонный стандарт вектора. Фиг. 62B: Уровни белка програнулина измеряли с помощью ИФА (среднее значение ± SEM; n = 4/группа). Уровни тканевого програнулина были нормализованы до концентрации общего белка. Простая красная линия на оси x без планок погрешностей указывает, что все животные в этой

группе были 0. Статистический анализ выполняли с помощью метода Краскела-Уоллиса; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. vg = геномы вектора.

[0090] Фиг. 63 представляет собой схему дизайна исследования для определения диапазона доз PR006A на модели взрослых мышей FTD-GRN. 10 мкл вспомогательного вещества (контроль) или PR006A в дозе $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) PR006A вводили путем ICV-инъекции 4-месячным мышам *Grn* KO ($n = 10$ /группа). Животных умерщвляли через три месяца после инъекции, когда мышам было 7 месяцев. ЦНС и периферические ткани собирали для анализа биораспределения PR006A (кПЦР), экспрессии белка програнулина (ИФА) и гистопатологической характеристики (H&E). Экспрессию провоспалительных маркеров, накопление липофусцина, накопление убиквитина и масштабные изменения экспрессии генов оценивали в головном мозге.

[0091] Фиг. 64 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов осуществления вектора рекомбинантного аденоассоциированного вируса (PR006A), содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую програнулин человека. «п.о.» означает «пары оснований». «кан» означает «ген, который придает устойчивость к канамицину». «GRN» означает «програнулин». «ITR» относится к инвертированной концевой повторяющейся последовательности аденоассоциированного вируса. «TRY» относится к последовательности, содержащей три сайта регуляции транскрипции: TATA, RBS и YY1. «CBAp» относится к промотору куриного β -актина. «CMVe» относится к энхансеру цитомегаловируса. «WPRE» относится к посттранскрипционному регуляторному элементу вируса гепатита сурка. «bGH» относится к сигнальному хвосту полиА бычьего гормона роста. «int» относится к интрону. Нуклеотидные последовательности двух цепей PR006A представлены в SEQ ID NO: 90 и 91.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0092] Настоящее изобретение частично основано на композициях и способах экспрессии комбинаций определенных генных продуктов (*например*, генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС) у субъекта. Генный продукт может представлять собой белок, фрагмент (*например*, часть) белка, интерферирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС, и *т.д.* В некоторых вариантах осуществления генный продукт представляет собой белок или фрагмент белка, кодируемый геном, ассоциированным с заболеванием ЦНС. В некоторых вариантах осуществления генный продукт представляет собой интерферирующую нуклеиновую кислоту (*например*, shРНК, siРНК, miРНК, amiРНК, *etc.*), которая ингибирует ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС

[0093] Ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС, относится к гену, кодирующему генный продукт, который генетически, биохимически или функционально ассоциирован с заболеванием ЦНС, таким как FTD (лобно-височная деменция) или PD (болезнь Паркинсона). Например, индивидуумы, имеющие патогенную мутацию в гене *GRN* (который кодирует белок PGRN), имеют повышенный риск развития FTD по сравнению с индивидуумами, у которых нет мутации в *GRN*. Аналогичным образом, у индивидуумов, имеющих мутации в гене *GBA1* (который кодирует белок Gcase), наблюдался повышенный риск развития PD по сравнению с индивидуумами, у которых нет мутации в *GBA1*. В другом примере PD ассоциирована с накоплением белковых агрегатов, содержащих белок α -синуклеин (α -Syn); соответственно, *SNCA* (который кодирует α -Syn) является PD-ассоциированным геном. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе экспрессионная кассета кодирует дикую или немутантную форму гена, ассоциированного с заболеванием

ЦНС (или его кодирующую последовательность). Примеры генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, перечислены в Таблице 1.

Таблица 1. Примеры генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС

Название	Ген	Функция	Номер доступа NCBI
Белок лизосомальной мембраны 2	<i>SCARB2/LIMP2</i>	лизосомальный рецептор глюкозилцерамидазы (нацеливающийся на GBA)	NP_005497.1 (Изоформа 1), NP_001191184.1 (Изоформа 2)
Просапозин	<i>PSAP</i>	предшественник сапозинов А, В, С и D, которые локализируются в лизосомальном компарimente и способствуют катаболизму гликосфинголипидов с короткими олигосахаридными группами	AAH01503.1, AAH07612.1, AAH04275.1, AAA60303.1
бета-глюкоцереброзидаза	<i>GBA1</i>	расщепляет бета- глюкозидную связь глюкоцереброзида	NP_001005742.1 (Изоформа 1), NP_001165282.1 (Изоформа 2), NP_001165283.1 (Изоформа 3)
Нелизосомальная глюкозилцерамидаза	<i>GBA2</i>	катализирует превращение глюкозилцерамида в свободную глюкозу и церамид	NP_065995.1 (Изоформа 1), NP_001317589.1 (Изоформа 2)
Галактозилцерамидаза	<i>GALC</i>	удаляет галактозу из производных церамидов	EAW81359.1 (Изоформа CRA_a), EAW81360.1 (Изоформа CRA_b), EAW81362.1 (Изоформа CRA_c)

Сфингомиелин фосфодиэстераза 1	<i>SMPD1</i>	превращает сфингомиелин в церамид	EAW68726.1 (Изоформа CRA_a), EAW68727.1 (Изоформа CRA_b), EAW68728.1 (Изоформа CRA_c), EAW68729.1 (Изоформа CRA_d)
Катепсин В	<i>CTSB</i>	тиолпротеаза, как полагают, участвует во внутриклеточном расщеплении и обмене белков; также участвует в инвазии и метастазировании опухоли	AAC37547.1, AAH95408.1, AAH10240.1
RAB7, белок 1, подобный представителю семейства онкогенов RAS	<i>RAB7L1</i>	регулирует везикулярный транспорт	AAH02585.1
Белок 35, ассоциированный с семейством вакуолярной сортировки белков	<i>VPS35</i>	компонент ретромерного грузоселективного комплекса	NP_060676.2
ГТР циклогидролаза 1	<i>GCH1</i>	отвечает за гидролиз гуанозинтрифосфата с образованием 7,8- дигидроноптеринтрифосфата	AAH25415.1
Интерлейкин 34	<i>IL34</i>	стимулирует рост или увеличивает выживаемость моноцитов; индуцирует активность путем связывания рецептора колониестимулирующего фактора 1	AAH29804.1

Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2	<i>TREM2</i>	образует рецепторный сигнальный комплекс с белком, связывающим тирозинкиназу протеина TYRO; берет участие в иммунном ответе и может быть вовлечен в патогенез хронического воспаления	AAF69824.1
Програнулин	<i>PGRN</i>	играет роль в развитии, воспалении, пролиферации клеток и гомеостазе белков	NP_002087.1

[0094] Помимо пациентов с болезнью Гоше (которые имеют мутации в обоих хромосомных аллелях гена *GBA1*), пациенты с мутациями только в одном аллеле *GBA1* характеризуются повышенным риском болезни Паркинсона (PD). Тяжесть симптомов болезни PD, которые включают нарушение походки, тремор в покое, ригидность и часто депрессию, нарушения сна и снижение когнитивных функций, коррелирует со степенью снижения активности ферментов. Таким образом, пациенты с болезнью Гоше имеют наиболее тяжелое течение, тогда как пациенты с единственной незначительной мутацией в *GBA1* обычно имеют более доброкачественное течение. Носители мутаций также подвержены высокому риску других нарушений, связанных с PD, включая деменцию с тельцами Леви, характеризующуюся нарушением исполнительных функций, психозом и нарушением движений, подобным PD, и мультисистемной атрофией с характерными двигательными и когнитивными нарушениями. Методов лечения, которые изменяли бы неотвратимо прогрессирующее течение этих нарушений, не существует.

[0095] Дефицит ферментов, таких как *Гказу* (например, генный продукт гена *GBA1*), а также общие варианты многих генов, участвующих в функции лизосом или переносе макромолекул в лизосомы (например, лизосомный мембранный белок 1 (LIMP), также называемый как SCARB2), были связаны с повышенным риском PD и/или риском болезни Гоше (например, нейропатической болезни Гоше, такой как болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа). Настоящее изобретение частично основано на экспрессионных конструкциях (например, векторах), кодирующих один или большее количество генов, например, *Гказу*, *GBA2*, просапозин, програнулин (PGRN), LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2, TMEM106B или комбинацию любых из вышеперечисленных элементов (или их частей), ассоциированных с заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС), например, болезнью Гоше, PD и т.д.. В некоторых вариантах осуществления комбинации генных продуктов, описанные в настоящем документе, действуют вместе (например, синергетически) для уменьшения одного или большего количества признаков и симптомов заболевания ЦНС при экспрессии их у субъекта.

[0096] Соответственно, в некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую *Гказу* (например, генный продукт гена *GBA1*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *Гказу*, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-

оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Gказу, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_000148.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Gказу.

[0097] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую просапозин (*например*, генный продукт гена *PSAP*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую просапозин, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая просапозин, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_002769.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок просапозин.

[0098] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую LIMP2/SCARB2 (*например*, генный продукт гена *SCARB2*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SCARB2, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая LIMP2/SCARB2, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_005497.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SCARB2.

[0099] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GBA2 (*например*, генный продукт гена *GBA2*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GBA2, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая GBA2, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_065995.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах

осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок GBA2.

[0100] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GALC (*например*, генный продукт гена *GALC*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GALC, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая GALC, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_000144.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок GALC.

[0101] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок CTSB (*например*, генный продукт гена *CTSB*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую CTSB, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CTSB, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 35 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_001899.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок CTSB.

[0102] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок SMPD1 (*например*, генный продукт гена *SMPD1*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SMPD1, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SMPD1, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_000534.3). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SMPD1.

[0103] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GCH1 (*например*, генный продукт гена

GCH1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *GCH1*, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая *GCH1*, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_000534.3). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок *GCH1*.

[0104] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок *RAB7L* (*например*, генный продукт гена *RAB7L*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *RAB7L*, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая *RAB7L*, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_003920.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок *RAB7L*.

[0105] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок *VPS35* (*например*, генный продукт гена *VPS35*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *VPS35*, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая *VPS35*, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_060676.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок *VPS35*.

[0106] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок *IL-34* (*например*, генный продукт гена *IL34*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *IL-34*, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая *IL-34*, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55 (*например*, как указано в эталонной последовательности

NCBI NP_689669.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок IL-34.

[0107] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок TREM2 (*например*, генный продукт гена *TREM*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TREM2, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TREM2, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 57 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_061838.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок TREM2.

[0108] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок TMEM106B (*например*, генный продукт гена *TMEM106B*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TMEM106B, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TMEM106B, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_060844.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок TMEM106B.

[0109] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую програнулин (*например*, генный продукт гена *PGRN*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую просапозин, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая програнулин (PGRN), кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 67 (*например*, как указано в эталонной последовательности NCBI NP_002078.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок просапозин.

[0110] В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую первый генный продукт и второй генный продукт, при этом каждый генный продукт независимо выбирают из генных продуктов или их частей, представленных в Таблице 1.

[0111] В некоторых вариантах осуществления первый генный продукт или второй генный продукт представляет собой белок Гказу или его часть. В некоторых вариантах осуществления первый генный продукт представляет собой белок Гказу, а второй генный продукт выбирают из GBA2, просапозина, програнулина, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2 и TMEM106B.

[0112] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция кодирует (*например*, отдельно или в дополнение к другому генному продукту) интерферирующую нуклеиновую кислоту (*например*, shPHK, miPHK, dsPHK и т.д.). В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию α -синуклина (α -синуклин). В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на α -синуклин, содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 20-25. В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на α -синуклин, связывается с (*например*, гибридизуется с) последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 20-25.

[0113] В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию TMEM106B. В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на TMEM106B, содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64 или 65. В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на TMEM106B, связывается с (*например*, гибридизуется с) последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 64 или 65.

[0114] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит один или большее количество промоторов. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA), промотор CAG, промотор CD68 или промотор JeT. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК pol II (*например*, или промотор РНК pol III (*например*, U6, и т.д.)).

[0115] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит внутренний участок посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления IRES расположен между первым генным продуктом и вторым генным продуктом.

[0116] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит кодирующую последовательность саморасщепляющегося пептида. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид T2A.

[0117] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления последовательности ITR фланкируют первый генный продукт и второй генный продукт (*например*, расположены следующим образом от 5'-конца до 3'-конца: ITR-первый генный продукт-второй генный продукт-ITR). В некоторых вариантах осуществления одна из последовательностей ITR выделенной нуклеиновой кислоты не имеет функционального сайта концевой разрешения (trs). Например, в некоторых вариантах осуществления одним из ITR является Δ ITR.

[0118] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к векторам gAAV, содержащим ITR, имеющий модифицированную область «D» (*например*, последовательность D, которая модифицирована

относительно ITR AAV2 дикого типа, SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления ITR, имеющий модифицированную область D, представляет собой 5' ITR вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область «D» содержит последовательность «S», например, как указано в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления ITR, имеющий модифицированную область «D», представляет собой 3' ITR вектора гAAV. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область «D» включает 3' ITR, в которой область «D» расположена на 3'-конце ITR (*например*, на внешнем или терминальном конце ITR относительно трансгенной вставки вектора). В некоторых вариантах осуществления модифицированная область «D» содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26 или 27.

[0119] В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота (*например*, вектор гAAV) содержит область TRY. В некоторых вариантах осуществления область TRY содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

[0120] В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит, состоит или кодирует пептид, имеющий последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-91.

[0121] В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор AAV (гAAV) или вектор бакуловируса. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV является одноцепочечным (*например*, одноцепочечной ДНК).

[0122] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе, или вектор, как описано в данном документе.

[0123] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV), содержащий капсидный белок и выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в данном документе.

[0124] В некоторых вариантах осуществления указанный капсидный белок способен преодолевать гематоэнцефалический барьер, *например*, капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAVrh.10. В некоторых вариантах осуществления гAAV трансдуцирует нейрональные клетки и ненейрональные клетки центральной нервной системы (ЦНС).

[0125] В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющимся или подозреваемым заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), при этом указанный способ включает введение субъекту (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, или гAAV), как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой нейродегенеративное заболевание, такое как нейродегенеративное заболевание, указанное в Таблице 12. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой синуклеинопатию, такую как синуклеинопатия, указанная в Таблице 13. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой тауопатию, такую как тауопатия, указанная в Таблице 14. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой лизосомальную болезнь накопления, такую как лизосомальная болезнь накопления, указанная в Таблице 15. В некоторых вариантах осуществления лизосомальная болезнь накопления представляет собой нейронопатическую болезнь Гоше, такое как болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа.

[0126] В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющимся или подозреваемым заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), при этом указанный способ включает введение субъекту (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, или гAAV), как описано в данном документе.

[0127] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой лобно-височной деменцией (FTD), FTD с мутацией *GRN*, FTD с мутацией *tau*, FTD с мутацией *C9orf72*, цероидным липофусцинозом, болезнью Паркинсона, болезнью Альцгеймера, кортикобазальной дегенерацией, заболеванием двигательных нейронов, или болезнью Гоше, при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, кодирующего програнулин (PGRN), при этом PGRN кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68; и при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

[0128] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD с мутацией *GRN*, при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, кодирующего програнулин (PGRN), при этом PGRN кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68; и при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту в дозе около $3,5 \times 10^{13}$ геномов вектора (vg), около $7,0 \times 10^{13}$ vg, или около $1,4 \times 10^{14}$ vg. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят путем инъекции в мозжечково-мозговую цистерну.

[0129] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нуклеиновую кислоту (*например*, геном гAAV, *например*, инкапсидированный капсидными белками AAV), которая кодирует два или большее количество генных продуктов (*например*, генные продукты, ассоциированные с заболеванием ЦНС), *например* 2, 3, 4, 5 или большее количество генных продуктов, описанных в этом документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит две или большее количество (*например*, 2, 3, 4, 5 или большее количество) различных нуклеиновых кислот (*например*, два или большее количество геномов гAAV, *например*, отдельно инкапсидированных капсидными белками AAV), каждая из которых кодирует один или большее количество различных генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят две или большее количество разных композиций, каждая из которых содержит одну или большее количество нуклеиновых кислот, кодирующих разные генные продукты. В некоторых вариантах осуществления разные генные продукты функционально связаны с одним и тем же типом промотора (*например*, с одним и тем же промотором). В некоторых вариантах осуществления разные генные продукты функционально связаны с разными промоторами.

Выделенные нуклеиновые кислоты и векторы

[0130] Выделенная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагаются выделенные нуклеиновые кислоты (*например*, векторы гAAV), содержащие экспрессионную конструкцию и, кодирующую один или большее количество PD-ассоциированных генов, *например*, *Гказа* (*например*, генный продукт гена *GBA1*) или его часть. *Гказа*, также называемая β -глюкоцереброзидазой или GBA, относится к лизосомальному белку, который расщепляет бета-глюкозидную связь химического глюкоцереброзида, промежуточного продукта метаболизма гликолипидов. У человека *Гказа* кодируется геном *GBA1*, расположенным на хромосоме 1. В некоторых вариантах осуществления *GBA1* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI

NP_000148.2 (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую Gказу, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека), такая как последовательность, указанная в SEQ ID NO: 15.

[0131] В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую просапозин (*например*, генный продукт гена *PSAP*). Просапозин является гликопротеином-предшественником для белков-активаторов сфинголипидов (сапозинов) А, В, С и D, которые способствуют катаболизму гликосфинголипидов с короткими олигосахаридными группами. У людей ген *PSAP* находится на хромосоме 10. В некоторых вариантах осуществления *PSAP* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_002769.1 (*например*, SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую просапозин, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека), такая как последовательность, указанная в SEQ ID NO: 17.

[0132] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую LIMP2/SCARB2 (*например*, генный продукт гена *SCARB2*). *SCARB2* относится к мембранному белку, который регулирует лизосомальный и эндосомальный транспорт внутри клетки. У человека ген *SCARB2*, расположен на хромосоме 4. В некоторых вариантах осуществления ген *SCARB2* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_005497.1 (SEQ ID NO: 18). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *SCARB2*, которая была кодон-оптимизирована.

[0133] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок *GBA2* (*например*, генный продукт гена *GBA2*). Белок *GBA2* относится к нелизосомальной глюкозилцерамидазе. У человека ген *GBA2*, расположен на хромосоме 9. В некоторых вариантах осуществления ген *GBA2* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_065995.1 (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *GBA2*, которая была кодон-оптимизирована.

[0134] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок *GALC* (*например*, генный продукт гена *GALC*). Белок *GALC* относится к галактозилцерамидазе (или галактоцереброзидазе), которая представляет собой фермент, гидролизующий связи сложного эфира галактозы галактоцереброзида, галактозилсфингозина, лактозилцерамида и моногалактозилдиглицерида. У людей ген *GALC* находится на хромосоме 14. В некоторых вариантах осуществления ген *GALC* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_000144.2 (*например*, SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *GALC*, которая была кодон-оптимизирована.

[0135] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок CTSB (*например*, генный продукт гена *CTSB*). Белок CTSB относится к катепсину В, лизосомальной цистеиновой протеазе, играющей важную роль во внутриклеточном протеолизе. У человека ген *CTSB*, расположен на хромосоме 8. В некоторых вариантах осуществления ген *CTSB* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_001899.1 (SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую CTSB, которая была кодон-оптимизирована.

[0136] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок SMPD1 (*например*, генный продукт гена *SMPD1*). Белок SMPD1 относится к сфингомиелинфосфодиэстеразе 1, которая является ферментом гидролазой, участвующим в метаболизме сфинголипидов. У людей ген *SMPD1* находится на хромосоме 11. В некоторых вариантах осуществления ген *SMPD1* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_000534.3 (*например*, SEQ ID NO: 37). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SMPD1, которая была кодон-оптимизирована.

[0137] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GCH1 (*например*, генный продукт гена *GCH1*). Белок GCH1 относится к GTP-циклогидролазе I, которая является ферментом гидролазой, участвующей в путях биосинтеза фолиевой кислоты и биоптерина. У людей ген *GCH1* находится на хромосоме 14. В некоторых вариантах осуществления ген *GCH1* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_000152.1 (*например*, SEQ ID NO: 45). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GCH1, которая была кодон-оптимизирована.

[0138] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок RAB7L (*например*, генный продукт гена *RAB7L*). Белок RAB7L относится к RAB7, представителю семейства онкогенов RAS 1, который является GTP-связывающим белком. У человека ген *RAB7L*, расположен на хромосоме 1. В некоторых вариантах осуществления ген *RAB7L* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_003920.1 (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую RAB7L, которая была кодон-оптимизирована.

[0139] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок VPS35 (*например*, генный продукт гена *VPS35*). Белок VPS35 относится к белку 35, ассоциированному с вакуолярной сортировкой белков, который является частью белкового комплекса, участвующего в ретроградном транспорте белков от эндосом к сети транс-Гольджи. У людей ген *VPS35* находится на хромосоме 16. В некоторых вариантах осуществления ген *VPS35* кодирует

пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_060676.2 (например, SEQ ID NO: 49). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую VPS35, которая была кодон-оптимизирована.

[0140] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок IL-34 (например, генный продукт гена *IL34*). Белок IL-34 относится к интерлейкину 34, который является цитокином, увеличивающим рост и выживаемость моноцитов. У людей ген *IL34* находится на хромосоме 16. В некоторых вариантах осуществления ген *IL34* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_689669.2 (например, SEQ ID NO: 55). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую IL-34, которая была кодон-оптимизирована.

[0141] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок TREM2 (например, генный продукт гена *TREM2*). Белок TREM2 относится к триггерному рецептору, экспрессированному на миелоидных клетках 2, который является рецептором суперсемейства иммуноглобулинов, обнаруженным на миелоидных клетках. У человека ген *TREM2*, расположен на хромосоме 6. В некоторых вариантах осуществления ген *TREM2* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_061838.1 (SEQ ID NO: 57). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TREM2, которая была кодон-оптимизирована.

[0142] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок TMEM106B (например, генный продукт гена *TMEM106B*). Белок TMEM106B относится к трансмембранному белку 106B, который является белком, участвующим в морфогенезе дендритов и регуляции лизосомального транспорта. У человека ген *TMEM106B*, расположен на хромосоме 7. В некоторых вариантах осуществления ген *TMEM106B* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_060844.2 (SEQ ID NO: 62). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TMEM106B, которая была кодон-оптимизирована.

[0143] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок програнулин (например, генный продукт гена *PGRN*). Белок PGRN относится к програнулину, который является белком, участвующим в развитии, воспалении, пролиферации клеток и гомеостазе белка. У людей ген *PGRN* находится на хромосоме 17. В некоторых вариантах осуществления ген *PGRN* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_002078.1 (например, SEQ ID NO: 67). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую PGRN, которая была кодон-оптимизирована. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор β -актина курицы (CBA) и энхансер цитомегаловируса (CMVe).

[0144] В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается автоматизированный иммуноанализ вестерн-блоттинг для количественной оценки уровня белка PGRN в образце спинномозговой жидкости (СМЖ). В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ представляет собой платформу для автоматизированного иммуноанализа вестерн-блоттинга на основе капилляров, в которой все этапы, такие как разделение белков, иммунозондирование, промывание и обнаружение с помощью хемилюминесценции, выполняются в капиллярном картридже. В некоторых вариантах осуществления образец СМЖ взят от человека или приматов, не относящихся к человеку. В некоторых аспектах иммуноанализ позволяет обнаруживать различия в уровнях белка PGRN в присутствии циркулирующих антител. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ количественной оценки уровня белка програнулина в образце СМЖ, включающий: (1) разбавление образца СМЖ (*например*, 4-кратное разбавление); (2) загрузку образца СМЖ, антитела против програнулина, вторичного антитела, которое обнаруживает антитело против програнулина, люминол и пероксид в лунки капиллярного картриджа; (3) загрузку капиллярного картриджа в автоматический прибор для иммуноанализа вестерн-блоттинга; (4) использование автоматического прибора для иммуноанализа вестерн-блоттинга для вычисления одного или большего количества из следующих параметров: интенсивность сигнала, площадь пика, соотношение сигнал/шум и параметры нормализации общего белка; и (5) количественное определение уровня белка програнулина в образце СМЖ как площади пика иммунореактивности к антителу против програнулина. В некоторых вариантах осуществления образец СМЖ разбавляют в основной смеси, содержащей дитиотреитол (DTT) и буфер для образцов. Основная смесь может дополнительно содержать другие специальные компоненты. В некоторых аспектах антитело против програнулина обнаруживает програнулин человека. В некоторых вариантах осуществления уровень белка програнулина количественно определяют по рассчитанным параметрам с помощью программного обеспечения, которое контролирует автоматический иммуноанализ вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления программное обеспечение представляет собой программное обеспечение Compass для Simple Western™ (ProteinSimple, Сан-Хосе, штат Калифорния).

[0145] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ количественной оценки уровня белка програнулина в образце спинномозговой жидкости (СМЖ), включающий: (1) разбавление образца СМЖ (*например*, 4-кратное разбавление) в основной смеси, содержащей дитиотреитол (DTT) и буфер для образца; (2) загрузку разбавленного образца СМЖ, антитела против програнулина, вторичного антитела, которое обнаруживает антитело против програнулина, люминол и пероксид, в лунки капиллярного картриджа; (3) загрузку капиллярного картриджа в автоматический прибор для иммуноанализа вестерн-блоттинга; (4) использование автоматического прибора для иммуноанализа вестерн-блоттинга для расчета интенсивности сигнала, площади пика и отношения сигнал/шум; и (5) количественное определение уровня белка програнулина в образце СМЖ как площади пика иммунореактивности к антителу против програнулина.

[0146] В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую первый генный продукт и второй генный продукт, при этом каждый генный продукт независимо выбирают из генных продуктов или их частей, представленных в Таблице 1.

[0147] В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (*например*, вектор gAAV), описанные в данном документе, содержат последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-91, или состоят из нее. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или

вектор (например, вектор gAAV), описанные в данном документе, содержат или состоят из последовательности, которая является комплементарной (например, комплементарной для) последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор gAAV), описанные в данном документе, содержат или состоят из последовательности, которая является обратным комплементом последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор gAAV), описанные в данном документе, содержат или состоят из части последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-91. Часть может содержать по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, представляет собой смысловую цепь нуклеиновой кислоты (например, цепь от 5' к 3') или, в контексте вирусных последовательностей, плюс (+) цепь. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, представляет собой антисмысловую цепь нуклеиновой кислоты (например, цепь от 3' к 5') или, в контексте вирусных последовательностей, минус (-) цепь.

[0148] В некоторых вариантах осуществления генный продукт кодируется кодирующей частью (например, кДНК) встречающегося в природе гена. В некоторых вариантах осуществления первый генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый геном *GBA1*. В некоторых вариантах осуществления генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый другим геном, указанным в Таблице 1, например, геном *SCARB2/LIMP2* или геном *PSAP*. Однако квалифицированный специалист понимает, что порядок экспрессии первого генного продукта (например, Сказы) и второго генного продукта (например, LIMP2, и т.д.) Обычно может быть обратным (например, LIMP2 является первым генным продуктом, а Сказа – вторым генным продуктом). В некоторых вариантах осуществления генный продукт представляет собой фрагмент (например, часть) гена, указанного в таблице 1. Фрагмент белка может содержать около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или около 99% белка, кодируемого генами, указанными в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент белка содержит от 50% до 99,9% (например, любое значение от 50% до 99,9%) белка, кодируемого геном, указанным в Таблице 1.

[0149] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция является моноцистронной (например, экспрессионная конструкция кодирует один слитый белок, содержащий первый генный продукт и второй генный продукт). В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция является полицистронной (например, экспрессионная конструкция кодирует два различных генных продукта, например, два разных белка или фрагмента белка).

[0150] Полицистронный экспрессионный вектор может содержать один или большее количество (например, 1, 2, 3, 4, 5, или более) промоторов. Можно применять любой пригодный промотор, например, конститутивный промотор, индуцибельный промотор, эндогенный промотор, тканеспецифический промотор (например, а ЦНС- специфический промотор) и т.д. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина курицы (промотор CBA), промотор CAG (например, как описано в публикации Alexoroulou et al. (2008) *BMC Cell Biol.* 9:2; doi: 10.1186/1471-2121-9-2), промотор CD68 или промотор JeT (например, как описано в публикации Tornoe et al. (2002) *Gene* 297(1-2):21-32). В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первый генный продукт, второй генный продукт или первый генный продукт и второй генный

продукт. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета содержит одну или большее количество дополнительных регуляторных последовательностей, включая, помимо прочего, последовательности связывания факторов транскрипции, сайты сплайсинга интронов, сайты присоединения поли(А), энхансерные последовательности, сайты связывания репрессоров или любую комбинацию вышеперечисленных элементов.

[0151] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый генный продукт, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй генный продукт, разделены последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей внутренний участок посадки рибосомы (IRES). Примеры участков IRES описаны, например, в публикации Mokejs et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34(Database issue):D125-30. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый генный продукт, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй генный продукт, разделены последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид. Примеры саморасщепляющихся пептидов включают, помимо прочего, T2A, P2A, E2A, F2A, VmCPV 2A и VmIFV 2A, а также пептиды, описанные в публикации Liu et al. (2017) *Sci Rep.* 7: 2193. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид T2A.

[0152] Патогенетически, такие нарушения, как болезнь Паркинсона и болезнь Гоше, ассоциированы с накоплением белковых агрегатов, состоящих в основном из белка α -синуклеина (α -Syn). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, содержат ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая снижает или предотвращает экспрессию белка α -Syn. Последовательность, кодирующая ингибирующую нуклеиновую кислоту, может быть помещена в нетранслируемую область (например, интрон, 5'UTR, 3'UTR и т.д.) экспрессионного вектора.

[0153] В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота расположена в интроне экспрессионной конструкции, например, в интроне выше последовательности, кодирующей первый генный продукт. Ингибирующая нуклеиновая кислота может быть двухцепочечной РНК (dsРНК), siРНК, shРНК, микроРНК (miРНК), искусственной miРНК (amiРНК) или аптамером РНК. Обычно ингибирующая нуклеиновая кислота связывается с (например, гибридизуется с) от около 6 до около 30 (например, любое целое число от 6 до 30 включительно) смежных нуклеотидов целевой РНК (например, мРНК). В некоторых вариантах осуществления ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой miРНК или amiРНК, например, miРНК, нацеленную на *SNCA* (ген, кодирующий белок α -Syn) или *TMEM106B* (например, ген, кодирующий белок TMEM106B). В некоторых вариантах осуществления miРНК не содержит каких-либо несовпадений с областью *SNCA* мРНК с которой она гибридизуется (например, miРНК является «усовершенствованной») В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой shРНК (например, shРНК, нацеленную на *SNCA* или *TMEM106B*). В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой искусственную miРНК (amiРНК), которая включает каркас miR-155 и целевую последовательность *SNCA* или *TMEM106B*.

[0154] Квалифицированному специалисту будет понятно, что когда речь идет о последовательностях нуклеиновых кислот, содержащих или кодирующих ингибирующие нуклеиновые кислоты (например, dsРНК, siРНК, miРНК, amiРНК и т. д.), любой один или большее количество нуклеотидов тимидина (Т) или нуклеотидов уридина (U) в последовательности, представленной в данном документе, может быть заменен любым другим нуклеотидом, подходящим для спаривания оснований (например, посредством спаривания

оснований по Уотсону-Крику) с нуклеотидом аденозина. Например, Т можно заменить на U, а U можно заменить на Т.

[0155] Выделенная нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, может существовать сама по себе или как часть вектора. Обычно вектор может быть плазмидой, космидой, фагмидой, бактериальной искусственной хромосомой (BAC) или вирусным вектором (*например*, аденовирусным вектором, вектором аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусным вектором, бакуловирусным вектором и *т.д.*). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду (*например*, плазмиду, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV является одноцепочечным (*например*, одноцепочечной ДНК). В некоторых вариантах осуществления указанный вектор представляет собой рекомбинантный вектор AAV (гAAV). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой бакуловирусный вектор (*например*, вектор вируса ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcNPV)).

[0156] Обычно вектор гAAV (*например*, геном гAAV) содержит трансген (*например*, экспрессионную конструкцию, содержащую один или большее количество из следующих элементов: промотор, интрон, последовательность энхансера, последовательность, кодирующую белок, последовательность, кодирующую ингибирующую РНК, последовательность хвоста полиА и *т.д.*), фланкированный двумя последовательностями инвертированного концевого повтора (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления трансген вектора гAAV содержит выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления каждая из двух последовательностей ITR вектора гAAV представляет собой полноразмерный ITR (*например*, длиной приблизительно 145 п.о. и содержит функциональный сайт связывания *Rep* (RBS) и сайт терминального разрешения (*trs*)). В некоторых вариантах осуществления один из ITR вектора гAAV усечен (*например*, укорочен или неполноразмерный). В некоторых вариантах осуществления в усеченном ITR отсутствует функциональный сайт терминального разрешения (*trs*), и он используется для получения самокомплементарных векторов AAV (векторы scAAV). В некоторых вариантах осуществления усеченный ITR представляет собой ΔITR, например, как описано в публикации McCarty et al. (2003) *Gene Ther.* 10(26):2112-8.

[0157] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенным нуклеиновым кислотам (*например*, векторам гAAV), содержащим ITR, имеющего одну или большее количество модификаций (*например*, добавления, делеции, замены нуклеиновых кислот и *т.д.*) относительно ITR AAV дикого типа, например, относительно ITR AAV2 дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 29). Структура ITR AAV2 дикого типа приведена на Фиг. 20. Как правило, ITR дикого типа содержит 125 нуклеотидную область, которая самоотжигается с образованием палиндромной двухцепочечной Т-образной шпильчатой структуры, состоящей из двух поперечных плеч (образованных последовательностями, обозначаемыми как В/В 'и С/С' соответственно), более длинной стеблевой области (образованной последовательностями А/А ') и одноцепочечной концевой области, называемой областью «D» (Фиг. 20). Как правило, область «D» ITR расположена между областью стебля, образованной последовательностями А/А', и вставкой, содержащей трансген вектора гAAV (*например*, расположенной «внутри» ITR относительно конца ITR или проксимальнее вставки трансгена или экспрессионной конструкции вектора гAAV). В некоторых вариантах осуществления область «D» содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27. Было обнаружено, что область «D» играет важную роль в инкапсидации векторов гAAV капсидными белками, например, как описано в публикации Ling et al. (2015) *J Mol Genet Med* 9(3).

[0158] Настоящее изобретение частично основано на неожиданном открытии того, что векторы гAAV, содержащие область «D», расположенную «вне» ITR (*например*, проксимальнее конца ITR относительно вставки трансгена или экспрессионной конструкции), являются эффективно инкапсидированными капсидными белками AAV, по сравнению с векторами гAAV, имеющими ITR с немодифицированными ITR (*например*, дикого типа) ITR. В некоторых вариантах осуществления векторы гAAV, имеющие модифицированную последовательность «D» (*например*, последовательность «D» во «внешнем» положении), обладают пониженной токсичностью по сравнению с векторами гAAV, имеющими последовательности ITR дикого типа.

[0159] В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность «D» содержит по меньшей мере одну нуклеотидную замену относительно последовательности «D» дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 27). Модифицированная последовательность «D» может иметь по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 замен нуклеотидов относительно последовательности «D» дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность «D» содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 замен нуклеиновых кислот относительно последовательности «D» дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность «D» является от около 10% до около 99% (*например*, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%) идентичной последовательности «D» дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность «D» содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, также называемую последовательностью «S», как описано в публикации Wang et al. (1995) *J Mol Biol* 250(5):573-80.

[0160] Выделенная нуклеиновая кислота или вектор гAAV, как описано в данном документе, может дополнительно содержать последовательность «TRY», *например*, как указано в SEQ ID NO: 28 или как описано в публикации Francois et al., (2005) *J. Virol.* 79(17):11082–11094. В некоторых вариантах осуществления последовательность TRY расположена между ITR (*например*, 5' ITR) и экспрессионной конструкцией (*например*, вставкой, кодирующей трансген) выделенной нуклеиновой кислоты или вектора гAAV.

[0161] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к бакуловирусным векторам, содержащим выделенную нуклеиновую кислоту или вектор гAAV, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления бакуловирусный вектор представляет собой вектор ядерного полиэдруса *Autographa californica* (AcNPV), *например*, как описано в публикациях Urabe et al. (2002) *Hum Gene Ther* 13(16):1935-43 и Smith et al. (2009) *Mol Ther* 17(11):1888-1896.

[0162] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предлагается клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в данном документе. Клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой или эукариотической клеткой. *Например*, клетка-хозяин может быть клеткой млекопитающего, бактериальной клеткой, дрожжевой клеткой, клеткой насекомого и *т.д.* В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, *например*, клетку HEK293T. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, *например* клетку *E. coli*.

rAAV

[0163] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к рекомбинантным AAV (гAAV), содержащим трансген, который кодирует нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе (*например*, вектор гAAV, как описано в данном документе). Термин «гAAV» обычно относится к вирусным частицам, содержащим вектор гAAV, инкапсидированный одним или большим количеством капсидных белков AAV. RAAV, описанный в данном документе, может содержать капсидный белок, имеющий серотип, выбранный из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAV10. В некоторых вариантах осуществления гAAV содержит капсидный белок из хозяина, не относящегося к человеку, например, капсидный белок макаки-резуса AAV, такой как AAVrh.10, AAVrh.39 и т.д. В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанный в данном документе, содержит капсидный белок, который представляет собой вариант капсидного белка дикого типа, такой как вариант капсидного белка, который включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 (например, 15, 20, 25, 50, 100 и т.д.) аминокислотных замен (например, мутаций) относительно капсидного белка AAV дикого типа, из которого он получен. В некоторых вариантах осуществления вариант капсидного белка AAV представляет собой капсидный белок AAV1RX, например, как описано в публикации Albright et al. *Mol Ther*. 2018 Feb 7;26(2):510-523. В некоторых вариантах осуществления вариант капсидного белка представляет собой капсидный белок AAV TM6, например, как описано в публикации Rosario et al. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016; 3: 16026.

[0164] В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в данном документе, легко распространяются в ЦНС, особенно при введении в пространство, где циркулирует СМЖ, или непосредственно в паренхиму головного мозга. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в данном документе, содержат капсидный белок, который способен проходить через гематоэнцефалический барьер (BBB). Например, в некоторых вариантах осуществления гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9 или AAVrh.10. Продуцирование гAAV описывается, например, в публикациях Samulski et al. (1989) *J Virol*. 63(9):3822-8 и Wright (2009) *Hum Gene Ther*. 20(7): 698–706. В некоторых вариантах осуществления гAAV содержит капсидный белок, который специфически или предпочтительно нацелен на миелоидные клетки, например, клетки микроглии.

[0165] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается гAAV, именуемый «PR006A». PR006A представляет собой гAAV, который доставляет функциональный ген *GRN* человека, приводящий к повышенной экспрессии функционального гена PGRN человека. Вставка вектора PR006A содержит элемент промотора куриного β-актина (CBA), состоящий из 4 частей: энхансера цитомегаловируса (CMV), промотора CBA, экзона 1 и интрона (int) для постоянной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности *GRN* человека (SEQ ID NO:68). 3'-область также содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), за которым следует сигнальный хвост полиаденилирования бычьего гормона роста. На 5'-конце промоторной области включены три хорошо описанных

[0166] хорошо описанных сайта транскрипционной регуляторной активации: TATA, RBS и YY1 (см., *например*, публикацию Francois et al., (2005) *J. Virol*. 79(17):11082–11094). Фланкирующие инвертированные концевые повторы (ITR) позволяют правильно упаковывать вставочные последовательности. Каркас содержит ген, придающий устойчивость к канамицину, а также спейсерную последовательность, предотвращающую обратную упаковку. Схема вектора гAAV приведена на Фиг. 64. SEQ ID NO 90 представляет собой нуклеотидную последовательность первой цепи (в порядке от 5' до 3') вектора PR006A, продемонстрированного на Фиг. 64. SEQ ID NO 91 представляет собой нуклеотидную последовательность

второй цепи (в порядке от 5' до 3') вектора PR006A, продемонстрированного на Фиг. 64. PR006A содержит капсидные белки AAV9.

[0167] В некоторых вариантах осуществления гAAV, как описано в данном документе (*например*, содержащий рекомбинантный геном гAAV, инкапсидированный капсидными белками AAV с образованием капсидной частицы гAAV), продуцируется в экспрессионной системе бакуловирусного вектора (BEVS). Продуцирование гAAV с применением BEVS описано, например, в публикациях Urabe et al. (2002) Hum Gene Ther 13(16):1935-43, Smith et al. (2009) Mol Ther 17(11):1888-1896, патенте США № 8945918, патенте США 9879282 и международной публикации PCT WO 2017/184879. Однако гAAV можно получить с использованием любого подходящего метода (*например*, с применением рекомбинантных генов гер и сар). В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе гAAV продуцируется в клетках HEK293 (эмбриональная почка человека).

Фармацевтические композиции

[0168] В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагаются фармацевтические композиции, содержащие выделенную нуклеиновую кислоту или гAAV, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый» относится к материалу, такому как носитель или разбавитель, который не отменяет биологической активности или свойств соединения и является относительно нетоксичным, *например*, материал может вводиться в организм индивидуума, не вызывая при этом нежелательных биологических эффектов или не взаимодействуя вредным образом с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

[0169] В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, стабилизатор, диспергирующий агент, суспендирующий агент, разбавитель, вспомогательное вещество, загуститель, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующие в переносе или транспортировке соединения, пригодного в контексте настоящего изобретения, внутрь организма или к пациенту, так что он может выполнять свою предполагаемую функцию. Дополнительные ингредиенты, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, применяемые в практике настоящего изобретения, известны в данной области техники и описаны, например, в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA), которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0170] Композиции (*например*, фармацевтические композиции), предлагаемые в настоящем изобретении, можно вводить любым путем, включая энтеральный (*например*, пероральный), парентеральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, подкожный, внутрижелудочковый, трансдермальный, межкожный, ректальный, интравагинальный, внутрибрюшинный, местный (например, в виде порошков, мазей, кремов и/или капель), мукозальный, назальный, букальный, сублингвальный путь; путем интратрахеальной инстилляцией, бронхиальной инстилляцией и/или ингаляцией; и/или в виде спрея для полости рта, спрея для носа и/или аэрозоля. Конкретно предполагаемыми путями являются пероральное введение, внутривенное введение (*например*, системная внутривенная инъекция), региональное введение через кровь и/или лимфу и/или прямое введение в пораженный участок. Как правило, наиболее подходящий способ введения будет зависеть от множества факторов, включая природу агента

(например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или состояние субъекта (например, от того, может ли субъект перорально принимать препарат). В определенных вариантах осуществления соединение или фармацевтическая композиция, описанные в настоящем документе, пригодны для местного введения в глаз субъекта.

[0171] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается готовый лекарственный продукт PR006A, содержащий гAAV PR006A, описанный выше, представленный в форме водного раствора. В некоторых вариантах осуществления буфер конечного состава содержит около 20 мМ Трис, pH 8,0, около 1 мМ MgCl₂, около 200 мМ NaCl и около 0,001% полоксамера 188 (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления готовый лекарственный продукт и буфер конечного состава являются пригодными для инъекции в мозжечково-мозговую цистерну (ICM).

Способы

[0172] Аспекты настоящего изобретения относятся к композициям для экспрессии одного или большего количества генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта, который лечится от заболеваний с поражением ЦНС. Один или большее количество генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, могут кодироваться одной или большим количеством выделенных нуклеиновых кислот или векторов гAAV. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят один вектор (например, выделенную нуклеиновую кислоту, гAAV и т.д.) кодирующий один или большее количество (1, 2, 3, 4, 5 или более) генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят множество (например, 2, 3, 4, 5 или более) векторов (например, выделенные нуклеиновые кислоты, гAAV и т.д.), при этом каждый вектор кодирует другой генный продукт, ассоциированный с заболеванием ЦНС.

[0173] Заболевание с поражением ЦНС, может представлять собой нейродегенеративное заболевание, синуклеинопатию, таупатию или лизосомальную болезнь накопления. Примеры нейродегенеративных заболеваний и ассоциированных с ними генов перечислены в Таблице 12.

[0174] Термин «синуклеинопатия» относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся накоплением альфа-синуклеина (генного продукта *SNCA*) у субъекта (например, по сравнению со здоровым субъектом, например, субъектом, не страдающим синуклеинопатией). Примеры синуклеинопатий и ассоциированных с ними генов перечислены в Таблице 13.

[0175] Термин «таупатия» относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся накоплением аномального тау-белка у субъекта (например, по сравнению со здоровым субъектом, не страдающим таупатией). Примеры таупатий и ассоциированных с ними генов перечислены в Таблице 14.

[0176] «Лизосомальная болезнь накопления» относится к заболеванию, характеризующемуся аномальным накоплением токсичных клеточных продуктов в лизосомах субъекта. Примеры лизосомальных болезней накопления и ассоциированных с ними генов перечислены в Таблице 15.

[0177] В контексте данного документа термины «лечить» или «воздействовать» относятся к (a) предотвращению или отсрочке начала заболевания ЦНС; (b) уменьшению тяжести заболевания ЦНС; (c) уменьшению или предотвращению развития симптомов, характерных для заболевания ЦНС; (d) и/или предотвращению ухудшения симптомов, характерных для заболевания ЦНС. Симптомы заболевания ЦНС могут включать, например, двигательную дисфункцию (например, дрожь, ригидность, замедленность движений, трудности с ходьбой, паралич), когнитивную дисфункцию (например, слабоумие, депрессию, беспокойство, психоз), проблемы с памятью, эмоциональную и поведенческую дисфункцию.

[0178] Настоящее изобретение частично основано на композициях для экспрессии комбинаций продуктов PD-ассоциированных генных продуктов у субъекта, которые действуют вместе (*например*, синергетически), для лечения болезни Паркинсона.

[0179] Соответственно, в некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой болезнью Паркинсона, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, или gAAV), как описано в данном документе.

[0180] Настоящее изобретение частично основано на композициях для экспрессии одного или большего количества генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта, для лечения болезни Гоше. В некоторых вариантах осуществления болезнь Гоше представляет собой нейропатическое заболевание Гоше, например, болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа. В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий болезнью Гоше, не имеет PD или не имеет симптомов PD.

[0181] Соответственно, в некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой нейропатической болезнью Гоше, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, или gAAV), как описано в данном документе.

[0182] Настоящее изобретение частично основано на композициях для экспрессии одного или большего количества генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта, для лечения болезни Альцгеймера или лобно-височной деменции (FTD). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет FTD и не имеет болезни Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет FTD с мутацией *GRN* (програнулин). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет FTD с мутацией *GRN*, и субъект является гетерозиготным по мутации *GRN* (*например*, патогенной мутации *GRN*). В некоторых вариантах осуществления мутация *GRN* представляет собой нулевую мутацию (*например*, нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания или мутации сайта сплайсинга, или полная или частичная (экзонная) делеция гена). В некоторых вариантах осуществления мутация *GRN* представляет собой патогенную мутацию с доказанным функциональным пагубным действием. В некоторых вариантах осуществления мутация *GRN* представляет собой патогенную миссенс-мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутация *GRN* внесена в базу данных Molgen FTD (molgen.ua.ac.be). В некоторых вариантах осуществления мутация *GRN* приводит к низкому уровню PGRN в плазме (<70 нг/мл) у субъекта.

[0183] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет FTD, FTD с мутацией *GRN*, FTD с мутацией *tau*, FTD с мутацией *C9orf72*, нейрональный цероидный липофуциноз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, кортикобазальную дегенерацию, болезнь двигательных нейронов или болезнь Гоше.

[0184] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет симптоматическую FTD (*например*, вариант FTD с нарушением поведения (bvFTD), FTD с первичной прогрессирующей афазией (PPA) и кортикобазальным синдромом или вариант с комбинацией синдромов).

[0185] Соответственно, в некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD с мутацией *GRN*, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, или gAAV), как описано в данном документе.

[0186] В некоторых вариантах осуществления субъекту, имеющему болезнь Альцгеймера или FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*), вводят гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), или его часть. В некоторых вариантах осуществления субъекту, имеющему болезнь Альцгеймера или FTD (*например* FTD с мутацией *GRN*) вводят гAAV, кодирующий PGRN, или его часть, при этом белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления белок PGRN содержит аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 67 или ее часть. В некоторых вариантах осуществления гAAV, кодирующий PGRN, содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

[0187] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую гAAV, кодирующий PGRN, для лечения FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*) вводят субъекту в дозе от около 1×10^{12} геномов вектора (vg) до около 1×10^{15} vg, или от около 1×10^{13} vg до около 7×10^{14} vg, или от около 1×10^{13} vg до около 5×10^{14} vg, или от около 2×10^{13} vg до около 2×10^{14} vg, или от около 3×10^{13} vg до около 2×10^{14} vg, или от около 3.5×10^{13} vg до около 1.4×10^{14} vg. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую гAAV, кодирующий PGRN, для лечения FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*) вводят субъекту в дозе около 2×10^{13} vg, около 3×10^{13} vg, около 4×10^{13} vg, около 5×10^{13} vg, около 6×10^{13} vg, около 7×10^{13} vg, около 8×10^{13} vg, около 9×10^{13} vg, около 1×10^{14} vg, или около 2×10^{14} vg.

[0188] В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*), при этом указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий PGRN, при этом указанную композицию вводят в дозе около 3.5×10^{13} геномов вектора (vg), около 7.0×10^{13} vg, или около 1.4×10^{14} vg.

[0189] В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*), при этом указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий PGRN, при этом указанную композицию вводят в дозе около 1×10^{14} геномов вектора (vg), около 2.0×10^{14} vg, или около 4.0×10^{14} vg.

[0190] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую гAAV, кодирующий PGRN, для лечения FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*) вводят субъекту в виде однократной дозы, и при этом композиция не вводится субъекту впоследствии.

[0191] В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая гAAV, доставляется путем однократной субокципитальной инъекции в мозжечково-мозговую цистерну. В некоторых вариантах осуществления инъекцию в большую цистерну выполняют под рентгенологическим контролем.

[0192] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения симптома у субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD с мутацией *GRN*, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующую последовательность функционального белка програнулина (PGRN), и при этом белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления симптомом FTD с мутацией *GRN* может быть изменение личности, нарушение исполнительной функции, расторможенность, апатия, медленное воспроизведение речи, неправильное использование грамматики, мультимодальная агнозия, семантическая афазия или нарушение понимания слов. В некоторых вариантах осуществления гAAV, кодирующий PGRN, содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

[0193] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ уменьшения накопления липофусцина в головном мозге субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD с мутацией *GRN*, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), и при этом белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ уменьшения накопления убиквитина в головном мозге субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD с мутацией *GRN*, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), и при этом белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ снижения экспрессии гена и/или экспрессии белка TNF α и/или CD68 в головном мозге субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD с мутацией *GRN*, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), и при этом белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ повышения созревания катепсина D в головном мозге субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD с мутацией *GRN*, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), и при этом белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ повышения уровня ядерного белка TDP-43 (ДНК-связывающий белок транскриптивного ответа 43 кДа) в головном мозге субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD с мутацией *GRN*, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), и при этом белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ снижения уровня легкой цепи нейрофиламента (NFL) в крови или СМЖ субъекта с имеющейся или подозреваемой FTD с мутацией *GRN*, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), и при этом белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления гAAV, кодирующий PGRN, содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

[0194] Субъектом обычно является млекопитающее, предпочтительно человек. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет от 1 месяца до 10 лет (например, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4, месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 14 месяцев, 15 месяцев, 16 месяцев, 17 месяцев, 18 месяцев, 19 месяцев, 20 месяцев, 21 месяц, 22 месяца, 23 месяца, 24 месяца, 3, года, 4 года, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет или любой возраст между ними). В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет от 2 лет до 20 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет от 30 лет до 100 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет более 55 лет.

[0195] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят непосредственно в ЦНС субъекта, например, путем прямой инъекции в головной и/или спинной мозг субъекта. Примеры способов

непосредственного введения в ЦНС включают, помимо прочего, внутримозговую инъекцию, внутрижелудочковую инъекцию, внутрицистермальную инъекцию, интрапаренхимальную инъекцию, интратекальную инъекцию и любую комбинацию вышеперечисленных введений. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту путем инъекции внутрь большой цистерны (ICM). В некоторых вариантах осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта приводит к экспрессии трансгена (*например*, экспрессии первого генного продукта, второго генного продукта и, если применимо, третьего генного продукта) в среднем мозге, полосатом теле и/или коре головного мозга субъекта. В некоторых вариантах осуществления прямая инъекция в ЦНС приводит к экспрессии трансгена (*например*, экспрессии первого генного продукта, второго генного продукта и, если применимо, третьего генного продукта) в спинном мозге и/или СМЖ субъекта.

[0196] В некоторых вариантах осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта включает конвекционную усовершенствованную доставку (CED). Конвекционная усовершенствованная доставка представляет собой терапевтическую стратегию, которая включает хирургическое вмешательство в головной мозг и размещение катетера малого диаметра непосредственно в целевой области мозга с последующей инфузией терапевтического агента (*например*, композиции или гAAV, как описано в данном документе) напрямую в головной мозг субъекта. CED описывается, например, в публикации Debinski et al. (2009) *Expert Rev Neurother.* 9(10):1519-27.

[0197] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту периферически, например, путем периферической инъекции. Примеры периферической инъекции включают подкожную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутриартериальную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию или любую комбинацию из вышеперечисленных инъекций. В некоторых вариантах осуществления периферическая инъекция представляет собой внутриартериальную инъекцию, например, инъекцию в сонную артерию субъекта.

[0198] В некоторых вариантах осуществления композицию (*например*, композицию, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту или вектор или гAAV), как описано в данном документе, вводят как периферически, так и непосредственно в ЦНС субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления субъекту вводят композицию путем внутриартериальной инъекции (*например*, инъекции в сонную артерию) и путем интрапаренхимальной инъекции (*например*, интрапаренхимальной инъекции с помощью CED). В некоторых вариантах осуществления прямая инъекция в ЦНС и периферическая инъекция выполняются одновременно (*например*, в одно и то же время). В некоторых вариантах осуществления прямую инъекцию выполняют до периферической инъекции (*например*, в период времени от 1 минуты до 1 недели или более до периферической инъекции). В некоторых вариантах осуществления прямую инъекцию выполняют после периферической инъекции (*например*, в период времени от 1 минуты до 1 недели или более после периферической инъекции).

[0199] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят иммунодепрессант до введения композиции (*например*, в период времени от 1 месяца до 1 минуты до введения композиции) или одновременно с композицией, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант представляет собой кортикостероид (*например*, преднизон, будесонид и т.д.), ингибитор mTOR (*например*, сиролimus, эверолимус и т.д.), антитело (*например*, адалимумаб, этанерцепт, натализумаб и т.д.) или метотрексат.

[0200] Количество композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор или гAAV), как описано в данном документе, вводимого субъекту, будет варьироваться в зависимости от способа введения. Например, в некоторых вариантах осуществления гAAV, как описано в данном документе, вводят субъекту с титром от около 10^9 копий генома (GC)/кг до около 10^{14} GC/кг (*например*, около 10^9 GC/кг, около 10^{10} GC/кг, около 10^{11} GC/кг, около 10^{12} GC/кг, около 10^{12} GC/кг, или около 10^{14} GC/кг). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят высокий титр (*например*, $>10^{12}$ копий генома GC/кг гAAV) путем инъекции в пространство, где циркулирует СМЖ, или путем интрапаренхимальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления гAAV, как описано в данном документе, вводят субъекту в дозе от около 1×10^{10} геномов вектора (vg) до около 1×10^{17} vg путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления гAAV, как описано в данном документе, вводят субъекту в дозе от около 1×10^{10} vg до около 1×10^{16} vg путем инъекции в мозжечково-мозговую цистерну.

[0201] Композиция (*например*, композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в данном документе, может быть введена субъекту один или большее количество раз (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 или более) раз. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту непрерывно (*например*, в течение длительного периода), например, с помощью инфузионного насоса.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Векторы гAAV

[0202] Векторы AAV генерируют с применением клеток, таких как клетки HEK293, для тройной плазмидной трансфекции. Последовательности ITR фланкируют экспрессионную конструкцию, содержащую элемент промотора/энхансера для каждого представляющего интерес трансгена, 3' полиА-сигнал и посттрансляционные сигналы, такие как элемент WPRE. Множественные генные продукты можно экспрессировать одновременно, такие как *GBA1* и *LIMP2* и/или просапозин, путем слияния белковых последовательностей; или с применением пептидного линкера 2A, такого как T2A или P2A, что приводит к образованию 2 пептидных фрагментов с добавленными аминокислотами из-за предотвращения формирования пептидной связи; или с применением элемента IRES; или путем экспрессии с 2 отдельными экспрессионными кассетами. Присутствие короткой интронной последовательности, которая эффективно сплайсируется перед экспрессируемым геном, может повысить уровни экспрессии. shРНК и другие регуляторные РНК потенциально могут быть включены в эти последовательности. Примеры экспрессионных конструкций, описанных в данном документе, приведены на Фиг. 1-8, 21-35, 39, 41-51 и 64 и в Таблице 2 ниже.

Таблица 2

Название	Про мот ор 1	shРН К	CD S1	ПолиА 1	Бицис тронн ый элеме нт	Про мот ор 2	CD S2	По ли А2	Дл ин а ме жд у

									IT R
CMVe_CBAp_GBA1_WPRE_bGH	CB A		GB A1	WPRE -bGH					37 41
LT1s_JetLong_mRNAiaSyn_SCARB2, T2A, GBA1_bGH	JetL ong	aSyn	SC AR B2	bGH	T2A		GB A1		42 15
LI1_JetLong_SCARB2-IRES-GBA1_bGH	JetL ong		SC AR B2	bGH	IRES		GB A1		43 99
FP1_JetLong_GBA1_bGH_JetLong_SCA RB2_SV40L	JetL ong		GB A1	bGH		JetL ong	SC AR B2	SV 40 L	44 64
PrevailVector_LT2s_JetLong_mRNAiaSy n_PSAP, T2A, GBA1_bGH_4353nt	JetL ong	aSyn	PS AP	bGH	T2A	-	GB A1	-	43 53
PrevailVector_LI2_JetLong_PSAP_IRES_ GBA1_SymtheticpolyA_4337nt	JetL ong	-	PS AP	Синте тический pA	IRES	-	GB A1	-	43 37
PrevailVector_10s_JetLong_mRNAiaSy_ GBA2_WPRE_bGH_4308nt	JetL ong	aSyn	GB A2	WPRE _bGH	-	-	-	-	43 08
PrevailVector_FT4_JetLong_GBA1_T2A _GALC_SyntheticpolyA_4373nt	JetL ong	-	GB A1	Синте тический pA	T2A	-	GA LC	-	43 73
PrevailVector_LT4_JetLong_GALC_T2A _GBA1_SyntheticpolyA_4373nt	JetL ong	-	GA LC	Синте тический pA	T2A	-	GB A1	-	43 73
PrevailVector_LT5s_JetLong_mRNAiaSy n_CTSB, T2A, GBA1_WPRE_bGH_4392nt	JetL ong	aSyn	CT SB	WPRE _bGH	T2A	-	GB A1	-	43 92
PrevailVector_FT11t_JetLong_mRNAiaS yn_GBA1_T2S_SMPD1_SyntheticpolyA_ 4477nt	JetL ong	aSyn	GB A1	Синте тический pA	T2A	-	SM PD 1	-	44 77
PrevailVector_LI4_JetLong_GALC_IRES _GBA1_SymtheticpolyA_4820nt	JetL ong	-	GA LC	Синте тический pA	IRES	-	GB A1	-	48 20
PrevailVector_FP5_JetLong_GBA1_bGH _JetLong_CTSB_SV40L_4108nt	JetL ong	-	GB A1	bGH	-	JetL ong	CT SB	SV 40 L	41 08
PrevailVector_FT6s_JetLong_mRNAiaSy n_GBA1, T2A, GCH1_WPRE_bGH_4125nt	JetL ong	aSyn	GB A1	WPRE _bGH	T2A	-	GC H1	-	41 25

PrevailVector_LT7s_JetLong_mRNAiaSyn_RAB7L1, T2A, GBA1_WPRE_bGH_3984nt	JetLong	aSyn	RA B7 L1	WPRE _bGH	T2A	-	GB A1	-	39 84
PrevailVector_FI6s_JetLong_mRNAiaSyn_GBA1-IRES-GCH1_bGH_3978nt	JetLong	aSyn	GB A1	bGH	IRES	-	GC H1	-	39 78
PrevailVector_9st_JetLong_mRNAiaSyn_mRNAiTMEM106B_VPS35_WPRE_bGH_4182nt	JetLong	aSyn & TME M10 6B	VP S35	WPRE _bGH	-	-	-	-	41 82
PrevailVector_FT12s_JetLong_mRNAiaSyn_GBA1, T2A, IL34_WPRE_bGH_4104nt	JetLong	aSyn	GB A1	WPRE _bGH	T2A	-	IL3 4	-	41 04
PrevailVector_FI12s_JetLong_mRNAiaSyn_GBA1-IRES-IL34_bGH_3957nt	JetLong	aSyn	GB A1	bGH	IRES	-	IL3 4	-	39 57
PrevailVector_FP8_JetLong_GBA1_bGH_CD68_TREM2_SV401_4253nt	JetLong	-	GB A1	bGH	-	CD6 8	TR EM 2	SV 40 L	42 53
PrevailVector_FP12_CMVe_CBA_GBA1_bGH_JetLong_IL34_SV401_4503nt	CB A		GB A1	bGH		JetLong	IL3 4	SV 40 L	45 03

Пример 2: Клеточные анализы вирусной трансдукции в GBA-дефицитных клетках

[0203] Клетки с дефицитом *GBA1* получали, например, в виде фибробластов от пациентов с GD, моноцитов или клеток hES, или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациента (iPSC). Эти клетки накапливают субстраты, такие как глюкозилцерамид и глюкозилсфингозин (GlcCer и GlcSph). Обработка культивируемых клеточных линий дикого типа или мутантных клеточных линий ингибиторами Gказы, такими как CBE, также может применяться для получения GBA-дефицитных клеток.

[0204] Используя такие клеточные модели, лизосомальные дефекты количественно оценивают с точки зрения накопления белковых агрегатов, таких как α -синуклеин с антителом к этому белку или фосфо- α Syn, с последующей визуализацией с помощью флуоресцентной микроскопии. Также выполняют визуализацию лизосомальных аномалий с помощью ICC для белковых маркеров, таких как LAMP1, LAMP2, LIMP1, LIMP2, или с применением красителей, таких как LysoTracker, или посредством поглощения через эндоцитарный компартмент флуоресцентного декстрана или других маркеров. Также можно выполнить визуализацию накопления маркеров аутофагии из-за дефективного слияния с лизосомами, например, для LC3. Вестерн-блоттинг и/или ИФА применяют для количественной оценки аномального накопления этих маркеров. Кроме того, накопление гликолипидных субстратов и продуктов GBA1 измеряют с помощью стандартных подходов.

[0205] Терапевтические критерии (например, уменьшение патологического процесса, ассоциированного с PD) оценивают в контексте экспрессии трансдукции векторов AAV для подтверждения и количественной

оценки активности и функции. Сказу можно также количественно определить с помощью ИФА для белков или с помощью стандартных анализов активности Сказы.

Пример 3: Анализы *in vivo* с использованием мутантных мышей

[0206] В этом примере описываются анализы векторов AAV *in vivo* с использованием мутантных мышей. Исследования векторов AAV *in vivo*, как указано выше, на мутантных мышах проводят с помощью анализов, описанных, например, в публикациях Liou *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281(7): 4242–4253, Sun *et al.* (2005) *J. Lipid Res.* 46:2102–2113 и Farfel-Becker *et al.* (2011) *Dis. Model Mech.* 4(6):746–752.

[0207] Интратекальная или внутрижелудочковая доставка контрольных носителей и векторов AAV (например, в дозе 2×10^{11} vg/мышь) выполняется с применением концентрированных запасов AAV, например, в объеме инъекции 5–10 мкл. Осуществляют интрапаренхимальную конвекционную усовершенствованную доставку.

[0208] Лечение начинают либо до появления симптомов, либо после их появления. Измеряемыми критериями являются накопление субстрата в ЦНС и СМЖ, оценка накопления фермента Сказы с помощью ИФА и активности фермента, моторные и когнитивные функции, лизосомальная дисфункция и накопление мономеров α -синуклеина, протофибрилл или фибрилл.

Пример 4: Химические модели заболевания

[0209] В этом примере описываются анализы векторов AAV *in vivo* с использованием химически индуцированной мышинной модели болезни Гоше (например, мышинной модели СВЕ). Исследования этих векторов AAV *in vivo* выполняют на мышинной модели болезни Гоше, индуцированной химическим путем, например, как описано в публикации Vardi *et al.* (2016) *J Pathol.* 239(4):496-509.

[0210] Интратекальная или внутрижелудочковая доставка контрольных носителей и векторов AAV (например, в дозе 2×10^{11} vg/мышь) выполняется с применением концентрированных запасов AAV, например, в объеме инъекции 5–10 мкл. Осуществляют интрапаренхимальную конвекционную усовершенствованную доставку. Периферическая доставка достигается посредством инъекции в хвостовую вену.

[0211] Лечение начинают либо до появления симптомов, либо после их появления. Измеряемыми критериями являются накопление субстрата в ЦНС и СМЖ, оценка накопления фермента Сказы с помощью ИФА и активности фермента, моторные и когнитивные функции, лизосомальная дисфункция и накопление мономеров α -синуклеина, протофибрилл или фибрилл.

Пример 5: Клинические исследования с участием пациентов с PD, LBD и болезнью Гоше.

[0212] В некоторых вариантах осуществления пациенты, страдающие определенными формами болезни Гоше (например, GD1), имеют повышенный риск развития болезни Паркинсона (PD) или деменции с тельцами Леви (LBD). В этом примере описаны клинические исследования для оценки безопасности и эффективности гAAV, как описано в данном документе, у пациентов с болезнью Гоше, PD и/или LBD.

[0213] Клинические исследования таких векторов для лечения болезни Гоше, PD и/или LBD выполняются с применением дизайна исследования, аналогичного описанному в публикации Grabowski *et al.* (1995) *Ann. Intern. Med.* 122(1):33-39.

Пример 6: Лечение периферического заболевания

[0214] В некоторых вариантах осуществления у пациентов, страдающих определенными формами болезни Гоше, проявляются симптомы периферической невропатии, например, как описано в публикации Biegstraaten *et al.* (2010) *Brain* 133(10):2909–2919.

[0215] В этом примере описаны анализы *in vivo* векторов AAV, как описано в данном документе, для лечения периферической нейропатии, ассоциированной с болезнью Гоше (*например*, болезнью Гоше 1 типа). Вкратце, пациентам с болезнью Гоше 1 типа, у которых выявлены признаки или симптомы периферической нейропатии, вводят гAAV, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления периферические нейропатические признаки и симптомы у субъекта отслеживаются, например, посредством способов, описанных в публикации Biegstraaten *et al.*, после введения гAAV.

[0216] Уровни трансдуцированных генных продуктов, как описано в данном документе, присутствующих у пациентов (*например*, в сыворотке крови пациента, в периферической ткани (*например*, ткани печени, ткани селезенки и *т. д.*)) пациента, анализируют, например, с помощью Вестерн-блоттинга, ферментативных функциональных анализов или визуализационных исследований.

Пример 7: Лечение форм заболеваний с поражением ЦНС

[0217] В этом примере приведены анализы гAAV *in vivo*, как описано в данном документе, для лечения форм болезни Гоше с поражением ЦНС. Вкратце, пациентам с болезнью Гоше, идентифицированным как имеющим форму болезни Гоше с поражением ЦНС (*например*, болезнь Гоше 2 или 3 типа), вводят гAAV, как описано в данном документе. Уровни трансдуцированных генных продуктов, как описано в данном документе, присутствующих у ЦНС пациентов (*например*, в сыворотке ЦНС пациента, в спинномозговой жидкости (СМЖ) пациента или в ткани ЦНС пациента), анализируют, например, с помощью Вестерн-блоттинга, ферментативных функциональных анализов или визуализационных исследований.

Пример 8: Генная терапия болезни Паркинсона у субъектов, имеющих мутации в GBA1

[0218] В этом примере описывается введение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), кодирующего *GBA1*, субъекту, страдающему болезнью Паркинсона, характеризующейся мутацией в гене *GBA1*.

[0219] Вставка вектора гAAV-GBA1 содержит промоторный элемент СВА (СВА), состоящий из четырех частей: энхансера CMV (CMVe), промотора СВА (СВАр), экзона 1 и интрона (int) для постоянной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности (CDS) *GBA1* человека (тёмно-бордовый). 3' область также содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), за которым следует сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота (bGH полиА). Фланкирующие ITR позволяют правильно упаковывать вставочные последовательности. Оценивали два варианта 5' ITR-последовательности (Фиг. 7, вставка, нижняя последовательность); эти варианты имеют несколько нуклеотидных различий в пределах 20-нуклеотидной «D» области ITR, что, как полагают, влияет на эффективность упаковки и экспрессии. Продукт вектора гAAV-GBA1 содержит нуклеотидную последовательность домена «D», продемонстрированную на Фиг. 7 (вставка, верхняя последовательность) Вариант вектора содержит мутантный домен «D» (именуемый в данном документе «S» доменом, нуклеотидные изменения продемонстрированы заштрихованными), аналогично изученный в доклинических исследованиях. Каркас содержит ген, придающий устойчивость к канамицину, а также слейсерную

последовательность, предотвращающую обратную упаковку. Схема вектора гAAV-GBA1 приведена на Фиг. 8. Вектор гAAV-GBA1 упаковывают в гAAV с применением капсидных белков серотипа AAV9.

[0220] гAAV-GBA1 вводят субъекту в виде однократной дозы посредством субокципитальной инъекции под контролем рентгеноскопии в большую цистерну (введение в большую цистерну; ICM). Один из вариантов исследования схемы введения гAAV-GBA1 представляет собой следующее:

[0221] Однократную дозу гAAV-GBA1 вводят пациентам (N = 12) в одном из двух уровней доз (3×10^{13} vg (низкая доза); 1×10^{14} vg (высокая доза) и *т.д.*), которые определяются на основании результатов доклинического фармакологического и токсикологического исследований.

[0222] Первоначальные исследования были проведены на химической модели мыши, включающей ежедневную доставку кондуритол-*b*-эпоксида (CBE), ингибитора GСазы, для оценки эффективности и безопасности вектора гAAV-GBA1 и конструкции S-варианта гAAV-GBA1 (как описано далее ниже). Кроме того, первоначальные исследования были выполнены на генетической модели мышей, несущей гомозиготную мутацию *GBA1* и частично дефицитную по сапозинам (4L/PS-NA). Для дальнейшей оценки безопасности и эффективности вектора проводятся дополнительные исследования диапазона доз на мышах и приматах, не относящихся к человеку (NHP).

[0223] Две несколько отличающиеся версии 5'-инвертированного концевой повтора (ITR) в основной цепи AAV были протестированы для оценки возможности продуцирования и экспрессии трансгена (Фиг. 7). Считается, что домен «D» из 20 п.о. в 5' ITR из 145 п.о. необходим для оптимального продуцирования вирусного вектора, но также сообщалось, что мутации в домене «D» в некоторых случаях увеличивают экспрессию трансгена. Таким образом, в дополнение к вирусному вектору гAAV-GBA1, который содержит интактный домен «D», также оценивалась вторая форма вектора с мутантным доменом D (называемая в данном документе доменом «S»). Как гAAV-GBA1, так и вариант экспрессируют один и тот же трансген. Хотя оба вектора продуцировали вирус, который был эффективен *in vivo*, как подробно описано ниже, для дальнейшей разработки был выбран гAAV-GBA1, который содержит домен «D» дикого типа.

[0224] С целью создания CBE-модели дефицита GСазы, молодым мышам вводили CBE, специфический ингибитор GСазы. Мышам вводили CBE путем внутрибрюшинной инъекции ежедневно, начиная со Дня 8 после рождения (P8). Три различных дозы CBE (25 мг/кг, 37,5 мг/кг, 50 мг/кг) и PBS тестировали для создания модели, которая демонстрирует поведенческий фенотип (Фиг.9). Более высокие дозы CBE приводили к летальному исходу в зависимости от дозы. Все мыши, получавшие CBE в дозе 50 мг/кг, умерли до P23, а 5 из 8 мышей, получавших CBE в дозе 37,5 мг/кг, умерли до P27. У мышей, получавших CBE в дозе 25 мг/кг, летальности не наблюдалось. В то время как мыши, которым вводили CBE, не демонстрировали общих двигательных нарушений в анализе открытого поля (перемещаясь на такое же расстояние и с той же скоростью, что и мыши, получавшие PBS), мыши, получавшие CBE, демонстрировали дефицит моторной координации и баланса, что измеряли с помощью теста на вращающемся барабане.

[0225] Мышей, выживших до конца исследования, умерщвляли на следующий день после получения ими последней дозы CBE (P27, «День 1») или через три дня после отмены CBE (P29, «День 3»). Анализ липидов выполняли на коре головного мозга мышей, получавших 25 мг/кг CBE, для оценки накопления субстратов GСазы в кортах как в День 1, так и в День 3. Уровни GluSph и GalSph (измеренные в совокупности в этом примере) значительно накапливались у мышей, получавших CBE, по сравнению с контрольными животными, получавшими PBS, что согласуется с недостаточностью GСазы.

[0226] На основании исследования, описанного выше, была выбрана доза СВЕ 25 мг/кг, поскольку она вызывала поведенческие нарушения, не влияя на выживаемость. Для достижения широкого распределения GBA1 в головном мозге и экспрессии трансгена во время введения СВЕ, гAAV-GBA1 или вспомогательное вещество вводили посредством интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции в постнатальный день 3 (P3) с последующим ежедневным внутривентрикулярным введением СВЕ или введением PBS, начатым на P8 (Фиг. 10).

[0227] Мыши, получавшие СВЕ, и которым вводили гAAV-GBA1, продемонстрировали статистически значимо лучшие результаты на вращающемся барабане, чем мыши, которым вводили вспомогательное вещество (Фиг. 11). Мыши в группе, получавшей вариант лечения, не отличались от мышей, получавших вспомогательное вещество, в контексте других поведенческих показателей, таких как общее расстояние, пройденное во время тестирования (Фиг. 11).

[0228] По завершении исследования половину выживших мышей умерщвляли на следующий день после последней дозы СВЕ (P36, «День 1») или по истечению трех дней после отмены СВЕ (P38, «День 3») для биохимического анализа (Фиг. 12). Используя флуориметрический анализ ферментов, проведенный в трех биологических повторностях, активность GCase оценивали в коре головного мозга. Активность GCase была повышена у мышей, которым вводили гAAV-GBA1, тогда как введение СВЕ снижало активность GCase. Кроме того, мыши, которые получали как СВЕ, так и гAAV-GBA1, имели уровни активности GCase, которые были аналогичны группе, получавшей PBS, что указывает на то, что доставка гAAV-GBA1 способна преодолеть ингибирование активности GCase, вызванное введением СВЕ. Липидный анализ проводили на моторной коре головного мозга мышей для изучения уровней субстратов GluCer и GluSph. Оба липида накапливались в головном мозге мышей, получавших СВЕ, и введение гAAV-GBA1 значительно снижало накопление субстрата.

[0229] Уровни липидов отрицательно коррелировали как с активностью GCase, так и с успешным выполнением теста на вращающемся барабане во всех группах лечения. Повышенная активность GCase после введения гAAV-GBA1 ассоциировалась с уменьшением субстрата и усилением двигательной функции (Фиг. 13). Как продемонстрировано на Фиг. 14, предварительное биораспределение оценивали по присутствию генома вектора, измеренному с помощью qPCR ($c > 100$ геномов вектора на 1 мкг геномной ДНК, определенных как положительные). Мыши, которые получали гAAV-GBA1, как с СВЕ, так и без него, были положительными относительно геномов вектора гAAV-GBA1 в коре головного мозга, что указывает на то, что ICV доставка приводит к доставке гAAV-GBA1 в кору. Кроме того, геномы вектора были обнаружены в печени, в некоторых случаях - в селезенке и не были обнаружены в сердце, почках или гонадах. По всем показателям не было статистически значимой разницы между группами День 1 и День 3.

[0230] В более крупном исследовании модели СВЕ дополнительно изучались эффективные дозы гAAV-GBA1 в модели СВЕ. Используя модель дозы СВЕ 25 мг/кг, вспомогательное вещество или гAAV-GBA1 доставляли посредством ICV в P3, а ежедневное IP введение PBS или СВЕ начинали на P8. Учитывая сходство между группами с отменой СВЕ и без отмены СВЕ, наблюдаемое в предыдущих исследованиях, всех мышей умерщвляли через день после последней дозы СВЕ (P38-40). Оценивали эффект трех различных доз гAAV-GBA1, в результате чего были получены следующие пять групп по 10 мышей (5M/5F) в каждой:

Вспомогательное вещество ICV + PBS IP

Вспомогательное вещество ICV + 25 мг/кг СВЕ IP

3,2e9 vg (2,13e10 vg/г головного мозга) гAAV-GBA1 ICV + 25 мг/кг СВЕ IP

1,0e10 vg (6,67e10 vg/г головного мозга) гAAV-GBA1 ICV + 25 мг/кг СВЕ IP

3,2e10 vg (2,13e11 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV + 25 мг/кг СВЕ IP

[0231] Самая высокая доза rAAV-GBA1 избавляла от связанной с лечением СВЕ неспособности набрать вес на P37. Кроме того, эта доза приводила к статистически значимому повышению показателей результативности теста на вращающемся барабане и теста на сужающейся балке по сравнению с группой, получавшей вспомогательное вещество + СВЕ (Фиг. 15). Летальность наблюдалась в нескольких группах, в том числе в группах, получавших как вспомогательное вещество, так и rAAV-GBA1 (вспомогательное вещество + PBS: 0; вспомогательное вещество + 25 мг/кг СВЕ: 1; 3,2e9 vg rAAV-GBA1+ 25 мг/кг СВЕ: 4; 1,0e10 vg rAAV-GBA1+ 25 мг/кг СВЕ: 0; 3,2e10 vg rAAV-GBA1+ 25 мг/кг СВЕ: 3).

[0232] По завершении исследования, всех выживших мышей умерщвляли для проведения биохимического анализа (Фиг. 16). Активность GCазы в коре головного мозга оценивали в трех биологических повторностях с помощью флуорометрического анализа. Мыши, получавшие СВЕ, продемонстрировали пониженную активность GCазы, тогда как мыши, получившие высокую дозу rAAV-GBA1, продемонстрировали статистически значимое повышение активности GCазы по сравнению с введением СВЕ. У мышей, получавших СВЕ, также наблюдалось накопление GluCer и GluSph, что нивелировалось введением высокой дозы rAAV-GBA1.

[0233] В дополнение к установленной химической модели СВЕ, rAAV-GBA1 также оценивали в генетической модели 4L/PS-NA, которая гомозиготна по мутации V394L GD в Gba1, а также частично дефицитна по сапозинам, которые влияют на локализацию и активность GCазы. Эти мыши демонстрируют дефицит двигательной силы, координации и равновесия, о чем свидетельствуют их результаты теста ходьбы по балке, теста удерживания на вращающемся барабане и теста подвешивания на шнуре. Обычно продолжительность жизни этих мышей составляет менее 22 недель. В первоначальном исследовании, 3 мкл вируса с максимальным титром были доставлены посредством ICV в P23, с конечной дозой 2,4–10 мкг (6,0–10 мкг/г головного мозга). Группами лечения были следующие (с 6 мышами на группу):

WT + вспомогательное вещество ICV

4L/PS-NA + вспомогательное вещество ICV

4L/PS-NA + 2,4e10 vg (6,0e10 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV

[0234] Двигательные характеристики оценивались с помощью теста ходьбы по балке через 4 недели после доставки rAAV-GBA1. Группа мутантных мышей, которым вводили rAAV-GBA1, продемонстрировала тенденцию к меньшему суммарному количеству соскальзываний и меньшему количеству соскальзываний на скорость по сравнению с мутантными мышами, получавшими вспомогательное вещество, восстанавливая двигательную функцию до уровней, близких к WT (Фиг. 17). Поскольку нарушения моторных фенотипов становятся более серьезными с возрастом этих мышей, их результативность в этом и других поведенческих тестах оценивается в более поздние моменты времени. По завершении исследования, при жизни у этих мышей оценивают уровни липидов, активность GCазы и биораспределение.

[0235] Дополнительные более низкие дозы rAAV-GBA1 в настоящее время тестируются с применением модели СВЕ, что соответствует 0,03x, 0,1x и 1x от предложенной высокой клинической дозы фазы 1. Каждая группа включает 10 мышей (5M/5F) на группу:

Вспомогательное вещество ICV

Вспомогательное вещество ICV + 25 мг/кг СВЕ IP

3,2e8 vg (2,13e9 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV + 25 мг/кг СВЕ IP
1,0e9 vg (6,67e9 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV + 25 мг/кг СВЕ IP
1,0e10 vg (6,67e10 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV + 25 мг/кг СВЕ IP

[0236] Помимо моторных фенотипов, в коре головного мозга оценивали уровни липидов и активность GСазы. Также проводили курс лечения и анализы.

[0237] Для оценки данных по эффективности и безопасности было начато более крупное исследование диапазона доз. Мышам 10 4L/PS-NA (5M/5F на группу) вводили 10 мкл rAAV-GBA1. Применяя аллометрический расчет веса головного мозга, дозы коррелируют с 0,15x, 1,5x, 4,4x и 14,5x от предложенной высокой клинической дозы фазы I. Группы инъекций состояли из:

WT + вспомогательное вещество ICV
4L/PS-NA + вспомогательное вещество ICV
4L/PS-NA + 4,3e9 vg (1,1e10 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV
4L/PS-NA + 4,3e10 vg (1,1e11 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV
4L/PS-NA + 1,3e11 vg (3,2e11 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV
4L/PS-NA + 4,3e11 vg (1,1e12 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV

Пример 9: Анализ *in vitro* векторов rAAV

[0238] Конструкции rAAV тестировали *in vitro* и *in vivo*. Фиг. 18 демонстрирует репрезентативные данные относительно экспрессии *in vitro* конструкций rAAV, кодирующих белок програнулин (PGRN). На левой панели приведена стандартная кривая ИФА-анализа програнулина (PGRN). На нижней панели приведена реакция «доза-ответ» экспрессии PGRN, измеренная с помощью ИФА-анализа в клеточных лизатах клеток НЕК293Т, трансдуцированных rAAV. MOI = множественность заражения (геномов вектора на клетку).

[0239] Пилотное исследование выполняли для оценки активности *in vitro* векторов rAAV, кодирующих просапозин (*PSAP*) и *SCARB2*, отдельно или в комбинации с *GBA1* и/или одной или большим количеством ингибирующих РНК. Также тестировали одну конструкцию, кодирующую PSAP и програнулин (PGRN). Протестированные векторы включают векторы, приведенные в Таблице 3. «Opt» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, оптимизированной по кодону для экспрессии в клетках млекопитающих (*например*, клетках человека). Фиг. 19 демонстрирует репрезентативные данные, указывающие на то, что трансфекция клеток НЕК293 каждой из конструкций приводила к сверхэкспрессии соответствующего генного продукта по сравнению с ложно трансфицированными клетками.

[0240] Пилотное исследование выполняли для оценки активности векторов rAAV, кодирующих TREM2, отдельно или в комбинации с одной или большим количеством ингибирующих РНК. Протестированные векторы включают векторы, приведенные в Таблице 3. «Opt» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, оптимизированной по кодону для экспрессии в клетках млекопитающих (*например*, клетках человека). Фиг. 36А-36В демонстрируют репрезентативные данные, указывающие на то, что трансфекция клеток НЕК293 каждой из конструкций приводила к сверхэкспрессии соответствующего генного продукта по сравнению с ложно трансфицированными клетками.

Таблица 3

ID	Промотор	Ингибирующая РНК	Промотор	Трансген
I00015	JL_интронный	SNCA	JetLong	Opt-PSAP_GBA1
I00039	-	-	JetLong	Opt-PSAP-GRN
I00046	-	-	CBA	Opt-PSAP
I00014	JetLong	SNCA	JetLong	Opt-SCARB2_GBA1
I00040			JL, CD68	opt-GBA1, TREM2

Пример 10: Тестирование конструкций SNCA и TMEM106B shРНК

НЕК293 клетки

[0241] В этом исследовании применяли линию клеток 293 эмбриональной почки человека (HEK293) (№ 85120602, Sigma-Aldrich). Клетки HEK293 поддерживали в культуральной среде (D-MEM [# 11995065, Thermo Fisher Scientific] с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки [FBS] [# 10082147, Thermo Fisher Scientific]), содержащей 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. (# 15140122, Thermo Fisher Scientific).

Плазмидная трансфекция

[0242] Плазмидную трансфекцию проводили с применением реагента для трансфекции Липофектамин 2000 (# 11668019, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки HEK293 (# 12022001, Sigma-Aldrich) высевали в культуральной среде без антибиотиков плотностью 3×10^5 клеток/мл. На следующий день плазмиду и реагент Липофектамин 2000 объединяли в растворе Opti-MEM (# 31985062, Thermo Fisher Scientific). Через 5 минут смеси добавляли в культуру HEK293. Через 72 часа клетки собирали для экстракции РНК или белка или подвергали визуализационному анализу. Для визуализационного анализа планшеты предварительно покрывали 0,01% раствором поли-L-лизина (P8920, Sigma-Aldrich) перед посевом клеток.

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной PCR в реальном времени (qRT-PCR)

[0243] Относительные уровни экспрессии генов определяли с помощью количественной PCR в реальном времени (qRT-PCR) с использованием набора Power SYBR Green Cells-to-CT (# 4402955, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Плазмиды-кандидаты временно трансфицировали в клетки HEK293, высеванные на 48-луночные планшеты ($7,5 \times 10^4$ клеток/луночку), с применением реагента для трансфекции Липофектамина 2000 (0,5 мкг плазмиды и 1,5 мкл реагента в 50 мкл раствора Opti-MEM). Через 72 часа из клеток экстрагировали РНК и использовали для обратной транскрипции для синтеза кДНК в соответствии с инструкциями производителя. Для количественного анализа PCR, 2 ~ 5 мкл продуктов кДНК амплифицировали в дубликатах с применением пар геноспецифичных праймеров (конечная концентрация 250 нМ) с Power SYBR Green PCR Master Mix (# 4367659, Thermo Fisher Scientific). Последовательности

праймеров для генов *SNCA*, *TMEM106B* и *GAPDH* были следующими: 5'- AAG AGG GTG TTC TCT ATG TAG GC -3' (SEQ ID NO: 71), 5'- GCT CCT CCA ACA TTT GTC ACT T -3' (SEQ ID NO: 72) для *SNCA*, 5'-ACA CAG TAC CTA CCG TTA TAG CA-3' (SEQ ID NO: 73), 5'-TGT TGT CAC AGT AAC TTG CAT CA-3' (SEQ ID NO: 74) для *TMEM106B*, и 5'- CTG GGC TAC ACT GAG CAC C -3' (SEQ ID NO: 75), 5'- AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG -3' (SEQ ID NO: 76) для *GAPDH*. Количественную PCR проводили в системе PCR в реальном времени QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific). Уровни экспрессии нормализовали посредством гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* и рассчитывали с помощью сравнительного CT-метода.

Анализ флуоресцентной визуализации

[0244] Репортерные плазмиды EGFP, которые содержат 3'-UTR гена *SNCA* человека, расположенные ниже кодирующей области EGFP, применяли для валидации нокдаун-плазмид *SNCA* и *TMEM106B*. Репортерные плазмиды EGFP и кандидатные нокдаун-плазмиды были одновременно трансфицировали в клетки HEK293, помещенные на покрытые поли-L-лизином 96-луночные планшеты ($3,0 \times 10^4$ клеток/луночку) с применением реагента для трансфекции Липофектамина 2000 (0,04 мкг репортерной плазмиды, 0,06 мкг нокдаун-плазмиды и 0,3 мкл реагента в 10 мкл раствора Opti-MEM). Через 72 часа, интенсивность флуоресценции сигнала EGFP измеряли при возбуждении 488 нм/эмиссии 512 нм с помощью мультимодального ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific). Клетки фиксировали 4% PFA при комнатной температуре в течение 10 минут и инкубировали с D-PBS, содержащим 40 мкг/мл 7-аминоактиномицина D (7-AAD), в течение 30 минут при комнатной температуре. После отмытки D-PBS, интенсивность флуоресценции сигнала 7-AAD измеряли при возбуждении 546 нм/эмиссии 647 нм с помощью ридера Varioskan для определения количества клеток. Нормализованный сигнал EGFP на уровне сигнала 7-AAD сравнивали с контрольными нокдаун-образцами.

Иммуоферментный анализ (ИФА)

[0245] α -Синуклеинрепортерные плазмиды, которые содержат 3'-UTR гена *SNCA* человека или гена *TMEM106B*, расположенного ниже кодирующей области *SNCA*, применяли для валидации нокдаун-плазмид на белковом уровне. Уровни белка α -синуклеина определяли с помощью ИФА (# KHB0061, Thermo Fisher Scientific) с применением лизатов, экстрагированных из клеток HEK293. Плазмиды-кандидаты временно трансфицировали в клетки HEK293, высеванные на 48-луночные планшеты ($7,5 \times 10^4$ клеток/луночку), с применением реагента для трансфекции Липофектамина 2000 (0,1 мкг репортерной плазмиды, 0,15 мкг нокдаун-плазмиды и 0,75 мкл реагента в 25 мкл раствора Opti-MEM). Через 72 часа клетки лизировали в буфере для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA) (# 89900, Thermo Fisher Scientific) с добавлением смеси ингибиторов протеазы (# P8340, Sigma-Aldrich) и обрабатывали ультразвуком в течение нескольких секунд. После инкубации на льду в течение 30 минут лизаты центрифугировали при $20000 \times g$ при $4^\circ C$ в течение 15 минут и собирали супернатант. Уровни белка были определяли количественно. Планшеты считывали на ридере для планшетов Varioskan при 450 нм, и концентрации рассчитывали с помощью программного обеспечения SoftMax Pro 5. Измеренные концентрации белка нормализовали к концентрации общего белка, определенной с помощью анализа с бичинхониновой кислотой (№ 23225, Thermo Fisher Scientific).

[0246] Фиг. 37 и Таблица 4 демонстрируют репрезентативные данные, указывающие на успешный сайлесинг *SNCA in vitro*, посредством анализа репортера GFP (вверху) и анализа α -Syn (внизу). Фиг. 38 и Таблица 5

демонстрируют репрезентативные данные, указывающие на успешный сайлесинг TMEM106B *in vitro* , посредством анализа репортера GFP (вверху) и анализа α -Syn (внизу).

Таблица 4

ID	Промотор	Нокдаун	Промотор	Сверхэкспрессия
I00007	CMV_интронный	SNCA_mi	CMV	opt-GBA1
I00008	H1	SNCA_sh	CMV	opt-GBA1
I00009	H1	SNCA_Pubsh4	CMV	opt-GBA1
I00014	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-SCARB2_GBA
I00015	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-PSAP_GBA
I00016	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-CTSB_GBA
I00019	JL_интронный	SNCA_TMEM_mi	JetLong	opt-VPS35
I00023	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-GBA1_IL34
I00024	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-GBA2
I00028	интронный	SNCA_Broadsh	CMV	opt-GBA1
I00029	интронный	SNCA_Pubsh4	CMV	opt-GBA1

Таблица 5

ID	Промотор	Нокдаун	Промотор	Сверхэкспрессия
I00010	H1	TMEM_Pubsh	CMV	opt-GRN
I00011	JL_интронный	TMEM_mi	JetLong	opt-GBA1_GRN
I00012	H1	TMEM_sh	CMV	opt-GRN
I00019	JL_интронный	SNCA_TMEM_mi	JetLong	opt-VPS35

Пример 11: Размещение последовательности ITR «D» и клеточная трансдукция

[0247] Исследовали влияние размещения последовательности ITR «D» на клеточную трансдукцию векторов гAAV. Клетки HEK293 трансдуцировали вирусами гAAV, кодирующими Gказу и имеющими 1) ITR дикого типа (например, последовательности «D» проксимальнее вставки трансгена и дистальнее конца ITR) или 2) ITR с последовательностью «D», расположенной «вне» вектора (например, последовательность «D», расположенная проксимальнее конца ITR и дистальнее вставки трансгена), как продемонстрировано на Фиг. 20. Неожиданно было обнаружено, что гAAV, имеющие последовательность «D», расположенную во «внешнем» положении, сохраняют способность эффективно упаковываться и трансдуцировать клетки (Фиг. 40).

Пример 12: Тестирование гAAV програнулина in vitro

[0248] Фиг. 39 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN. Програнулин сверхэкспрессировался в ЦНС грызунов, дефицитных по *GRN*, гетерозиготных или гомозиготных по делеции *GRN*, в результате введения вектора гAAV, кодирующего PGRN (например, кодон-оптимизированный PGRN), посредством либо интрапаренхимальной, либо интратекальной инъекции, например, в большую цистерну.

[0249] Мышам вводили инъекции в возрасте 2 или 6 месяцев и в возрасте до 6 или 12 месяцев и анализировали на предмет одного или большего количества следующих факторов: уровень экспрессии *GRN* на уровне РНК и белка, результаты поведенческих тестов (например, улучшение движения), анализы выживаемости (например, повышение выживаемости), микроглия и маркеры воспаления, глиоз, потеря нейронов, липофусциноз и/или восстановление накопления лизосомальных маркеров, таких как LAMP1. Анализы на мышях с дефицитом PGRN описаны, например, в публикациях Arrant et al. (2017) *Brain* 140: 1477-1465; Arrant et al. (2018) *J. Neuroscience* 38(9):2341–2358; и Amado et al. (2018) doi:<https://doi.org/10.1101/30869>; полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

Пример 13: Тестирование гAAV програнулина in vitro и in vivo

[0250] Анализы *in vitro* и *in vivo* выполняли для оценки эффектов конструкции гAAV (PR006 (также обозначаемой как PR006A); см. Фиг. 64), кодирующей белок програнулин (PGRN). PR006 содержит капсид, имеющий серотип AAV9.

Доклинические исследования in vitro

Экспрессия програнулина, полученного из PR006A, в клетках HEK293T

[0251] Была исследована способность PR006A индуцировать продукцию белка програнулина в клеточном контексте. Клетки HEK293T трансдуцировали PR006A в диапазоне множественности заражения (MOI) от $2,1 \times 10^5$ до $3,3 \times 10^6$ геномов вектора (vg)/клетку. Трансдукция PR006A приводила к устойчивому дозозависимому увеличению экспрессии и секреции белка програнулина в клеточную среду (Фиг. 60). Существенно более низкие уровни белка програнулина, отражающие экспрессию, производную от эндогенного гена *GRN* человека, были обнаружены в группе отрицательного контроля, получавшей только вспомогательное вещество (предполагаемый клинический носитель).

Эффективность в нейронах, производных от FTD-GRN iPSC

[0252] Выполнили анализ эффективности конструкции гAAV *in vitro* в культурах нейронов человека FTD-GRN (лобно-височная деменция с мутацией *GRN*). Клеточные линии были получены из Национального института неврологических нарушений и инсульта (NINDS) из репозитория клеток и данных человека (NHCDR): материалы ND50015 (FTD-GRN, MIL), ND50060 (FTD-GRN, R493X) и ND38555 (контроль, дикий тип) (см. Таблицу 6).

Таблица 6: Обобщенные характеристики клеточной линии iPSC

Клеточная линия	NINDS Клеточная линия ID #	Клинический диагноз FTD?	<i>GRN</i> мутация	Возраст	Пол	Исходная клетка / метод перепрограммирования
FTD-GRN #1	ND50015	Да	MIL	54	Ф	Фибробласты / эписомальные плазмиды
FTD-GRN #2	ND50060	В группе риска (брат или сестра поражены в 62 года)	R493X	60	М	Фибробласты / эписомальные плазмиды
Контроль	ND38555	Нет	н.д.	48	Ф	Фибробласты / ретровирусные плазмиды

[0253] Чтобы определить клеточную модель, которая будет патологически релевантной FTD-GRN, iPSC из каждой линии дифференцировали в нейрональные клетки по двухэтапному протоколу. На первом этапе, iPSC были дифференцированы в линии пролиферирующих нейрональных стволовых клеток (NSC), в которых отсутствовала экспрессия маркеров плюрипотентности (например, Oct4 и SSEA1), и повышалась экспрессия маркеров нейрональных стволовых клеток (например, SOX2, Nestin, SOX1 и PAX6), что определяется с помощью иммунофлуоресцентной маркировки.

[0254] Контрольные линии и линии FTD-GRN NSC высевали с одинаковой плотностью, и через 48 часов экспрессию програнулина измеряли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в клеточных лизатах (внутриклеточный програнулин) (Фиг. 52Е) и клеточной среде (секретируемый програнулин) (Фиг. 52А). Экспрессию програнулина нормализовали к общей концентрации белка для учета различий в количестве клеток ($n = 3$; среднее \pm SEM) Линии NSC с гетерозиготными мутациями *GRN* имели значительно более низкие уровни внутриклеточного и секретируемого програнулина по сравнению с контрольными NSC, при этом NSC FTD-GRN экспрессировали ~ 25-50% от уровней эндогенного програнулина. Это свидетельствует о том, что эта клеточная модель FTD-GRN воспроизводит клинический дефицит програнулина, наблюдаемый у пациентов с FTD-GRN, которые экспрессируют от одной трети до половины нормального уровня програнулина в плазме (Finch et al., *Brain* 132, 583-591 (2009); Ghidoni et al., *Neurology* 71, 1235-1239, (2008); Sleegers et al., *Ann Neurol* 65, 603-609 (2009)).

[0255] NSC из всех клеточных линий были дифференцированы в культуры нейронов. После установления того, что NSC, полученные из iPSC, демонстрируют пониженную экспрессию програнулина, линии были дифференцированы на нейроны для получения клинически репрезентативного типа клеток для доклинических исследований эффективности PR006A. NSC высевали в среду нейрональной дифференцировки, терминально дифференцировали в постмитотические нейроны в течение 7 дней, а затем оценивали на экспрессию нейрональных маркеров (т.е. MAP2, NeuN, Tau, Tuj1, NF-H) с помощью иммунофлуоресценции (Фиг. 52G). Как контрольные линии, так и линии NSC, полученные из iPSC FTD-GRN, эффективно дифференцировались в нейроны согласно этому протоколу.

[0256] Культуры нейронов, полученные из iPSC FTD-GRN, применяли для оценки эффективности PR006A *in vitro*. Нейроны FTD-GRN обрабатывали вспомогательным веществом или PR006A при MOI $2,7 \times 10^5$, $5,3 \times 10^5$, или $1,1 \times 10^6$ vg/клетку. Трансдукция PR006 приводит к устойчивой дозозависимой экспрессии секретируемого програнулина, что измеряли с помощью ИФА, во всех линиях клеток (Фиг. 52B). Обработанные вспомогательным веществом контрольные нейроны и нейроны FTD-GRN оценивали на предмет эндогенных уровней програнулина. Контрольные нейроны экспрессировали эндогенно секретируемый програнулин, в то время как секретируемый програнулин не обнаруживался в нейронах FTD-GRN (Фиг. 52B). Линейный регрессионный анализ подтвердил значительную корреляцию между дозой PR006A и уровнями програнулина в обеих клеточных линиях FTD-GRN ($p = 3,5 \times 10^{-13}$). Эти результаты демонстрируют, что введение PR006A приводит к повышенной секреции програнулина в нейрональной модели FTD-GRN.

[0257] Известно, что програнулин стимулирует созревание лизосомальной протеазы катепсина D (CTSD), потеря функции которой также связана с лизосомальными нарушениями накопления и нейродегенерацией. CTSD экспрессируется в виде неактивного полноразмерного протеина (proCTSD), который подвергается протеолитическому процессингу в ферментативно активную зрелую протеазу (matCTSD). Сообщается, что програнулин действует как молекулярный шаперон, который связывается с proCTSD, чтобы усилить его созревание в протеазу matCTSD. В культурах нейронов FTD-GRN, трансдукция PR006 сохраняла дефектное созревание катепсина D (Фиг. 52C). Контроль, нейроны FTD-GRN # 1 и FTD-GRN # 2 трансдуцировали PR006A или вспомогательным веществом. MOI, равный $5,3 \times 10^5$ PR006A, использовали для экспериментов по эффективности, поскольку она восстанавливала уровни програнулина, по меньшей мере, в 2 раза по сравнению с контрольными клетками (Фиг. 52B). Для оценки эффективности уровни экспрессии proCTSD и matCTSD измеряли в клеточных лизатах с помощью автоматизированной платформы Simple Western™ (Jess) (Фиг. 52C). Обработанные вспомогательным веществом нейроны FTD-GRN имели более низкое отношение matCTSD к proCTSD по сравнению с обработанными вспомогательным веществом контрольными нейронами; обработка PR006A значительно увеличивала соотношение в обеих нейрональных линиях FTD-GRN (Фиг. 52C). В контрольных нейронах соотношение matCTSD и proCTSD значительно не изменялось в результате обработки PR006A. Эти данные демонстрируют, что PR006A восстанавливает фенотип, связанный с лизосомальной функцией, в нейронах FTD-GRN.

[0258] В нормальных нейронах, белок TDP-43 (белок транскриптивного ответа, связывающий ДНК 43 кДа) локализован в ядре. В посмертном мозге пациентов с FTD-GRN наблюдается агрегация TDP-43 в цитоплазме нейронов, и ядерное накопление TDP-43 снижено. Нейроны FTD уменьшали ядерный TDP-43, что приводило к агрегации и токсичности в нейронах. Поскольку мыши *Grn* KO не полностью воспроизводят эту патологию TDP-43, нейроны, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), представляют

собой ценную модель FTD-GRN для изучения биологии TDP-43. Сообщалось о снижении накопления TDP-43 в ядре и повышенном накоплении нерастворимого TDP-43 в нейронах, происходящих от iPSC пациентов с FTD-GRN, по сравнению с контрольными нейронами, которые не несут мутацию *GRN*, как описано в публикации Valdez et al. (*Human Molecular Genetics* 26, 4861-4872 (2017)). Трансдукция PR006A нейронных культур из обеих линий носителей мутации FTD-GRN изменяла аномалии TDP-43, что привело к снижению нерастворимого TDP-43 (измерено с помощью платформы Simple Western™ (Jess) (Фиг. 52D)) и увеличению ядерной локализации TDP-43 (измерено с помощью иммунофлуоресценции (Фиг. 52F)).

[0259] Таким образом, что трансдукция PR006 восстанавливала дефектное созревание лизосомального фермента, катепсина D, и понижала проявления патологии аномального TDP-43 в нейронах FTD-GRN.

Доклинические исследования in vivo

Эффективность и биораспределение у зрелых мышей с нокаутом *Grn*

[0260] Эффективность PR006A *in vivo* и максимальную дозу PR006A оценивали на мышинной модели с нокаутом *Grn* (KO). В модели мышей *Grn* KO, использованной в этих исследованиях (B6(Cg)-*Grn*^{tm1.1Aidi/J} (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), экзоны 1-4 удалены из целевого гена програнулина (*Grn*) (Yin et al., *J Exp Med* 207, 117-128 (2010)). У этих животных имеет место полная потеря програнулина, проявляются зависимые от возраста фенотипы, включая лизосомальные изменения, накопление липофусцина в нейронах, накопление убиквитина, микроглиоз и нейровоспаление, и поэтому такие животные широко используются для моделирования FTD-GRN. Были предприняты все попытки устранить необъективность исследования; мышей распределили по группам лечения, которые были сбалансированы по полу и массе тела, а квалифицированный персонал провел заслепленную оценку экспериментальных критериев эффективности.

[0261] В первоначальных исследованиях PR006A вводили зрелым мышам *Grn* KO в дозе $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), что было наивысшей достижимой дозой на момент исследования из-за ограничений объема инъекции и физического титра партии вируса, использованной для исследования. Использовали зрелых мышей, поскольку многие из фенотипов, связанных с FTD-GRN, включая воспаление ЦНС и микроглиоз, развиваются в зависимости от возраста, причем наиболее выраженное проявление фенотипов происходит в возрасте от 12 до 24 месяцев.

[0262] В исследованиях на зрелых мышах *Grn* KO, PR006A вводили путем однократной интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции. 10 мкл вспомогательного вещества (предполагаемый клинический носитель; 20 mM Трис pH 8,0, 200 mM NaCl и 1 mM MgCl₂ + 0,001% Плуороник F68) или $9,7 \times 10^{10}$ vg PR006A ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга [на основе мозга зрелой мыши вес 400 мг]) доставляли путем ICV-инъекции двум группам зрелых мышей *Grn* KO: (1) 16-месячного возраста на момент инъекции (n = 4/группу; PRV-2018-027; Фиг.61) и (2) 14-месячного возраста на момент инъекции (запланировано n = 3/группу; PRV-2019-002; Фиг.61). Через два месяца после инъекции животных умерщвляли.

[0263] В исследовании PRV-2018-027 однократную дозу PR006A вводили 16-месячным мышам в следующих группах лечения:

Модель	ICV	ICV доза	N
--------	-----	----------	---

<i>Grn</i> KO	Вспомогательное вещество	н.д.	4(2M/2F)
<i>Grn</i> KO	PR006A	9,7 x 10 ¹⁰ vg (2,4 x 10 ¹¹ vg/г головного мозга)	5(3M/2F)

[0264] Из-за непредвиденных отклонений в исследовании (ошибки генотипирования и преждевременная потеря животных) в исследование PRV-2019-002 (14-месячная когорта) была включена только 1 мышь в группе, получавшей вспомогательное вещество, вместо запланированных $n = 3$. Небольшое количество выборок сделало невозможным статистический анализ, и поэтому это исследование исключено из дальнейшего обсуждения. Однако результаты этого исследования были сопоставимы с результатами исследования PRV-2018-027.

[0265] Биораспределение и экспрессия програнулина: Биораспределение определяли путем измерения наличия генома вектора с помощью анализа qPCR, который соответствует действующим стандартам Центра оценки и исследования биологических препаратов Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (CBER)/Управления по исследованию тканей и передовых методов лечения (OTAT) для чувствительности ПЦР ($c > 50$ геномов вектора на 1 мкг геномной ДНК, определяемой как положительная). Все мыши, получившие PR006A, были положительными относительно геномов вектора в коре головного мозга и спинном мозге, что указывает на то, что ICV введение с успехом приводило к трансдукции PR006A в головном мозге и ЦНС (Фиг. 59A). ICV введение PR006A способствовало образованию значительных уровней человеческого белка програнулина в ЦНС (головной, спинной мозг) мышей *Grn* KO, тогда как, как и ожидалось, програнулин человека не обнаруживался у мышей, получавших вспомогательное вещество (Фиг. 59B). Поскольку програнулин в первую очередь является секретлируемым белком, экспрессию в СМЖ можно рассматривать как суррогат продукции белка в головном мозге, что представляет собой потенциальную трансляционную конечную точку для пациентов с FTD-GRN, у которых снижены уровни програнулина в СМЖ. Нам удалось обнаружить програнулин человека в СМЖ мышей, получавших PR006A, но из-за небольшого объема образцов и технических ограничений получения достаточного объема СМЖ у мышей измерения уровня програнулина в СМЖ были ниже нижнего предела количественного определения (LLOQ) анализа (Фиг. 59C).

[0266] ICV введение также приводило к широкому распространению генома вектора и уровням белка програнулина в периферических тканях, включая печень, сердце, легкие, почки, селезенку и гонады (Фиг. 62A - Фиг. 62B). Кроме того, в плазме мышей *Grn* KO, получавших PR006A, были обнаружены значительные уровни програнулина человека. Как и ожидалось, програнулин человека не обнаруживался у мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное вещество.

[0267] Накопление липофусцина: Накопление нейронального липофусцина, электронно-плотного, автофлуоресцентного материала, который постепенно накапливается в лизосомах постмитотических клеток и является индикатором лизосомальной дисфункции, является отличительным признаком зависимого от возраста фенотипа мышей *Grn* KO. Накопление липофусцина оценивали с помощью двух независимых методов в смежных срезах головного мозга: (1) при более клиническом подходе накопление липофусцина в головном мозге оценивал «заслепленный» патоморфолог по шкале от 0 (липофусцин не наблюдался) до 4 (широко распространенное накопление липофусцина) и (2) при более количественном подходе

аутофлуоресценцию липофусцина обнаруживали иммуногистохимическим методом (ИГХ) и автоматически определяли количественно. В мышей *Grn* KO определялся значительный липофусциноз во всем головном мозге, а ICV-введение PR006A снижало балл оценки накопления липофусцина в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе (Фиг. 59D). Количественное определение накопления липофусцина по изображениям ИГХ также выявляло снижение липофусциноза при введении PR006A во всех трех областях головного мозга. Поскольку убиквитин-положительные включения являются определяющим патологическим признаком у пациентов с FTD-GRN, которые также накапливаются в мышинной модели *Grn* KO, в способ, зависимый от возраста; ИГХ выполняли и количественно оценивали в областях головного мозга, представляющих интерес (кора головного мозга, гиппокамп, таламус) для оценки накопления убиквитина. Введение PR006A значительно снижало накопление убиквитина у мышей *Grn* KO (Фиг. 59E). Эти данные свидетельствуют о том, что PR006A ослабляет лизосомальную дисфункцию в модели FTD-GRN на мышцах *Grn* KO.

[0268] Нейровоспаление: Хроническое воспаление ЦНС является патологической характеристикой головного мозга пациентов с FTD-GRN, которая повторяется у мышей *Grn* KO в способ, зависимый от возраста; . Програнулин оказывает противовоспалительное действие на мышинных моделях FTD-GRN, а потеря програнулина приводит к усилению регуляции провоспалительных цитокинов, включая TNF α . В этом исследовании, введение PR006A подавляло уровни воспалительных маркеров у зрелых мышей *Grn* KO. ICV-введение PR006A снижало экспрессию гена провоспалительного цитокина *Tnf* (TNF α) и *Cd68* (CD68), маркера микроглии, в коре головного мозга (Фиг. 59F). Уровни белка TNF α также снижались в образцах коры головного мозга мышей *Grn* KO, получавших PR006A, что оценивали с помощью анализа провоспалительных цитокинов у мышей Mesoscale Discovery (Фиг. 59G). Для дальнейшей оценки нейровоспаления проводили иммуногистохимический анализ (ИГХ) для Iba1, маркера микроглиоза, и GFAP, маркера астроцитоза, и количественно определяли в областях мозга, представляющих интерес (кора головного мозга, гиппокамп, таламус). Введение PR006A приводило к тенденции к уменьшению микроглиоза (Iba1), но не влияло на астроцитоз (GFAP) у мышей *Grn* KO (Фиг. 59H; Фиг. 59I). Взятые вместе, эти результаты демонстрируют, что лечение PR006A уменьшает нейровоспаление в модели FTD-GRN у зрелых мышей *Grn* KO.

[0269] Гистопатология: детальный гистопатологический анализ окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) головного мозга, грудного отдела спинного мозга, печени, сердца, селезенки, легких и почек всех мышей, проводимый «заслепленным» сертифицированным патоморфологом, не выявил нежелательных эффектов, связанных с применением PR006A. Введение PR006A мышам *Grn* KO приводило к снижению частоты и/или балла степени тяжести явления, которые характерны для модели, включая снижение частоты и/или бала степени тяжести нейронального некроза в мозговом веществе и мосту. Кроме того, при лечении PR006A наблюдалось снижение как частоты, так и тяжести дегенерации аксонов в грудном отделе спинного мозга. Эти результаты подробно обсуждаются в разделе «Токсикология» ниже.

[0270] Заключение: ICV-введение PR006A в дозе $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) обуславливало широкое распространение генома вектора во всем головном мозге и периферических тканях у зрелых мышей *Grn* KO. Введение PR006A увеличивало общую экспрессию програнулина. Кроме того, PR006A снижает накопление липофусцина и убиквитина в головном мозге – патологических состояний, которые, как известно, возникают как в мышинной модели *Grn* KO, так и у пациентов с FTD-GRN. PR006A также снижает экспрессию провоспалительных цитокинов и активацию иммунных клеток в коре головного мозга, которые представляют собой фенотипы, указывающие на хроническое воспаление ЦНС.

Эффективность варьирования доз у взрослых мышей с нокаутом Grn

[0271] Для дальнейшей оценки эффективных доз PR006A было проведено более крупное исследование диапазона доз на взрослых мышах *Grn* KO. В PRV-2019-004, 10 мкл вспомогательного вещества (предполагаемый клинический носитель; 20 mM Трис pH 8,0, 200 mM NaCl и 1 mM MgCl₂ + 0,001% Плуороник F68) или PR006A вводили 4-месячным животным посредством ICV. Этим взрослым мышам использовали вместо зрелых мышей *Grn* KO, поскольку последних не было в наличии в достаточном количестве для проведения исследования диапазона доз. Хотя взрослые мыши *Grn* KO имеют более мягкий фенотип, чем зрелые мыши, они все же демонстрируют лизосомальные дефекты и нейровоспалительные изменения и, следовательно, подходят для оценки диапазона эффективных доз PR006A. Чтобы оценить эффективность PR006A в широком диапазоне вирусных доз, PR006A вводили в дозе 1,1 x 10¹¹ vg (2,7 x 10¹¹ vg/г головного мозга), наивысшей достижимой дозы на момент исследования из-за ограничений объема инъекции и физического титра партии вируса, использованной для исследования, в средней дозе 1,1 x 10¹⁰ vg (2,7 x 10¹⁰ vg/г головного мозга) или в низкой дозе 1,1 x 10⁹ vg (2,7 x 10⁹ vg/г головного мозга), с полной разницей в логарифмической шкале с охватом каждой дозы. Детали экспериментальной схемы представлены на Фиг. 63.

[0272] Оценивали три дозы PR006A по 10 мышам (4M/6F) на группу:

Модель	ICV	ICV доза	N
<i>Grn</i> KO	Вспомогательное вещество	н.д.	10(4M/6F)
<i>Grn</i> KO	PR006A	1,1 x 10 ⁹ vg (2,7 x 10 ⁹ vg/г головного мозга)	10(4M/6F)
<i>Grn</i> KO	PR006A	1,1 x 10 ¹⁰ vg (2,7 x 10 ¹⁰ vg/г головного мозга)	10(4M/6F)
<i>Grn</i> KO	PR006A	1,1 x 10 ¹¹ vg (2,7 x 10 ¹¹ vg/г головного мозга)	10(4M/6F)

[0273] Соответствующие по возрасту мыши той же исходной линии, что и мыши *Grn* KO с аллелями *Grn* дикого типа (WT) (мыши 7-месячного возраста C57BL/6J), служили контролем для выбранных критериев эффективности в этом исследовании.

Модель	ICV	ICV доза	N
WT (C57BL/6J)	н.д.	н.д.	10(5M/5F)

[0274] Биораспределение и экспрессия програнулина: Биораспределение определяли путем измерения наличия генома вектора с помощью анализа qPCR, который соответствует действующим стандартам СВЕР/ОТАТ Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для чувствительности ПЦР (с > 50 геномов вектора на 1 мкг геномной ДНК, определяемой как положительная). Мыши, получившие PR006A, были положительными по геномам вектора в коре головного мозга и спинном мозге в зависимости от дозы, что указывает на то, что ICV введение приводит к успешной трансдукции PR006A в ЦНС (Фиг. 53A). qRT-PCR-анализ PR006A-кодируемого *GRN* продемонстрировал, что ICV-

введение доз PR006A приводит к дозозависимой индукции экспрессии мРНК *GRN* человека в коре головного мозга (Фиг. 53B). Введение PR006A увеличивало уровни белка програнулина человека в головном и спинном мозге (Фиг. 53C). В ткани головного мозга уровни програнулина человека были обнаружены и количественно определены при наивысшей дозе PR006A; при более низких дозах уровни програнулина были ниже предела обнаружения из-за сильного фона в головном мозге. Однако, исходя из логарифмической разницы между дозами, пропорциональная оценка ожидаемых уровней програнулина при более низких дозах будет значительно ниже нижнего предела количественного определения (LLOQ) анализа в ткани головного мозга. Уровень эндогенного мышинного програнулина измеряли у мышей того же возраста и линии с аллелями *Grn* дикого типа (WT); как в коре головного мозга, так и в спинном мозге уровни человеческого програнулина у мышей *Grn* KO, получавших PR006A, не превышали уровень эндогенного програнулина у мышей WT при любой дозе. Поскольку для измерения програнулина человека и мыши применялись различные методы обнаружения, в которых использовали невидовые перекрестно-реактивные антитела против програнулина, не было возможности сравнивать абсолютные числа с надлежащей точностью.

[0275] PR006A введение также приводило к широкому распространению генома вектора и уровням белка програнулина в периферических тканях, включая печень, сердце, легкие, почки, селезенку и гонады (Фиг. 53D; Фиг. 53E).

[0276] В плазме у мышей *Grn* KO, получавших PR006A, были обнаружены значительные уровни програнулина человека при всех уровнях доз (Фиг. 53F). Как и ожидалось, програнулин человека не обнаруживался у мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное вещество. Уровни програнулина человека у животных, получавших среднюю дозу PR006A, находились в том же диапазоне, что и уровни програнулина мыши, измеренные у мышей с аллелями WT *Grn*. Поскольку для измерения програнулина человека и мыши применяли различные методы обнаружения, в которых использовались невидовые перекрестно-реактивные антитела против програнулина, не было возможности сравнивать абсолютные числа с надлежащей точностью.

[0277] Накопление липофусцина: Накопление липофусцина оценивали с помощью двух независимых методов в смежных срезах головного мозга: (1) при более клиническом подходе накопление липофусцина в головном мозге оценивал «заслепленный» патоморфолог по шкале от 0 (липофусцин не наблюдался) до 4 (широко распространенное накопление липофусцина) и (2) при более количественном подходе аутофлуоресценцию липофусцина обнаруживали посредством ИГХ и автоматически определяли количественно. У мышей *Grn* KO обнаруживали липофусциноз во всех областях головного мозга, тогда как у мышей WT обнаруживаемого липофусцина в головном мозге не было (Фиг. 53G). ICV-введение PR006A приводило к дозозависимому снижению балла внутриклеточного накопления липофусцина в головном мозге мышей *Grn* KO (Фиг. 53G). Эффективность PR006A в отношении снижения липофусциноза может быть наиболее легко оценена количественно в областях мозга, которые демонстрируют наиболее устойчивый фенотип липофусциноза в модели FTD-GRN на мышах *Grn* KO, включая гиппокамп и таламус. В дополнение к оценке липофусцина патоморфологом, посредством ИГХ, проведенной в исследуемых областях мозга (например, кора головного мозга, гиппокамп, таламус) для количественной оценки липофусциноза, выявили дозозависимое снижение количества накопления липофусцина в коре головного мозга и таламических областях мозга, со значительным снижением, происходящим при средних и высоких дозах PR006A. ИГХ-исследование также проводилось для оценки накопления убиквитина в головном мозге, дополнительной патологии, связанной с FTD-GRN, которая встречается у мышей *Grn* KO. По сравнению с мышами WT, мыши *Grn* KO демонстрировали увеличение накопления убиквитина во всех областях головного мозга (Фиг. 53H).

PR006A значительно уменьшал размер иммунореактивных объектов убиквитина до уровней, близких к WT, во всех трех дозах (Фиг. 53H).

[0278] Нейровоспаление: Введение PR006A подавляло уровни воспалительных маркеров в головном мозге взрослых мышей *Grn* KO. ICV-введение PR006A снижало экспрессию гена провоспалительного цитокина *Tnf* (TNF α) и *Cd68* (CD68), маркера микроглии, в коре головного мозга в диапазоне доз от $2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга до $2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга (Фиг. 53I). В соответствии с опубликованными данными, мы наблюдали увеличение экспрессии генов этих нейровоспалительных маркеров у мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное, по сравнению с мышами того же возраста с аллелями *Grn* дикого типа (Фиг. 53I). В отличие от наблюдений у 18-месячных мышей *Grn* KO из PRV-2018-027 и сообщений об аномалиях TNF α в литературе, не было значительного увеличения уровней белка TNF α в коре головного мозга у 7-месячных мышей *Grn* KO, получающих вспомогательное вещество; кроме того, не наблюдали значительных изменений с PR006A у мышей *Grn* KO. Эти данные согласуются с ранее опубликованными данными о том, что устойчивые нейровоспалительные фенотипы не встречаются в модели мышей *Grn* KO до достижения ими 12-24-месячного возраста. Для дополнительной оценки нейронального воспаления, путем окрашивания на Iba1, маркер микроглиоза, и GFAP, маркер астроцитоза, выполняли иммуногистохимический анализ (ИГХ) и проводили количественную оценку в областях мозга, представляющих интерес (кора головного мозга, гиппокамп и таламус). Наблюдалось значительное увеличение микроглиоза (Iba1) и астроцитоза (GFAP) во всех областях мозга у мышей *Grn* KO по сравнению с мышами WT (Фиг. 53J - Фиг. 53K). Введение PR006A значительно уменьшало микроглиоз (Iba1) при всех трех дозах (Фиг. 53J). Тенденция к снижению астроцитоза (GFAP) наблюдалась при средней дозе PR006A, а значительное снижение астроцитоза (GFAP) наблюдалось при высокой дозе PR006A в области таламуса в головном мозге (Фиг. 53K).

[0279] Хотя многие из фенотипов модели мышей *Grn* KO проявляются в позднем возрасте, проведенные исследования продемонстрировали, что у мышей *Grn* KO обнаруживают широко распространенные изменения экспрессии генов уже в возрасте 4 месяцев, включая изменения в лизосомальных и иммунных путях. Таким образом, в дополнение к целевому анализу qRT-PCR, описанному выше, применяли подход транскриптомики для оценки изменений уровней мРНК, которые могут быть оценены в глобальном масштабе с помощью чувствительных высокопроизводительных технологий (секвенирование РНК) и требуют минимального количества материала образца. Мы выполнили секвенирование РНК на коре головного мозга и применяли Анализ вариаций набора генов (Gene Set Variation Analysis, GSVA) (Hanzelmann et al., *BMC Bioinformatics* 14, 7 (2013)), чтобы определить, какие пути экспрессии генов изменены у 7-месячных мышей *Grn* KO, получавших вспомогательное вещество, по сравнению с мышами WT соответствующего возраста той же линии. Мы подтвердили дефицит лизосомальных и иммунных путей у мышей, лишенных *Grn*, как сообщалось в ранее опубликованных исследованиях. Сообщалось о значительных изменениях в подмножестве генов «Вакуоль» GO TERM (GO:0005773) (содержит 4 гена, которые, как сообщается, имеют нарушенную регуляцию у мышей *Grn* KO, что описано в публикации Lui et al (*Cell* 165, 921-935 (2016))), наборе «Лизосомальные гены» (подмножество 25 связанных с лизосомами генов, которые, как было продемонстрировано, имеют нарушенную регуляцию у мышей *Grn* KO, что описано в публикации Evers et al (*Cell Reports* 20, 2565-2574 (2017))), и наборе генов «Комплемент» из базы данных HALLMARK анализа обогащения набора генов (содержит гены, кодирующие компоненты системы комплемента, части врожденной иммунной системы). Затем мы измеряли и сравнивали уровни активности этих наборов генов при введении PR006A (Фиг. 53L - Фиг. 53N). Введение PR006A дозозависимо устраняло дефицит набора генов, наблюдаемый у мышей *Grn* KO.

[0280] Гистопатологический анализ: Детальный гистопатологический анализ, проведенный «заслепленным» сертифицированным патоморфологом, с окрашиванием гематоксилином и эозином (H&E) головного мозга, грудного отделов спинного мозга, печени, сердца, селезенки, легких, почек и гонад всех мышей, не обнаружил доказательств токсичности, связанной с применением PR006A. Подробности анализа токсичности представлены в разделе ниже.

[0281] Заключение: ICV-введение PR006A в дозе от $2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга до $2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга обуславливало широкое распространение генома вектора во всем головном мозге и периферических тканях дозозависимым образом. Введение PR006A также приводило к продукции мРНК и белка програнулина в ЦНС. Во многих областях мозга наблюдалась четкая зависимость «доза-ответ» между PR006A и снижением липофусциноза, показателем лизосомальной дисфункции. Устойчивое и статистически значимое уменьшение липофусциноза наблюдалось при средних и максимальных дозах PR006A. Все дозы PR006A снижали накопление убиквитина в головном мозге. Начиная с самой низкой дозы $2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга, PR006A снижал экспрессию провоспалительных маркеров в головном мозге на уровне РНК и белка.

Резюме: Доклинические исследования in vivo

[0282] PR006A эффективно трансдуцировал мышей *Grn* KO, что приводило к устойчивому дозозависимому биораспределению трансгена и продукции мРНК и белка програнулина в ЦНС. PR006A дозозависимо реверсировал аномалии экспрессии генов в лизосомальных и нейровоспалительных путях. PR006A уменьшал проявления многих фенотипов, которые встречаются в головном мозге этой модели мышей FTD-GRN, включая липофусциноз, накопление убиквитина и микроглиоз. В исследовании диапазона доз, самая низкая доза PR006A в $2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга значительно подавляла экспрессию воспалительных маркеров в коре головного мозга. Средняя доза PR006A, составляющая $2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга, снижала выраженность как лизосомаольных дефектов (например, липофусциноза), так и нейровоспаления, надежным и статистически значимым образом. Высокая доза PR006A, составляющая $2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга, дополнительно увеличивала экспрессию програнулина без каких-либо признаков токсичности.

Таблица 7: Сводные данные о биораспределении

Исследование	Доза	Кора головного мозга	Спинной мозг	Печень	Селезенка	Сердце	Почка	Легкие	Гонады
PRV-2018-027	$9,7 \times 10^{10}$ vg PR006A	+	+	+	+	+	+	+	+
PRV-2019-004	$1,1 \times 10^9$ vg PR006A	+	+	+	+	+	+	+	+
	$1,1 \times 10^{10}$ vg PR006A	+	+	+	+	+	+	+	+
	$1,1 \times 10^{11}$ vg PR006A	+	+	+	+	+	+	+	+

Положительное биораспределение определяется как > 50 vg/мкг геномной ДНК.

Фармакология безопасности

[0283] В ходе этих исследований не было выявлено нежелательных эффектов, которые можно было бы отнести к исследуемому препарату. Выводы по безопасности, полученные в результате прижизненного и гистопатологического анализов животных в PRV-2018-027, PRV-2019-002 и PRV-2019-004, обсуждаются в разделе ниже.

Токсичность однократной дозы

[0284] Была проведена серия доклинических исследований PR006A для изучения критериев безопасности на мышах и обезьянах. Три исследования были выполнены на мышинной модели *Grn* KO, при этом критерии безопасности включали невропатологические оценки и анализировали как защитную активность, так и потенциальную токсичность, возникающую в результате введения PR006A посредством интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции; ICM-введение у мышей осуществить технически сложнее. Эти мышинные модели являются репрезентативными для FTD-GRN, у которых пациенты имеют мутацию в гене *GRN*, приводящую к снижению уровней програнулина. У яванских макаков, в рамках пилотного исследования также проводили невропатологическую оценку, при этом PR006A вводили в большую цистерну (ICM). Исследование GLP проводили на яванских макаках, которым PR006A вводили в ICM, и умерщвляли обезьян на День 7, День 30 или День 183. Исследование GLP включало в себя исчерпывающий перечень клинических критериев в дополнение к оценке анатомической патологии полного перечня тканей. Для обоснования введения однократной дозы в клинике, проводили следующие исследования однократной дозы.

Максимальная доза PR006A в модели зрелых мышей FTD-GRN (PRV-2018-027 и PRV-2019-002)

[0285] В рамках этих исследований эффективности на мышах *Grn* KO, проводили невропатологические оценки на мышах, получавших либо вспомогательное вещество, либо PR006A, посредством ICV. У мышей *Grn* KO наблюдалась полная потеря програнулина, и такие мыши широко используются в качестве моделей FTD-GRN из-за их зависимых от возраста фенотипов, которые включают лизосомальные изменения, накопление липофусцина в нейронах, микроглиоз и нейровоспаление. Аспекты фармакологической части исследования приведены в разделах выше, тогда как токсикологические критерии, оцененные в этом исследовании, обобщены ниже. Два исследования PR006A были проведены на модели зрелых мышей *Grn* KO. В первом исследовании (PRV-2018-027), 9 мышей *Grn* KO разного пола в возрасте 16 месяцев получали посредством ICV либо PR006A, либо вспомогательное вещество. Животных умерщвляли через 9 недель после введения. В это исследование была включена группа с однократной дозой PR006A: 10 мкл неразбавленного вируса для общей дозы $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), а контрольная группа получала 10 мкл вспомогательного вещества.

Таблица 8: Дизайн исследования PRV-2018-027

Модель	Лечение	RoA (Объем дозы)	Доза PR006A (vg/г)	Всего PR006A Доза (vg)	Количес тво	Некроп сия после
--------	---------	---------------------	-----------------------	------------------------------	----------------	------------------------

			головного мозга)		мыш ей	лечени я
<i>Grn</i> KO	Вспомогат ельное вещество	ICV (10 мкл)	0	0	4(2M/2 F)	9 недел ь
<i>Grn</i> KO	PR006A	ICV (10 мкл)	$2,4 \times 10^{11}$	$9,7 \times 10^{10}$	5(3M/2 F)	9 недел ь

ROA: путь введения

[0286] В рамках этого протокола исследования оценивали достижения различных посмертных критериев, таких как биораспределение, лизосомальные изменения и маркеры воспаления (см. раздел выше). Дважды в день животных также проверяли на выживаемость, и один раз в день измеряли вес тела. После эвтаназии через 2 месяца после лечения собирали целевые ткани, капельно фиксировали в охлажденном 4% параформальдегиде и хранили при 4 °С. Ткани 8 животных, завершивших исследование, усекали, обрабатывали и заключали в парафиновые блоки. После этого делали срезы размером ~ 5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и микропрепараты направляли сертифицированному ветеринарному патоморфологу.

[0287] В ходе этого исследования, 1 мышь из экспериментальной группы умерла преждевременно; при некропсии не было зарегистрировано никаких отклонений от нормы у умершего животного, поэтому причина смерти неизвестна. Никаких других смертей или аномалий не наблюдалось. Все группы лечения одинаково отслеживались относительно массы тела животных, при этом существенных различий не выявлено.

[0288] При гистопатологическом исследовании неблагоприятных результатов, связанных с PR006A, не обнаружено. Накопление липофусцина в головном мозге соответствовало ожидаемым результатам у мышей *Grn* KO. У животных, получавших PR006A, наблюдалось снижение степени накопления липофусцина во всех областях головного мозга. Морфологические изменения также продемонстрировали небольшое снижение частоты и/или балла тяжести, особенно в отношении нейронального некроза в продолговатом мозге и мосту, при введении PR006A. Однако эти тенденции в морфологических изменениях не были такими последовательными, как при балльной оценке липофусцина.

[0289] В грудном отделе спинного мозга наблюдалась дегенерация аксонов и, очень редко (в 1 из 4 животных в каждой группе) наблюдался минимальный некроз нейронов. Также определялось незначительное снижение как частоты, так и тяжести дегенерации аксонов у животных, получавших PR006A.

[0290] Следующие результаты, которые предположительно были ассоциированы с гомозиготными нокаутными по *Grn* мышами, продемонстрировали снижение частоты и/или тяжести следующих явлений у животных, получавших PR006A: расширенные канальцы в мозговом веществе почки, гломеруллопатия в почках и инородный материал в легких (характеризующийся линейными, бесклеточными, темно-розовыми структурами, обычно в дыхательных путях и часто ассоциированными с гигантскими клетками инородного тела и/или макрофагами). Для вынесения более точных выводов потребуется большая когорта животных.

[0291] Все другие наблюдаемые гистопатологические данные считались случайными и/или имели сходную частоту и тяжесть у животных, получавших вспомогательное вещество и испытуемое вещество, и, следовательно, считались не связанными с введением PR006A.

[0292] Во втором исследовании (PRV-2019-002), 5 мышей *Grn* КО разного пола в возрасте 14 месяцев получали посредством ICV либо PR006A, либо вспомогательное вещество. Животных умерщвляли через 8 недель после введения. В это исследование была включена группа с однократной дозой PR006A: 10 мкл неразбавленного вируса для общей дозы $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), а контрольная группа получала 10 мкл вспомогательного вещества.

Таблица 9: Дизайн исследования PRV-2019-002

Модель	Лечение	RoA (Объем дозы)	Доза PR006A (vg/г головного мозга)	Общая доза PR006A (vg)	Количество мышей	Некропс после лечения
<i>Grn</i> КО	Вспомогательное вещество	ICV (10 мкл)	0	0	2 (0M/2F)*	8 недель
<i>Grn</i> КО	PR006A	ICV (10 мкл)	$2,4 \times 10^{11}$	$9,7 \times 10^{10}$	3(1M/2F)	8 недель

*Результаты генотипа в конце исследования подтвердили, что n = 1 животное из группы, получавшей вспомогательное вещество, должно быть *Grn* гетерозиготным КО вместо ожидаемого *Grn* гомозиготного КО.

[0293] Животных анализировали аналогично исследованию PRV-2018-027. Дважды в день животных проверяли на выживаемость, и один раз в день измеряли вес тела. После эвтаназии через 2 месяца после лечения собирали целевые ткани, капельно фиксировали в охлажденном 4% параформальдегиде и хранили при 4 °C до проведения оценки.

[0294] Для ЦНС, данные, согласующиеся с теми, которые ранее наблюдались у мышей *Grn* КО, наблюдались в головном мозге (Yin et al., *J Exp Med* 207(1):117-128 (2010)). В частности, наблюдалось повсеместное увеличение накопления липофусцина по всему головному мозгу. Редко также наблюдался минимальный некроз нейронов (у одного нелеченного животного с ранней смертью и у одного животного, получавшего вспомогательное вещество).

[0295] Из-за небольшого числа выборок не удалось продемонстрировать устойчивую тенденцию в результатах, связанных с воздействием препарата. Не было устойчивой разницы в ответе между исследуемым препаратом (PR006A) и вспомогательным веществом.

[0296] Для тканей, не относящихся к ЦНС, результаты, которые, как считалось, соответствовали фенотипу мышей *Grn* КО, наблюдались в почках (расширение канальцев и инфильтраты из мононуклеарных воспалительных клеток) и печени (вакуолизация клеток Купфера/клеток синусоидальной выстилки и микрогранулемы из клеток Купфера) (Yin et al., *J Exp Med* 207(1):117-128 (2010)).

[0297] У всех животных, перенесших операцию и включенных в исследование, была обнаружена «гломерулопатия». В то время как опубликованные отчеты об этом открытии как об изменении, связанном со стандартными, нелеченными мышами с нокаутом *Grn*, не были обнаружены, в одном исследовании продемонстрированы данные мышей с дефицитом програнулина, получавших диету, которая индуцирует гипергомоцистеинемию; у них развивается утолщение базальной мембраны клубочков и утоньшение отростков подоцитов (Fu et al., *Hypertension* 69(2):259-266 (2017)).

[0298] Все остальные результаты соответствовали тем, которые обычно наблюдались у лабораторных мышей. Из-за небольшого количества выборок не удалось продемонстрировать убедительных различий, связанных с воздействием препарата.

Диапазон доз PR006A в модели взрослых мышей FTD-GRN (PRV-2019-004)

[0299] Для дальнейшей оценки безопасности PR006A было проведено более крупное исследование диапазона доз на взрослых мышях *Grn* KO. В общей сложности 40 мышей разного пола были разделены на 4 группы и им вводили либо вспомогательное вещество, либо одну из трех доз PR006A путем однократной односторонней инъекции ICV в левое полушарие; все животные, независимо от группы лечения, получили общий объем дозы 10 мкл. Мышам вводили либо вспомогательное вещество, либо исследуемый препарат в возрасте 4 месяцев и умерщвляли через 3 месяца после указанного введения. Дополнительную контрольную группу мышей дикого типа (WT), которая включала нелеченных мышей C57BL/6J (та же исходная линия) в возрасте приблизительно 7 месяцев, также умерщвляли и подвергали аналогичной некропсии.

[0300] Исследование проводили в соответствии с дизайном исследования, приведенным ниже:

Таблица 10: Дизайн исследования PRV-2019-004

Группа	Модель	Лечение	RoA (Объем дозы)	Доза PR006A (Vg/г головного мозга)	Всего PR006A Доза (vg)	Количество мышей	Некропсия после лечения
1	<i>Grn</i> KO	Вспомогательное вещество	ICV (10 мкл)	0	0	10(4M/ 6F)	Неделя 13
2	<i>Grn</i> KO	PR006A	ICV (10 мкл)	$2,7 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{11}$	10(4M/ 6F)	Неделя 13
3	<i>Grn</i> KO	PR006A	ICV (10 мкл)	$2,7 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$	10(4M/ 6F)	Неделя 13
4	<i>Grn</i> KO	PR006A	ICV (10 мкл)	$2,7 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	10 (4M/6F)	Неделя 13

н.д.	WT (C57BL/6J)	Ни один	н.д.	0	0	10 (5M/5F)	н.д.
------	------------------	---------	------	---	---	---------------	------

[0301] Во ходе исследования животных проверяли на выживаемость дважды в день и взвешивали один раз в неделю. Мышей умерщвляли через 3 месяца после воздействия, и проводили различные посмертные исследования для оценки эффективности PR006A (см. раздел выше). Кроме того, окрашенные на H&E срезы головного мозга, грудного отдела спинного мозга, печени, сердца, селезенки, легких, почек и гонад оценивались сертифицированным патоморфологом.

[0302] При гистопатологическом исследовании не было обнаружено неблагоприятных результатов, связанных с PR006A, ни у одной из мышей, независимо от группы лечения.

[0303] Были обнаружены явления, согласующиеся с фенотипом модели мыши *Grn* KO, такие как накопление внутриклеточного липофусцина в различных областях мозга: коре головного мозга, ядрах головного мозга, гиппокампе, таламусе/гипоталамусе, мозжечке и стволе мозга (особенно в мостах и медуллярном веществе). Четких доказательств морфологических изменений на окрашенных H&E срезах (вакуолизация нейронов и глиоз) не наблюдалось. Накопление пигмента липофусцина может предшествовать легко обнаруживаемым морфологическим изменениям и, следовательно, служит адекватным биомаркером эффективности. В то время как все *Grn* гомозиготные KO группы продемонстрировали накопление липофусцина, наблюдались различия в степени выраженности этого явления между группами лечения. Частота более высоких баллов накопления липофусцина была наибольшей для группы животных, получавших вспомогательное вещество (Группа 1). Из животных, получавших PR006A, частота более высоких баллов наблюдалась в группе 4 (низкая доза PR006A; $2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), за которой следовала группа 3 (средняя доза PR006A; $2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга). Наименьшие баллы накопления липофусцина наблюдались в группе 2 (высокая доза PR006A; $2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга). Эти данные демонстрируют дозозависимое снижение степени выраженности внутриклеточного накопления липофусцина в мозге *Grn* гомозиготных нокаутных мышей. Все другие наблюдаемые гистопатологические данные считались случайными и/или имели сходную частоту и тяжесть у животных, получавших вспомогательное вещество и испытуемое вещество, и, следовательно, считались не связанными с введением PR006A.

Исследование однократной дозы GLP на обезьянах (PRV-2018-028)

Дизайн исследования

[0304] Целью этого исследования GLP была оценка токсичности и биораспределения исследуемого препарата PR006A при однократном введении посредством инъекции ICM обезьянам яванского макака с 6-дневным, 29-дневным или 182-дневным периодом наблюдения после введения; животных умерщвляли на День 7, День 30 или День 183 исследования. Исследование было разработано для оценки 2 уровней доз: самая высокая доза – это максимально достижимая доза, достижимая при объеме 1,2 мл (самый высокий объем, который имел место при введении) неразбавленного PR006A, и более низкая доза, которая эквивалентна одной логарифмической единице ниже, чем высокая доза. Дозы соответствовали низкой дозе $4,8 \times 10^{11}$ vg и высокой дозе $4,8 \times 10^{12}$ vg; с оценкой веса мозга в 74 г у яванского макака, вида NHP, использованного в этом исследовании, это соответствует примерно $6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга и $6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга. Исследование также включало контрольную группу, в которой животные получали только 1,2 мл

вспомогательного вещества (20 mM Трис pH 8,0, 200 mM NaCl и 1 mM MgCl₂ + 0,001% [мас./об.] Плуороник F68). В этом исследовании использовались как самцы, так и самки яванского макака. Группа День 7 включала 1 самку, получавшую самую высокую дозу, и была спроектирована как сентинельная для исследования ранней токсичности; а оставшиеся два момента времени (День 30 и День 183) включали 2 самца и 1 самку с каждой дозой. Помимо образцов из нескольких областей головного мозга, для анализа qPCR собирали образцы периферической ткани. Все образцы, положительные при qPCR, анализировали на предмет экспрессии трансгена. Сводные данные дизайна этого исследования представлены в Таблице 11.

Таблица 11: Обзор GLP исследования PRV-2018-028 у NHP

Цель	Оценка переносимости и биораспределения PR006A у NHP				
Соответствие регуляторным требованиям	GLP				
Исследуемый препарат	PR006A				
Общее количество животных	19 обезьян яванских макак				
Вес (возраст)	2-5 кг (25-50 месяцев)				
Дизайн исследования	Назначения группам:				
	Группа	Доза (vg/г головного мозга)	Количество животных		
			Некропсия (День 7)	Некропсия (День 30)	Некропсия (День 183)
	1	0	0	2M/1F	2M/1F
	2	$6,5 \times 10^9$	0	2M/1F	2M/1F
3	$6,5 \times 10^{10}$	1F	2M/1F	2M/1F	
Способ и частота введения	Внутри большой цистерны с помощью полипропиленового шприца объемом 1-3 см и иглы для спинномозговой пункции (Pencan 25 G x 2,5 см B Braun); однократный медленный болюс вводят с максимальной скоростью 0,5 куб. см/мин.				
Составы	Вводимый раствор предоставляется с концентрацией $4,01 \times 10^{12}$ vg/мл.				
Клинические признаки	Ежедневно (включая потребление пищи); Тщательные наблюдения еженедельно				
Вес тела	Еженедельно				
Неврологическое, офтальмологическое, ЭКГ-обследование	Один раз перед введением дозы и в течение Недель 2 и 26.				

Клиническая патология	Все группы гематологии, клинической химии, параметров свертывания		
Гематология	количество эритроцитов гемоглобин гематокрит средний корпускулярный гемоглобин средний корпускулярная конц-ция гемоглобина абс. кол-во эозинофилов абс. кол-во базофилов	средний корпускул. объем количество тромбоцитов количество лейкоцитов абс. кол-во нейтрофилов абс. кол-во лимфоцитов абс. кол-во моноцитов абс. кол-во ретикулоцитов лейкоцитарная формула мазок крови	
Клиническая биохимия	глюкоза азот мочевины креатинин общий белок альбумин глобулин фосфор соотношение альбумин/глобулин натрий холестерин общий билирубин креатинкиназа	аланинаминотрансфераза щелочная фосфатаза гамма-глутамилтрансфераза аспартатаминотрансфераза кальций неорганический калий хлорид триглицериды	
Коагуляция	протромбиновое время фибриноген активированное частичное тромбопластиновое время		
Шеддинг вектора (моча/кал)	При умерщвлении		
Некропсия	День 7, День 30, День 183		
Сохранение тканей для гистопатологического анализа	Следующие ткани от каждого животного будут собраны в 10% формалине с нейтральным буфером (если не указано иное) или зарегистрированы как отсутствующие, если применимо.		
Сохранение тканей, продолжение	Надпочечники ^a Аорта Кость, бедренная кость с костным мозгом Кость, грудина с костным мозгом Головной мозг ^a Слепая кишка	Место инъекции (вышележащая кожа) Тощая кишка Почка ^a Поражения Печень ^a Легкое с большими bronхами Лимфатический узел (нижнечелюстной)	Прямая кишка Слюнная железа Седалищный нерв Семенной пузырь ^a Кожа/подкожн. слой Спинальный мозг (шейный, грудной, поясничный) Селезенка

	Шейка матки Лимфатический узел Желудок Ободочная кишка (брыжеечный) Яичко Двенадцатип. кишка Молочная железа Тимуса Придаток яичка ^a Мышца, двугл. Щитовидная железа Пищевод мышца бедра с Глаз ^b Зрительный нерв паразитовидными ^a Желчный пузырь Яичник ^a Язык GALT (пейерова Маточная труба Трахея бляшка) Поджелуд. железа Мочевой пузырь Сердце ^a Гипофиз ^a Матка ^a Подвздошная кишка Предст. железа ^a Влагалище
	^a Органы (при их наличии) будут взвешены или отмечены как отсутствующие; ^b Собраны в модифицированном фиксаторе Дэвидсона и хранятся в 10% нейтральном забуференном формалине.
Гистопатология	Все группы – все ткани
Биораспределение	Следующие ткани/биологические жидкости будут проанализированы на биораспределение методом qPCR: Лобная кора Печень Гиппокамп DRG (шейные) Вентральный средний мозг DRG (грудные) Перивентрикулярное серое DRG (поясничные) вещество Спинной мозг (грудной) Путамен Спинной мозг (поясничный) Яичко Спинной мозг (шейный) Яичник Селезенка Почка Сердце (верхушка) Желудок (пилорический отдел) СМЖ Кровь Легкое
Экспрессия трансгена	Все образцы, положительные при qPCR, будут оцениваться на предмет экспрессии програнулина.

Сокращения: F – самка; ICM – внутри большой цистерны; M – самец; MgCl₂ – хлорид магния; NaCl – хлорид натрия; vg – геном(ы) вектора; DRG – дорсальные корешковые ганглии; GALT – лимфоидная ткань кишечника.

[0305] Яванские макаки NHP оценивались в ходе нескольких наблюдений и измерений в течение жизни, включая смертность/заболеваемость (ежедневно), клинические наблюдения (ежедневно), массу тела (исходный уровень и еженедельно после этого), визуальный осмотр потребления пищи (ежедневно),

неврологические наблюдения (исходный уровень и на Неделях 2 и 26), непрямую офтальмоскопию (исходный уровень и на Неделях 2 и 26) и электрокардиографию (ЭКГ) (исходный уровень и на Неделях 2 и 26).

[0306] Анализ нейтрализующих антител (nAb) к капсиду AAV9 проводили на исходном уровне и при умерщвлении в Дни 7, 30 или 183. Клинические анализы, включающие гематологию, коагуляцию, клиническую биохимию и общий анализ мочи, выполняли дважды на исходном уровне (анализы крови; один раз – анализа мочи) и один раз на Неделях 1 и 13 этапа введения дозы.

[0307] Животных умерщвляли и собирали ткани в Дни 7, 30 или 183. Ткани, указанные в Таблице 11, если они присутствовали, собирали у всех животных, взвешивали (если применимо) и разделяли на репликаты. Один репликат сохраняли в 10% формалине с нейтральным буфером (за исключением случаев, когда для оптимальной фиксации требуются специальные фиксаторы) для гистопатологической оценки (все животные). Дополнительные репликаты собирали для qPCR и анализа экспрессии трансгена.

Безопасность и токсикология

Незапланированных смертей не было, все животные оставались живы до запланированной некропсии. Не было никаких неблагоприятных клинических явлений, связанных с PR006A, изменений массы тела, офтальмологических данных или результатов физикального или неврологического обследования; макроскопическое исследование при некропсии не выявило отклонений, связанных с приемом препарата, ни в одной из групп. Кроме того, не отмечалось никаких связанных с PR006A изменений в интервале PR, продолжительности QRS, интервале QT, скорректированном интервале QT (QTc) или частоте сердечных сокращений, наблюдаемых у самцов или мышей разного пола, которым вводили $6,5 \times 10^9$ или $6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга. Во время качественной оценки ЭКГ, аномальных форм волны ЭКГ или аритмий не наблюдалось.

Биораспределение

[0308] Анализ биораспределения трансгена PR006A проводили с помощью анализа на основе qPCR. В День 183 в группе с высокой дозой ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) наблюдали широкое распространение трансдукции по всей ЦНС и на периферии, при этом все исследованные ткани были положительными на присутствие вектора с пороговым значением 50 vg/мкг ДНК, нижним пределом для количественного определения для анализа qPCR. Данные из выбранных репрезентативных областей со Дня 183 приведены на фиг. 54A; данные Дня 30 не показаны. В День 30 в группе с высокой дозой ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) все исследованные ткани ЦНС были положительными на предмет трансдукции, за исключением скорлупы. Ткани животных, получавших низкую дозу ($6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга), были положительными в ЦНС на День 183, но из периферических тканей положительными были только селезенка и печень. Кроме того, одна самка NHP, получавшая высокую дозу PR006A, была положительной на предмет трансдукции в яичниках в День 7, а самцы, получавшие высокую дозу, были положительными на предмет трансдукции в яичках в День 30 в День 183. Трансдукция PR006A была наиболее устойчивой в печени и тканях нервной системы и неизменно ниже в других исследованных периферических органах. В головном мозге трансдукция вектора стабилизировалась на День 183 по сравнению со Днем 30, демонстрируя надежную и стойкую трансдукцию трансгена.

[0309] В NHP, получавших ICM-введение PR006A, наблюдался значительный аллогенный иммунный ответ на продукт трансгена, програнулин, с антителами против програнулина, обнаруженными в образцах

сыворотки и СМЖ, собранных в День 30 и в День 183 после лечения; такой иммунный ответ указывает на то, что белок програнулина человека экспрессировался в организме NHP. Уровни антител к лекарственным средствам (ADA) определяли с помощью широко применяемых технологий иммунного анализа. Полученные данные проиллюстрированы на Фиг. 54B

[0310] Экспрессию PR006A (*GRN*) измеряли на уровне мРНК, с помощью анализа на основе RT-qPCR, и на уровне белка, с помощью анализа Simple Western™ (Jess). Одновременно с уровнями трансдукции PR006A экспрессию трансгена наблюдали путем измерения мРНК с помощью RT-qPCR в выбранных областях мозга (Фиг. 54C), печени, гонадных желез, спинном мозге и DRG, собранных в День 183.

[0311] Экспрессию трансгена можно было измерить в головном мозге и печени при обеих дозах PR006A, и при этом уровни экспрессии были дозозависимыми и устойчивыми. В гонадах экспрессию можно было измерить у самцов только при высокой дозе; при обеих дозах у самок экспрессию можно было измерить в День 7 и в День 30, но не в День 183.

[0312] Для подтверждения того, что програнулин человека продуцировался в организме пролеченных NHP, уровни белка в СМЖ оценивали на платформе Simple Western™ (Jess). Подробности метода представлены в Примере 14. Метод был определен пригодным путем измерения уровней програнулина в образцах СМЖ от пациентов с FTD-GRN и установления того, что они составляли примерно половину уровней, измеренных в образцах СМЖ от здоровых людей в контрольной группе и от пациентов с FTD без мутации *GRN*. Результаты в образцах СМЖ демонстрируют, что уровни програнулина повышаются дозозависимым образом у животных, получавших как низкие, так и высокие дозы PR006A (Фиг. 54D). Эти результаты указывают на то, что эффективная и широкая трансдукция PR006A в NHP после ICM введения приводит к повышенным уровням програнулина.

[0313] Измерения белка програнулина были сосредоточены на образцах СМЖ, поскольку анализ Simple Western™ (Jess) не подходит для измерения уровней програнулина в ткани головного мозга из-за высокого уровня неспецифических фоновых полос. Доступные в настоящее время анализы не позволяют надежно измерить уровни трансгенного програнулина человека в тканях NHP из-за высоких уровней неспецифического фона. Считается, что уровни в СМЖ отражают соответствующие концентрации в головном мозге, и они имеют особую ценность в качестве трансляционных биомаркеров для клинических исследований.

Резюме

[0314] Ни в одном из доклинических исследований, включая небольшое пилотное не-GLP исследование у NHP и GLP исследование у NHP, вплоть до Дня 183, не было обнаружено неблагоприятных результатов в отношении безопасности или опасений по поводу токсичности, которые исключали бы возможность начала клинического исследования. Данные патоморфологического анализа в исследовании GLP были неизменно минимальными по степени тяжести с низким количеством пораженных клеток в обеих группах доз. Других неблагоприятных прижизненных или посмертных данных, связанных с PR006A, не было.

Исследование фазы 1/2 с участием субъектов-людей с FTD-GRN

[0315] Субъекты-люди (n = 15) будут включены в открытое исследование рекомбинантного AAV PR006. Критерии включения субъектов следующие: возраст 30-80 лет (включительно), наличие патогенной мутации *GRN*, стадия симптоматического заболевания и стабильное применение базисной терапии до введения исследуемого препарата. Каждый субъект получит исследуемый препарат посредством однократной

инъекции ICM (внутри большой цистерны). Исследование будет включать 3-месячный мониторинг биомаркеров, 12-месячный клинический мониторинг, а также 5-летнее последующее наблюдение за безопасностью и клиническое наблюдение. В ходе исследования будут проанализированы: (1) безопасность и переносимость; (2) ключевые биомаркеры, включая: програнулин, NfL (легкая цепь нейрофиламентов) и объемная МРТ (магнитно-резонансная томография); и (3) эффективность: CDR плюс NACC FTLD (клиническая шкала деменции плюс оценка лобно-височной деменции согласно шкале Национального координационного центра по болезни Альцгеймера); характеристики поведения, познания, языка, функций и качества жизни.

Таблица 12: Примеры нейродегенеративных заболеваний

Заболевание	Ассоциированные гены
Болезнь Альцгеймера	<i>APP, PSEN1, PSEN2, APOE</i>
Болезнь Паркинсона	<i>LRRK2, PARK7, PINK1, PRKN, SNCA, GBA, UCHL1, ATP13A2, VPS35</i>
Болезнь Хантингтона	<i>HTT</i>
Боковой амиотрофический склероз	<i>ALS2, ANG, ATXN2, C9orf72, CHCHD10, CHMP2B, DCTN1, ERBB4, FIG4, FUS, HNRNPA1, MATR3, NEFH, OPTN, PFN1, PRPH, SETX, SIGMAR1, SMN1, SOD1, SPG11, SQSTM1, TARDBP, TBK1, TRPM7, TUBA4A, UBQLN2, VAPB, VCP</i>
Болезнь Баттена (нейрональный цероидный липофуциноз)	<i>PPT1, TPP1, CLN3, CLN5, CLN6, MFSD8, CLN8, CTSD, DNAJC5, CTSF, ATP13A2, GRN, KCTD7</i>
Атаксия Фридрейха	<i>FXN</i>
Болезнь телец Леви	<i>APOE, GBA, SNCA, SNCB</i>
Спинальная мышечная атрофия	<i>SMN1, SMN2</i>
Рассеянный склероз	<i>CYP27B1, HLA-DRB1, IL2RA, IL7R, TNFRSF1A</i>
Прионная болезнь (болезнь Крейтцфельда-Якоба, фатальная семейная бессонница, синдром Герцмана-Штрауслера-Шейнкера, прионопатия с переменной чувствительностью к протеазам)	<i>PRNP</i>

Таблица 13: Примеры синуклеинопатий

Заболевание	Ассоциированные гены
Болезнь Паркинсона	<i>LRRK2, PARK7, PINK1, PRKN, SNCA, GBA, UCHL1, ATP13A2, VPS35</i>
Деменция с тельцами Леви	<i>APOE, GBA, SNCA, SNCB</i>
Множественная системная атрофия	<i>COQ2, SNCA</i>

Таблица 14: Примеры таупатий

Заболевание	Ассоциированные гены
--------------------	-----------------------------

Болезнь Альцгеймера	<i>APP, PSEN1, PSEN2, APOE</i>
Первичная связанная возрастом таупатия	<i>MAPT</i>
Прогрессирующий надъядерный паралич	<i>MAPT</i>
Кортикобазальная дегенерация	<i>MAPT, GRN, C9orf72, VCP, CHMP2B, TARDBP, FUS</i>
Лобно-височная деменция при паркинсонизме-17	<i>MAPT</i>
Подострый склерозирующий панэнцефалит	<i>SCN1A</i>
Болезнь Lytico-Bodig	
Ганглиоглиома, ганглиоцитомы	
Менингиоангиоматоз	
Постэнцефалитный паркинсонизм	
Хроническая травматическая энцефалопатия	

Таблица 15: Примеры лизосомальных болезней накопления

Заболевание	Ассоциированные гены
Болезнь Ниманна-Пика	<i>NPC1, NPC2, SMPD1</i>
Болезнь Фабри	<i>GLA</i>
Болезнь Краббе	<i>GALC</i>
Болезнь Гоше	<i>GBA</i>
Болезнь Тея - Сакса	<i>HEXA</i>
Метахроматическая лейкодистрофия	<i>ARSA, PSAP</i>
Болезнь Фарбера	<i>ASAHI</i>
Галактосидазоз	<i>CTSA</i>
Болезнь Шиндлера	<i>NAGA</i>
Ганглиозидоз GM1	<i>GLB1</i>
Ганглиозидоз GM2	<i>GM2A</i>
Болезнь Сандхоффа	<i>HEXB</i>
Дефицит лизосомной кислой липазы	<i>LIPA</i>
Множественная сульфатазная недостаточность	<i>SUMF1</i>
Мукополисахаридоз I типа	<i>IDUA</i>
Мукополисахаридоз II типа	<i>IDS</i>
Мукополисахаридоз III типа	<i>GNS, HGSNAT, NAGLU, SGSH</i>
Мукополисахаридоз IV типа	<i>GALNS, GLB1</i>
Мукополисахаридоз VI типа	<i>ARSB</i>
Мукополисахаридоз VII типа	<i>GUSB</i>
Мукополисахаридоз IX типа	<i>HYAL1</i>
Муколипидоз II типа	<i>GNPTAB</i>
Муколипидоз III типа альфа/бета	<i>GNPTAB</i>
Муколипидоз III типа гамма	<i>GNPTG</i>
Муколипидоз IV типа	<i>MCOLN1</i>

Нейрональный цероидный липофусциноз	<i>PPT1, TPPI1, CLN3, CLN5, CLN6, MFSD8, CLN8, CTSD, DNAJC5, CTSF, ATP13A2, GRN, KCTD7</i>
Альфа-маннозидоз	<i>MAN2B1</i>
Бета-маннозидоз	<i>MANBA</i>
Аспартилглюкозаминурия	<i>AGA</i>
Фукозидоз	<i>FUCA1</i>

Пример 14: Автоматизированный вестерн-анализ для обнаружения програнулина в спинномозговой жидкости

[0316] Целью этого эксперимента было количественное определение уровней белка програнулина (PGRN) в спинномозговой жидкости (СМЖ) с применением автоматизированной вестерн-платформы Jess ProteinSimple (Сан-Хосе, штат Калифорния). Этот метод анализа можно применять для анализа образцов СМЖ у приматов, не относящихся к человеку (NHP). Для определения уровней экспрессии белка програнулина человека, трансгенного продукта PR006A, образцы СМЖ от субъектов-приматов, не относящихся к человеку, были проанализированы на платформе Simple Western™ (Jess) с применением антитела, которое специфически обнаруживает белок програнулина человека. Платформа Simple Western™ представляет собой платформу для автоматизированного иммуноанализа вестерн-блоттинга на основе капилляров, в которой все этапы, включая разделение белков, иммунозондирование, промывание и обнаружение с помощью хемилюминесценции, выполняются в капиллярном картридже. Образцы (при 4-кратном разбавлении) и первичные антитела к програнулину человека (Adipogen PG-359-7, при 10-кратном разбавлении), в дополнение к вторичным антителам и всем буферам, произведенным ProteinSimple, загружали в специальный картридж, который запускали на платформе Jess. Полуколичественный анализ данных проводился автоматически после завершения каждого прогона, при этом параметры, такие как интенсивность сигнала, площадь пика и отношение сигнал/шум, рассчитывали с помощью прибора Jess. Для каждого отдельного образца уровень програнулина измеряли как площадь пика иммунореактивности к антителу. Все анализы проводили с применением «заслепленных» образцов.

[0317] Описанный в данном документе анализ выполняли на образцах СМЖ из исследования на животных-приматах, не относящихся к человеку. Образцы СМЖ тестировали на наличие и уровни белка програнулина для изучения эффективности генной терапии с применением конструкции rAAV (PR006; см. Фиг. 64), кодирующей белок програнулина (PGRN). В этом исследовании либо вспомогательное вещество, либо PR006 вводили в низкой дозе PR006 ($1,8 \times 10^{10}$ vg/г веса головного мозга) или в высокой дозе PR006 ($1,8 \times 10^{11}$ vg/г веса головного мозга) путем инъекции в мозжечково-мозговую цистерну (ICM) животным NHP. Каждая группа состояла из 3 животных. Девять животных NHP умерщвляли на День 180 после инфицирования (Таблица 16), и образцы СМЖ анализировали с помощью анализа на основе платформы Jess.

Таблица 16: Обобщенные данные животных NHP по группе и дозе

Группа	Доза PR006 (vg/г веса головного мозга)	Количество животных Некропсия (День 180)
1	0	2M/1F
2	$1,8 \times 10^{10}$	2M/1F
3	$1,8 \times 10^{11}$	2M/1F

Таблица 17: Материалы для автоматизированного вестерн-анализа

Описание материала	Производитель	Номер изделия
Модуль разделения Jess 12-230 кДа, 25 капиллярных картриджей	ProteinSimple	SM-W004
EZ Standard Pack 1, 12-230 кДа	ProteinSimple	PS-ST01EZ-8
Модуль обнаружения антител против антигенов мышцы для Jess	ProteinSimple	DM-002
Моноклональное антитело к програнулину (человеческое), клон PG359-7 (первичное антитело)	Adipogen	AG-20A-0052-C100

Примечание. Перед тем, как открывать флаконы, необходимо дать реагентам нагреться до комнатной температуры.

[0318] При выполнении этого метода были соблюдены следующие процедуры:

Приготовление маточных растворов:

1. Приготовьте раствор 400 мМ DTT, добавив 40 мкл воды в прозрачную пробирку в модуле разделения EZ Standard Pack. Осторожно перемешайте.
2. Чтобы приготовить основную смесь, добавьте 20 мкл 10-кратного буфера для образцов и 20 мкл 400 мМ DTT в пробирку для основной смеси EZ розового цвета. Осторожно перемешайте.
3. Чтобы подготовить биотинилированный лэддер, внесите пипеткой 20 мкл воды в прозрачную биотинилированную лэддер-пробирку EZ с розовым осадком. Осторожно перемешайте.
4. Приготовьте смесь люминола и пероксида, добавив их в равных количествах. Для одного цикла, добавьте 200 мкл люминола к 200 мкл пероксида.
5. Подготовьте разбавление первичных антител (10-кратное разбавление), смешав 25 мкл первичных антител и 225 мкл разбавителя антител 2.

Приготовление образцов:

1. Образцы разбавляют 0,1-кратным буфером для образцов. Приготовьте 0,1-кратный буфер для образцов, добавив 10 мкл 10-кратного буфера для образцов в 990 мкл воды.
2. При необходимости разбавьте образцы. Например, образцы NHP СМЖ разбавляют в 4 раза перед добавлением основной смеси. Добавьте 5 мкл NHP СМЖ к 15 мкл 0,1X буфера для образцов.
3. Приготовьте образцы, добавив 1X основной смеси к 4X образца. Чтобы запустить технические дубликаты, приготовьте в общей сложности 15 мкл образца плюс основная смесь на образец. Например, добавьте 3 мкл основной смеси к 12 мкл разбавленного образца. Осторожно перемешайте.
4. Вскипятите образцы при 95°C в течение 5 минут.
5. Кратковременно поворачивайте образцы, используя настольную мини-центрифугу. Перед загрузкой образца перемешайте его на вортексе.

Загрузите реагенты и образцы в картридж:

1. Внесите пипеткой все образцы в соответствии с картой картриджа.
 - а. Внесите пипеткой 15 мкл смеси люминол + пероксид в каждую лунку дорожки E.

- b. Внесите пипеткой 10 мкл стрептавидина в первую лунку дорожки D.
 - c. Внесите пипеткой 10 мкл вторичных антител в оставшиеся 24 лунки дорожки D.
 - d. Внесите пипеткой 10 мкл разбавления антител в первую лунку дорожки C.
 - e. Внесите пипеткой 10 мкл разбавления первичных антител в оставшиеся 24 лунки дорожки C.
 - f. Внесите пипеткой 10 мкл разбавления антител во все лунки дорожки B.
 - g. Внесите пипеткой 10 мкл приготовленного леддера EZ в первую лунку дорожки A.
 - h. Внесите пипеткой 5 мкл раствора образца и основной смеси, чтобы продублировать дорожки на дорожке A.
2. Вращайте картридж при комнатной температуре при 2500 об/мин в течение 5 минут.

Загрузите капилляры и картридж в прибор:

1. Вставьте капилляры в слот. Убедитесь, что свет стал синим.
2. Загрузите картридж после вращения в инструмент.
3. Нажмите кнопку пуска после того, как синий индикатор перестанет мигать на приборе.

[0319] Пригодность системы анализа считалась приемлемой, если процент CV (коэффициент вариации) для дубликатов составлял $\leq 30\%$.

[0320] Перед тем, как использовать анализ для обнаружения програнулина в образцах NHP СМЖ, анализ тестировали следующим образом. Квалификация анализов Jess включала оценку линейности разбавления, селективности и специфичности. Нормальные образцы СМЖ из BioIVT применяли для определения линейности разбавления в анализе Jess. Образцы СМЖ от пациентов с лобно-височной деменцией (FTD) с мутацией PGRN (полученные из Национального централизованного репозитория болезни Альцгеймера и сопряжённых деменций (NCRAD; Индианаполис, штат Индиана)) применяли для определения селективности и специфичности анализа Jess.

Таблица 18: Обобщение результатов

	Элементы	Критерии соответствия	Результаты
Линейность разбавления	<ul style="list-style-type: none"> - Анализ уровней эндогенного PGRN в образцах необработанной СМЖ (BioIVT). - Проведение анализа холостого образца в матрице. - Минимально необходимое разбавление (MRD) определяется путем разбавления чистой матрицы в 2-кратном серийном разбавлении. - Если эндогенные уровни PGRN в матрице слишком 	<ul style="list-style-type: none"> - MRD определяется как наименьшее требуемое разбавление, когда наблюдается линейный необработанный сигнал или концентрация. В пределах линейного диапазона скорректированные наблюдаемые концентрации должны составлять $\pm 30\%$ от MRD. 	<ul style="list-style-type: none"> Соответствует - Все протестированные матрицы успешно прошли испытания с линейным диапазоном разбавления, составляющим $\pm 30\%$ от MRD (см. Раздел «Результаты и обсуждение», <u>«Линейность разбавления»</u>).

	низкие, разбавления будут выполняться с применением матрицы с добавками.		
Селективность и Специфичность	- Анализ уровней PGRN в образцах СМЖ пациентов с FTD.	- MRD определяется с помощью теста линейности разбавления.	Соответствует - Все протестированные матрицы успешно прошли испытания с % CV технического репликата, составляющим 20% (см. Раздел «Результаты и обсуждение», <i>«Селективность и специфичность»</i>).

Результаты и обсуждение

Линейность разбавления

[0321] Линейность разбавления белка PGRN, обнаруженная с помощью платформы Jess, была проверена в коммерчески доступных (BioIVT) образцах СМЖ от здоровых индивидуумов. Для определения линейности разбавления измеряли эндогенные уровни PGRN в образцах СМЖ. Образцы двух индивидуумов были протестированы в 2-кратном серийном разбавлении, которое колебалось от 2- до 64-кратного разбавления.

[0322] В таблице 19 указана площадь пика белка PGRN при 58 кДа, полученная с помощью платформы Jess, и % различий каждого разбавления по сравнению с 16-кратным разбавлением. Результаты в пределах диапазона линейности выделены жирным шрифтом (разница в пределах $100 \pm 30\%$). Установлено, что линейность разбавления находится в пределах 4-16-кратного разбавления.

Таблица 19: Линейность разбавления в образцах СМЖ

Коэффициент разбавления	СМЖ #1		СМЖ#2	
	Площадь пика 58 кДа (с поправкой на разбавление)	% отличия	Площадь пика 58 кДа (с поправкой на разбавление)	% отличия
1:2	3915099	-41,2	6392991	-38,8
1:4	6040885	-9,2	8020821	-23,2
1:8	5773987	-13,3	12615004	20,8
1:16	6656474	0,0	10446186	0,0
1:32	8911479	33,9	11782404	12,8

1:64	12056943	81,1	6795118	-35,0
------	----------	------	---------	-------

[0323] Таким образом, все протестированные матрицы имели приемлемый линейный диапазон, который соответствовал критериям приемлемости % отличия, составляющего $0\pm-30\%$, хотя размер диапазона и количество разбавления варьировались между матрицами. Было установлено, что MRD линейности образца составляет 4-кратное разбавление. Установлено, что линейность разбавления находится в пределах 4-16-кратного разбавления. Сводная информация о MRD и диапазоне линейного разбавления, который соответствует критериям приемлемости для СМЖ, представлена в Таблице 20.

Таблица 20: MRD и диапазон линейных разбавлений СМЖ

Ткань	Линейность MRD	Линейный диапазон разбавления
СМЖ	1:4	1:4 - 1:16

Селективность и специфичность

[0324] Селективность и специфичность белка PGRN, обнаруженного с помощью анализа Jess, были протестированы в образцах СМЖ из образцов пациентов PR006 FTD из NCRAD. Были собраны три группы (группа А, В и С) образцов СМЖ от гетерозиготных пациентов с FTD (группа А), семейных не-носителей (группа В или С) и здоровых индивидуумов (группа В или С). В каждой группе было проанализировано шесть образцов. Группы образцов перечислены в Таблице 16 Информация об образцах СМЖ от пациентов с FTD.

[0325] Образцы СМЖ разбавляли в 4 раза 0,1-кратным буфером для образцов, предоставленным ProteinSimple, и тестировали в технических дубликатах. Дубликаты образцов с результатом % CV более 20% анализировали повторно. Результаты с % CV менее 20% представлены в Таблице 22. В таблице 22 указана площадь пика белка PGRN при 58 кДа, полученная с помощью платформы Jess, и % CV между дубликатами. Результаты продемонстрировали, что уровни PGRN примерно в два раза выше в группах В и С по сравнению с группой А, что указывает на селективность и специфичность анализа Jess при определении уровней PGRN для образцов СМЖ (Фиг. 55).

Таблица 21: Информация об образцах СМЖ от пациентов с FTD.

Штрих-код	Вариант MRN	Визит	Номер набора	Тип образца	Название коробки	Положение	Группа
0003355598	ST-20000108	Цикл 2 - СМЖ	257282	СМЖ	27488 СМЖ	1	С
0004777338	ST-20000118	Цикл 2 - СМЖ	267633	СМЖ	27488 СМЖ	2	С
0004777329	ST-20000306	Цикл 1 - СМЖ	260551	СМЖ	27488 СМЖ	3	А
0004777326	ST-20000328	Цикл 2 - СМЖ	260544	СМЖ	27488 СМЖ	4	С

000477733 5	ST- 20000386	Цикл 1 - СМЖ	26711 0	СМЖ	27488 СМЖ	5	A
000477734 5	ST- 20000590	Цикл 2 - СМЖ	26785 9	СМЖ	27488 СМЖ	6	B
000477733 2	ST- 20000621	Цикл 1 - СМЖ	26641 3	СМЖ	27488 СМЖ	7	B
000462892 3	ST- 20000757	Цикл 1 - СМЖ	26981 7	СМЖ	27488 СМЖ	8	B
000469510 3	ST- 20001142	Цикл 1 - СМЖ	30814 9	СМЖ	27488 СМЖ	9	A
000407462 9	ST- 20000107	Цикл 2 - СМЖ	25821 2	СМЖ	27488 СМЖ	10	C
000335847 5	ST- 20000110	Цикл 2 - СМЖ	25821 0	СМЖ	27488 СМЖ	11	C
000335846 3	ST- 20000274	Цикл 2 - СМЖ	25729 2	СМЖ	27488 СМЖ	12	A
000478882 8	ST- 20000309	Цикл 2 - СМЖ	30309 3	СМЖ	27488 СМЖ	13	C
000335878 1	ST- 20000615	Цикл 1 - СМЖ	25727 8	СМЖ	27488 СМЖ	14	B
000335879 3	ST- 20000616	Цикл 1 - СМЖ	25730 5	СМЖ	27488 СМЖ	15	A
000477732 1	ST- 20000637	Цикл 1 - СМЖ	25730 7	СМЖ	27488 СМЖ	16	B
000477734 1	ST- 20000768	Цикл 1 - СМЖ	26785 7	СМЖ	27488 СМЖ	17	B
000469510 6	ST- 20001165	Цикл 1 - СМЖ	31739 6	СМЖ	27488 СМЖ	18	A

Таблица 22: Результаты селективности и специфичности

Группы	Штрих-код образца	Площадь пика 58 кДа (с поправкой на разбавление)	%CV
Группа (А) Гетерозиготные пациенты с FTD	0004777329	2838645	5,08
	0004777335	4293344	1,20
	0004695103	6738165	1,08
	0003358463	3594249	11,10
	0003358793	5992434	2,49
	0004695106	2472462	10,40
Группа (В) Здоровые или	0004777345	3836185	11,18
	0004777332	6006224	3,05

семейные не-носители	0004628923	3758940	1,44
	0003358781	7860294	17,08
	0004777321	7187172	0,69
	0004777341	8450410	0,50
Группа (С) Здоровые или семейные не-носители	0003355598	2981005	1,70
	0004777338	6803428	0,18
	0004777326	5030695	3,56
	0004074629	5448863	3,47
	0003358475	7892529	1,17
	0004788828	6944800	1,85

[0326] Образцы СМЖ из исследования пациентов с FTD (Таблица 21) также анализировали с помощью набора для ИФА PGRN человека (Adipogen, AG-45A-0018YEK-KI01). Результаты ИФА (Фиг. 56) выявили аналогичные тенденции уровней PGRN между группами, что и анализ Jess, и продемонстрировали, что анализ Jess подходит для применения с целью оценки уровней PGRN в образцах СМЖ.

[0327] В заключение, этот автоматический вестерн-анализ Jess от ProteinSimple был признан пригодным для применения с целью оценки уровней PGRN в образцах СМЖ от NHP.

[0328] Данные анализа Jess для образцов СМЖ от NHP приведены в Таблице 23. Каждый образец представляет собой среднее значение из двух технических репликатов. Приведена площадь пика для полосы 58 кДа на дорожке для образца. Данные представлены в виде средней площади пика технического репликата и скорректированных кратностей разбавления.

Таблица 23: Данные анализа Jess для образцов СМЖ от NHP

Образец ID	Группа дозы	Площадь пика (58 кДа)
PRV-028 d180 СМЖ 101	Низкая доза	4944754
PRV-028 d180 СМЖ 102	Контроль	4449066
PRV-028 d180 СМЖ 103	Низкая доза	6222881
PRV-028 d180 СМЖ 104	Высокая доза	5499901
PRV-028 d180 СМЖ 105	Низкая доза	4293853
PRV-028 d180 СМЖ 106	Высокая доза	10149400
PRV-028 d180 СМЖ 107	Контроль	1360173
PRV-028 d180 СМЖ 108	Контроль	5742081
PRV-028 d180 СМЖ 109	Высокая доза	9658597

[0329] Целью этого анализа было подтвердить уровень экспрессии белка програнулина (PGRN) после трансдукции PR006 в областях ткани, представляющих интерес для исследования NHP. Это было осуществлено с помощью автоматизированной вестерн-платформы, в которой белок програнулина детектировали с применением моноклональных антител. Экспрессию програнулина можно было измерить в СМЖ как контрольных NHP, так и NHP, пролеченных PR006; при этом анализ не дифференцирует эндогенный белок програнулина и PR006A-индуцированный белок програнулина.

[0330] Настоящая заявка включает в себя посредством ссылки содержание следующих документов во всей их полноте: Публикация международной заявки РСТ № WO 2019/070893; Публикация международной заявки РСТ № WO 2019/070891; Предварительные заявки на патенты США: заявка с серийным номером 62/567296, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ»; заявка с серийным номером 62/567311, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ»; заявка с серийным номером 62/567319, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ»; заявка с серийным номером 62/567301, поданная 3 октября 2018 г. и озаглавленная «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ»; заявка с серийным номером 62/567310, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ»; заявка с серийным номером 62/567303, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ»; и заявка с серийным номером 62/567305, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ».

[0331] Описав таким образом несколько аспектов по меньшей мере одного варианта осуществления этого изобретения, следует принять во внимание, что различные изменения, модификации и оптимизации будут легко осуществлены специалистами в данной области техники. Предполагается, что такие изменения, модификации и оптимизации являются частью этого описания и находятся в пределах сущности и объема изобретения. Соответственно, приведенное выше описание и графические материалы приведены только в качестве примера.

[0332] Хотя в данном документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалисты в данной области техники легко смогут представить себе множество других средств и/или структур для выполнения функций и/или получения результатов и/или одного или большего количества из описанных в данном документе преимуществ, и каждый из таких вариантов и/или модификаций будет считаться находящимся в пределах объема настоящего изобретения. В более общем контексте, специалисты в данной области техники легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых применяются идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить, применяя с этой целью не более чем рутинное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в рамках прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов настоящее изобретение может быть реализовано иначе, чем конкретно описано и заявлено. Настоящее изобретение направлено на каждую отдельную характеристику, систему, изделие, материал и/или способ, описанные в данном документе. Кроме того, любая комбинация двух или большего количества таких характеристик, систем, изделий, материалов и/или способов, если такие характеристики, системы, изделия, материалы и/или способы не являются взаимно несовместимыми, входит в объем настоящего изобретения.

[0333] Термины в единственном числе, используемые в данном документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающие «по меньшей мере один».

[0334] Фраза «и/или», используемая в данном документе в описании и формуле изобретения, должна пониматься как означающая «один или оба» для сочетающихся элементов, то есть элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других – разобщены. Не обязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных фразой «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно определены, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на «А и/или В» при использовании в сочетании с неограниченным языковым термином, например, «содержащий», может относиться в одном варианте осуществления к А без В (не обязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления – к В без А (не обязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления – как к А, так и к В (не обязательно, включая другие элементы); *и т.д.*

[0335] Используемый в данном документе в описании и формуле изобретения термин «или» следует понимать как имеющий то же значение, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в перечне термины «или» или «и/или» должны интерпретироваться как включающие, то есть включение по меньшей мере одного, но также и более одного, из числа или перечня элементов, и, не обязательно, дополнительные элементы, не указанные в перечне. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как «только один из» или «ровно один из» или, при использовании в формуле изобретения, «состоящий из» будут относиться к включению ровно одного элемента из числа или перечня элементов. В общем, термин «или», используемый в данном документе, должен интерпретироваться только как указывающий на исключительные альтернативы (т.е. «один или другой, но не оба»), когда ему предшествуют термины исключительности, такие как «любой», «один из», «только один из» или «ровно один из».

[0336] Используемую в данном документе в описании и формуле изобретения фразу «по меньшей мере один» в отношении перечня из одного или большего количества элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или большего количества элементов в перечне элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что элементы могут не обязательно присутствовать помимо элементов, специально идентифицированных в перечне элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно идентифицированными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере один из А и В» (или, что эквивалентно, «по меньшей мере один из А или В» или, что эквивалентно, «по меньшей мере один из А и/или В») может относиться, в одном варианте осуществления, по меньшей мере к одному, не обязательно включающему более одного, А, без В (и не обязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления – по меньшей мере к одному, не обязательно включающему более одного, В, без А (и не обязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления – по меньшей мере к одному, не обязательно включающему более одного А, и по меньшей мере одному, не обязательно включающему более одного В (и не обязательно включающему другие элементы); *и т.д.*

[0337] Использование порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и *т.д.*, в формуле изобретения для модификации элемента формулы изобретения само по себе не означает какого-либо приоритета, предпочтения или доминирующего порядка одного элемента формулы над другим или временного порядка, в котором выполняются действия способа, и при этом эти термины используются просто как метки, чтобы отличить один элемент формулы изобретения, имеющий определенное название, от другого

элемента, имеющего такое же название (но для использования порядкового термина), чтобы дифференцировать элементы формулы изобретения.

[0338] Также следует понимать, что, если явно не указано иное, в любых заявленных в данном документе способах, которые включают более одного этапа или действия, порядок этапов или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором эти этапы или действия способа указаны.

[0339] Каждый из патентов США, публикаций патентных заявок США, патентных заявок США, иностранных патентов, иностранных патентных заявок и непатентных публикаций, упомянутых в этой заявке, полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

[0340] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая один или большее количество генных продуктов (*например*, первый, второй и/или третий генный продукт), содержит или состоит из (или кодирует пептид, имеющий) последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления генный продукт кодируется частью (*например*, фрагментом) любой из SEQ ID NO: 1-91.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0341] Несмотря на прилагаемую формулу изобретения, в данном документе излагаются следующие пронумерованные варианты осуществления:

[0342] 1. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок Гказа, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок Гказа кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0343] 2. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что белок Гказа содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, или ее часть.

[0344] 3. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 1 или 2, отличающаяся тем, что белок Гказа кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 15.

[0345] 4. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 1-3, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0346] 5. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 1-4, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0347] 6. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 1-5, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0348] 7. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок просапозин, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок просапозин кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0349] 8. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 7, отличающаяся тем, что белок просапозин содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, или ее часть.

[0350] 9. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 7 или 8, отличающаяся тем, что белок просапозин кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 17.

[0351] 10. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 7-9, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0352] 11. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 7-10, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0353] 12. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 7-11, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0354] 13. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок SCARB2, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок SCARB2 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0355] 14. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 13, отличающаяся тем, что белок SCARB2 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, или ее часть.

[0356] 15. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 13 или 14, отличающаяся тем, что белок SCARB2 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 19.

[0357] 16. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 13-15, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0358] 17. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 13-16, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0359] 18. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 13-17, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0360] 19. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GBA2, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок GBA2 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0361] 20. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 19, отличающаяся тем, что белок GBA2 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, или ее часть.

[0362] 21. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 19 или 20, отличающаяся тем, что белок GBA2 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 31.

[0363] 22. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 19-21, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0364] 23. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 19-22, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0365] 24. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 19-23, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0366] 25. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GALC, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок GALC кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0367] 26. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 25, отличающаяся тем, что белок GALC содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, или ее часть.

[0368] 27. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 25 или 26, отличающаяся тем, что белок GALC кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 34.

[0369] 28. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 25-27, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0370] 29. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 25-28, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0371] 30. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 25-29, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0372] 31. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок CTSB, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок CTSB кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0373] 32. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 31, отличающаяся тем, что белок CTSB содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, или ее часть.

[0374] 33. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 31 или 32, отличающаяся тем, что белок CTSB кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 36.

[0375] 34. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 31-33, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0376] 35. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 31-34, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0377] 36. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 31-35, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0378] 37. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок SMPD1, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок SMPD1 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0379] 38. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 37, отличающаяся тем, что белок SMPD1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37, или ее часть.

[0380] 39. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 37 или 38, отличающаяся тем, что белок SMPD1 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 38.

[0381] 40. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 37-39, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0382] 41. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 37-40, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0383] 42. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 37-41, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0384] 43. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GCH1, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок GCH1 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0385] 44. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 43, отличающаяся тем, что белок GCH1 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45, или ее часть.

[0386] 45. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 43 или 44, отличающаяся тем, что белок GCH1 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 46.

[0387] 46. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 43-45, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0388] 47. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 43-46, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0389] 48. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 43-47, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0390] 49. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок RAB7L, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок RAB7L кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0391] 50. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 49, отличающаяся тем, что белок RAB7L содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, или ее часть.

[0392] 51. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 49 или 50, отличающаяся тем, что белок RAB7L кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 48.

[0393] 52. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 49-51, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0394] 53. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 49-52, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0395] 54. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 49-53, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0396] 55. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок VPS35, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок VPS35 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0397] 56. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 55, отличающаяся тем, что белок VPS35 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49, или ее часть.

[0398] 57. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 55 или 56, отличающаяся тем, что белок VPS35 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 50.

[0399] 58. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 55-57, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0400] 59. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 55-58, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0401] 60. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 55-59, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0402] 61. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок IL-34, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок IL-34 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0403] 62. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 61, отличающаяся тем, что белок IL-34 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55, или ее часть.

[0404] 63. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 61 или 62, отличающаяся тем, что белок IL-34 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 56.

[0405] 64. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 61-63, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0406] 65. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 61-64, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0407] 66. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 61-65, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0408] 67. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок TREM2, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок TREM2 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0409] 68. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 67, отличающаяся тем, что белок TREM2 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 57, или ее часть.

[0410] 69. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 67 или 68, отличающаяся тем, что белок TREM2 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 58.

[0411] 70. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 67-69, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0412] 71. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 67-70, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0413] 72. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 67-71, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0414] 73. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок TMMEM106B, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок TMEM106B кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0415] 74. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 73, отличающаяся тем, что белок TMEM106B содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, или ее часть.

[0416] 75. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 73 или 74, отличающаяся тем, что белок TMEM106B кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 64.

[0417] 76. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 73-75, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0418] 77. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 73-76, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0419] 78. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 73-77, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0420] 79. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок програнулин (PGRN), фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом

(i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или

(ii) белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

[0421] 80. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 79, отличающаяся тем, что белок PGRN содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 67, или ее часть.

[0422] 81. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 79 или 80, отличающаяся тем, что белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 68.

[0423] 82. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 79-81, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.

[0424] 83. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 79-82, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.

[0425] 84. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 79-83, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.

[0426] 85. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую первый генный продукт и второй генный продукт, при этом каждый генный продукт независимо выбирают из генных продуктов или их частей, представленных в Таблице 1.

- [0427] 86. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 85, отличающаяся тем, что первый генный продукт представляет собой белок Gказу или его часть.
- [0428] 87. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 85 или 86, отличающаяся тем, что второй генный продукт представляет собой LIMP2 или его часть, или просапозин или его часть.
- [0429] 88. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 85-87, дополнительно кодирующая интерферирующую нуклеиновую кислоту (*например*, shРНК, miРНК, dsРНК и *т.д.*), необязательно при этом интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию α -Syn или TMEM106B.
- [0430] 89. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 85-88, дополнительно содержащая один или большее количество промоторов, необязательно при этом каждый из одного или большего количества промоторов независимо представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA), промотор CAG, промотор CD68 или промоутер JeT.
- [0431] 90. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 85-89, дополнительно содержащая внутренний участок посадки рибосомы (IRES), необязательно при этом указанный IRES расположен между первым генным продуктом и вторым генным продуктом.
- [0432] 91. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 85-90, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид, необязательно при этом указанный саморасщепляющийся пептид представляет собой T2A.
- [0433] 92. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 85-91, отличающаяся тем, что экспрессирующая конструкция содержит две последовательности инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), фланкирующие первый генный продукт и второй генный продукт, необязательно при этом одна из последовательностей ITR не имеет функционального сайта терминального разрешения.
- [0434] 93. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 92, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область «D» относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29).
- [0435] 94. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 93, отличающаяся тем, что модифицированная область «D» представляет собой последовательность «D», расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.
- [0436] 95. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 93 или 94, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность «D», представляет собой 3' ITR.
- [0437] 96. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 85-95, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.
- [0438] 97. Выделенная нуклеиновая кислота, имеющая последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-91.
- [0439] 98. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-97.
- [0440] 99. Вектор по варианту осуществления 98, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой плазмиду.

- [0441]** 100. Вектор по варианту осуществления 98, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вирусный вектор, необязательно при этом вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор AAV (rAAV) или вектор бакуловируса.
- [0442]** 101. Композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-97 или вектор по любому из вариантов осуществления 98-100.
- [0443]** 102. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-97 или вектор по любому из вариантов осуществления 98-100.
- [0444]** 103. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий:
- (i) капсидный белок; а также
 - (ii) выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-97 или вектор по любому из вариантов осуществления 98-100.
- [0445]** 104. rAAV по варианту осуществления 103, отличающийся тем, что капсидный белок способен преодолевать гематоэнцефалический барьер, при этом указанный капсидный белок необязательно представляет собой капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAVrh.10.
- [0446]** 105. rAAV по варианту осуществления 103 или 104, отличающийся тем, что указанный rAAV трансдуцирует нейрональные клетки и ненейрональные клетки центральной нервной системы (ЦНС).
- [0447]** 106. Способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой болезнью Паркинсона или, при этом указанный способ включает введение субъекту выделенной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-97, вектора по любому из вариантов осуществления 98-100, композиции по варианту осуществления 101 или rAAV по любому из вариантов осуществления 103-105.
- [0448]** 107. Способ по варианту осуществления 106, отличающийся тем, что введение включает прямую инъекцию в ЦНС субъекта, необязательно при этом прямая инъекция представляет собой внутримозговую инъекцию, интрапаренхимальную инъекцию, интратекальную инъекцию, инъекцию внутрь большой цистерны или любую их комбинацию.
- [0449]** 108. Способ по варианту осуществления 107, отличающийся тем, что указанная прямая инъекция в ЦНС субъекта включает конвекционную усовершенствованную доставку (CED).
- [0450]** 109. Способ по любому из вариантов осуществления 106-108, отличающийся тем, что введение включает периферическую инъекцию, при этом периферическая инъекция необязательно является внутривенной инъекцией.
- [0451]** 110. Способ лечения субъекта, имеющего лобно-височную деменцию с мутацией GRN или подозрением на ее наличие, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:
- (i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок PGRN, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; а также
 - (ii) капсидный белок AAV9.
- [0452]** 111. Способ по варианту осуществления 110, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту в дозе от около 1×10^{13} геномов вектора (vg) до около 7×10^{14} vg.
- [0453]** 112. Способ по варианту осуществления 110 или 111, отличающийся тем, что rAAV вводят путем инъекции в мозжечково-мозговую цистерну.

[0454] 113. Способ по любому из вариантов осуществления 110-112, отличающийся тем, что промотор представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA).

[0455] 114. Способ по любому из вариантов осуществления 110-113, отличающийся тем, что вектор гAAV дополнительно содержит энхансер цитомегаловируса (CMV).

[0456] 115. Способ по любому из вариантов осуществления 110-114, отличающийся тем, что вектор гAAV дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE).

[0457] 116. Способ по любому из вариантов осуществления 110-115, отличающийся тем, что вектор гAAV дополнительно содержит сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота.

[0458] 117. Способ по любому из вариантов осуществления 110-116, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса, фланкирующие экспрессионную конструкцию.

[0459] 118. Способ по варианту осуществления 117, отличающийся тем, что каждая ITR-последовательность представляет собой ITR-последовательность AAV2 дикого типа.

[0460] 119. Способ по любому из вариантов осуществления 110-118, отличающийся тем, что вектор гAAV дополнительно содержит TRY-область между 5' ITR и экспрессионной конструкцией, при этом TRY-область содержит SEQ ID NO: 28.

[0461] 120. Способ лечения субъекта, имеющего лобно-височную деменцию с мутацией GRN или подозрением на ее наличие, включающий введение указанному субъекту гAAV, содержащего:

(i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' до 3':

(a) AAV2 ITR;

(b) энхансер CMV;

(c) промотор CBA;

(d) вставку трансгена, кодирующую белок PGRN, при этом указанная вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68;

(e) WPRE;

(f) сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота; а также

(g) AAV2 ITR; и

(ii) капсидный белок AAV9.

[0462] 121. Способ по варианту осуществления 120, отличающийся тем, что гAAV вводят субъекту в дозе от около 1×10^{13} vg около 7×10^{14} vg.

[0463] 122. Способ по варианту осуществления 120 или 121, отличающийся тем, что гAAV вводят путем инъекции в мозжечково-мозговую цистерну.

[0464] 123. Способ по любому из вариантов осуществления 110-122, отличающийся тем, что гAAV вводят в составе, содержащем около 20 mM Трис, pH 8,0, около 1 mM MgCl₂, около 200 mM NaCl и около 0,001% мас./об полоксамера 188.

[0465] 124. Фармацевтическая композиция, содержащая

(i) гAAV, содержащий:

(a) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена,

кодирующей белок PGRN, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; а также

- (b) капсидный белок AAV9; и
- (ii) около 20 mM Трис, pH 8,0,
- (iii) около 1 mM MgCl₂,
- (iv) около 200 mM NaCl, и
- (v) около 0.001% мас./об полоксамера 188.

[0466] 125. rAAV, содержащий:

(a) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок PGRN, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; а также

(b) капсидный белок AAV9,

для применения в способе лечения лобно-височной деменции с мутацией *GRN* у субъекта.

[0467] 126. Способ количественного определения уровня белка PGRN в образце спинномозговой жидкости (СМЖ), включающий:

(1) разбавление образца СМЖ в основной смеси, содержащей дитиотреитол (ДТТ) и буфер для образцов;

(2) загрузку разбавленного образца СМЖ, антитела против програнулина, вторичного антитела, которое обнаруживает антитело против програнулина, люминола и пероксида, в лунки капиллярного картриджа;

(3) загрузку капиллярного картриджа в автоматический прибор для иммуноанализа вестерн-блоттинга;

(4) использование автоматического прибора для иммуноанализа вестерн-блоттинга с целью расчета интенсивности сигнала, площади пика и отношения сигнал/шум; а также

(5) количественное определение уровня белка програнулина в образце СМЖ как площади пика иммунореактивности к антителу против програнулина.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, имеющего лобно-височную деменцию с мутацией *GRN* или с подозрением на ее наличие, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:
 - (i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок програнулин (PGRN), при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; а также
 - (ii) капсидный белок AAV9.
2. Способ по п. 1, в котором rAAV вводят субъекту в дозе от около 1×10^{13} геномов вектора (vg) до около 7×10^{14} vg.
3. Способ по пп. 1 или 2, в котором rAAV вводят путем инъекции в мозжечково-мозговую цистерну.
4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором промотор представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA).
5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором вектор rAAV дополнительно содержит энхансер цитомегаловируса (CMV).
6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором вектор rAAV дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE).
7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором вектор rAAV дополнительно содержит сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота.
8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором нуклеиновая кислота содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса, фланкирующие экспрессионную конструкцию.
9. Способ по п. 8, в котором каждая ITR-последовательность представляет собой ITR-последовательность AAV2 дикого типа.
10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором вектор rAAV дополнительно содержит TRY-область между 5' ITR и экспрессионной конструкцией, при этом TRY-область содержит SEQ ID NO: 28.
11. Способ лечения субъекта, имеющего лобно-височную деменцию с мутацией *GRN* или с подозрением на ее наличие, включающий введение субъекту rAAV, содержащего:
 - (i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' до 3':
 - (a) AAV2 ITR;

- (b) энхансер CMV;
 - (c) промотор CBA;
 - (d) вставку трансгена, кодирующую белок PGRN, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68;
 - (e) WPRE;
 - (f) сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота; а также
 - (g) AAV2 ITR; и
- (ii) капсидный белок AAV9.

12. Способ по п. 11, в котором гAAV вводят субъекту в дозе от около 1×10^{13} vg около 7×10^{14} vg.

13. Способ по пп. 11 или 12, в котором гAAV вводят путем инъекции в мозжечково-мозговую цистерну.

14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором гAAV вводят в составе, содержащем около 20 mM Трис, pH 8,0, около 1 mM MgCl₂, около 200 mM NaCl и около 0,001% мас./об полоксамера 188.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая

(i) гAAV, содержащий:

(a) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок PGRN, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; а также

(b) капсидный белок AAV9; и

(ii) около 20 mM Трис, pH 8,0,

(iii) около 1 mM MgCl₂,

(iv) около 200 mM NaCl, и

(v) около 0.001% мас./об полоксамера 188.

16. гAAV, содержащий:

(a) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок PGRN, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 68; а также

(b) капсидный белок AAV9,

для применения в способе лечения лобно-височной деменции с мутацией *GRN* у субъекта.

17. Способ количественного определения уровня белка PGRN в образце спинномозговой жидкости (СМЖ), включающий:

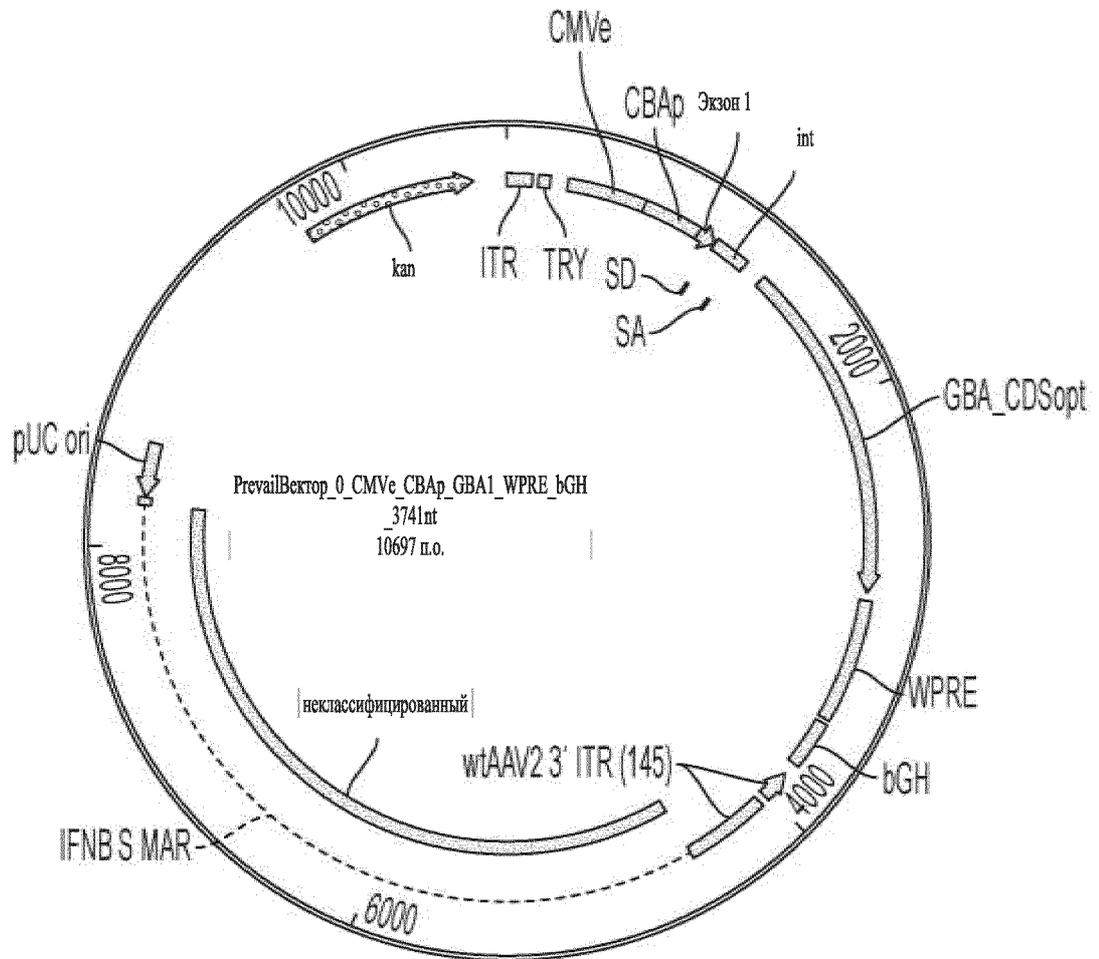
(1) разбавление образца СМЖ в основной смеси, содержащей дитиотреитол (ДТТ) и буфер для образцов;

(2) загрузку разбавленного образца СМЖ, антитела к програнулину, вторичного антитела, которое обнаруживает антитело к програнулину, люминола и пероксида, в лунки капиллярного картриджа;

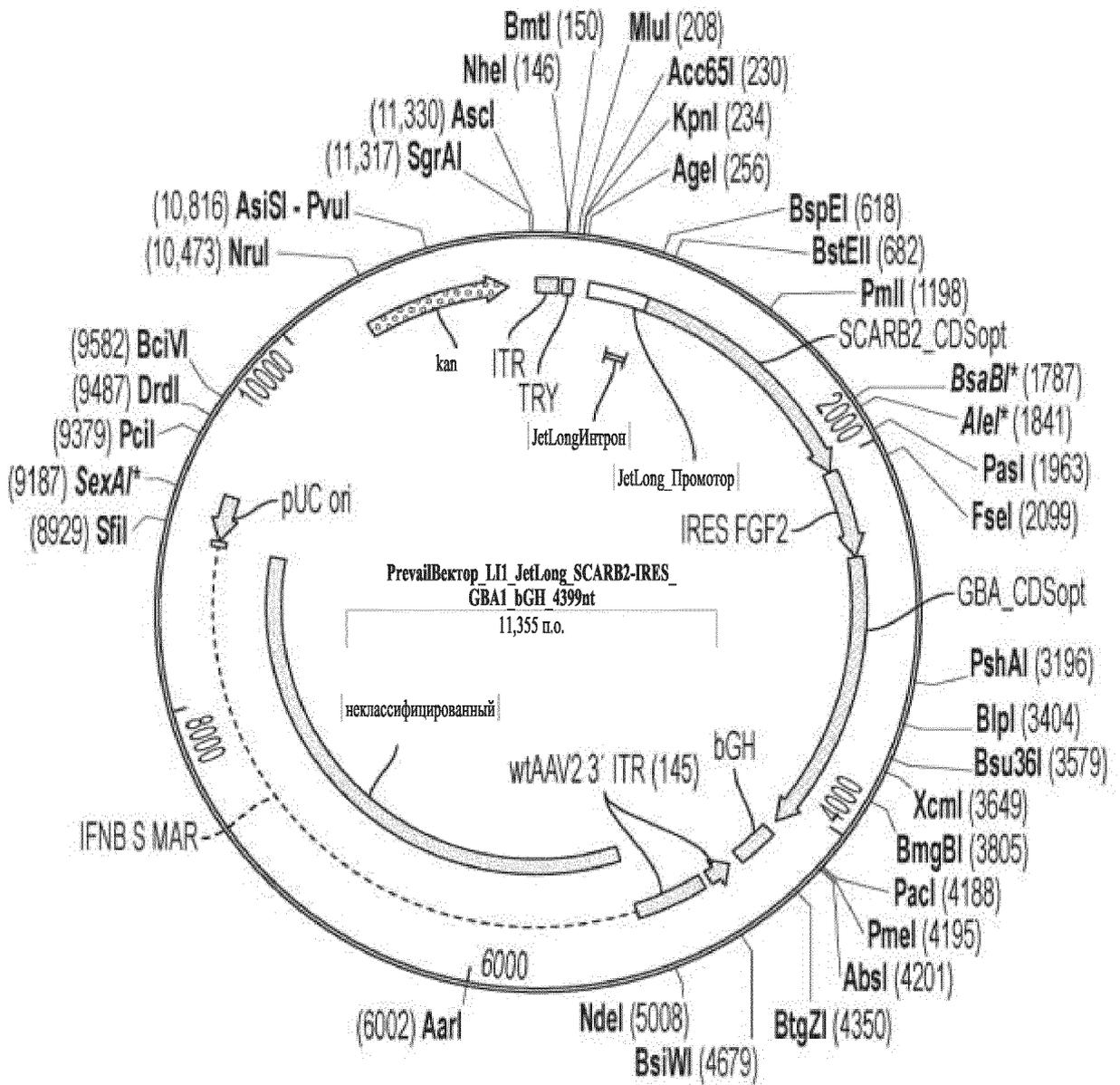
(3) загрузку капиллярного картриджа в автоматический прибор для иммуноанализа методом вестерн-блоттинга;

(4) использование автоматического прибора для иммуноанализа методом вестерн-блоттинга с целью расчета интенсивности сигнала, площади пика и отношения сигнал/шум; а также

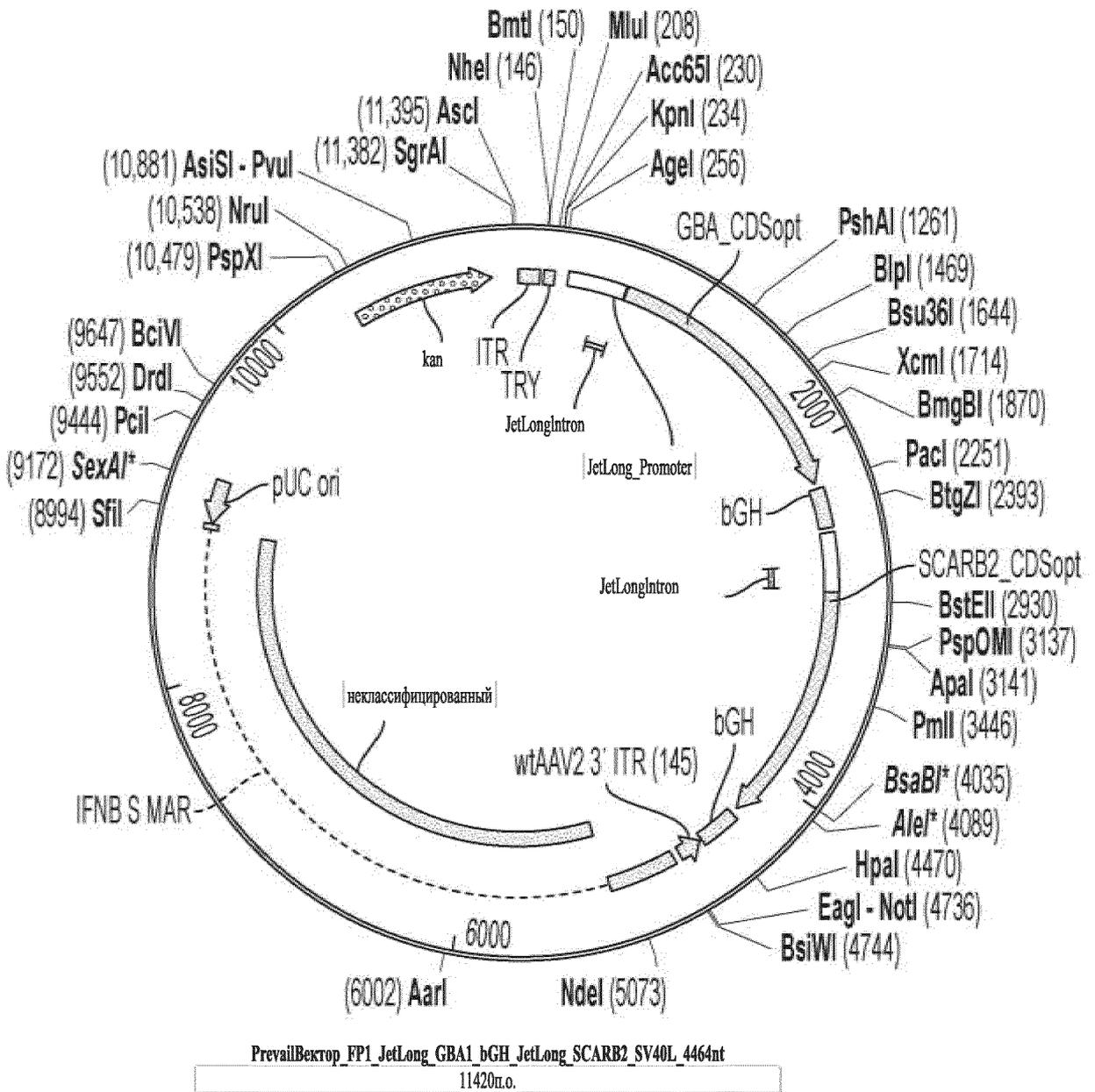
(5) количественное определение уровня белка програнулин в образце СМЖ в виде площади пика иммунореактивности к антителу к програнулину.



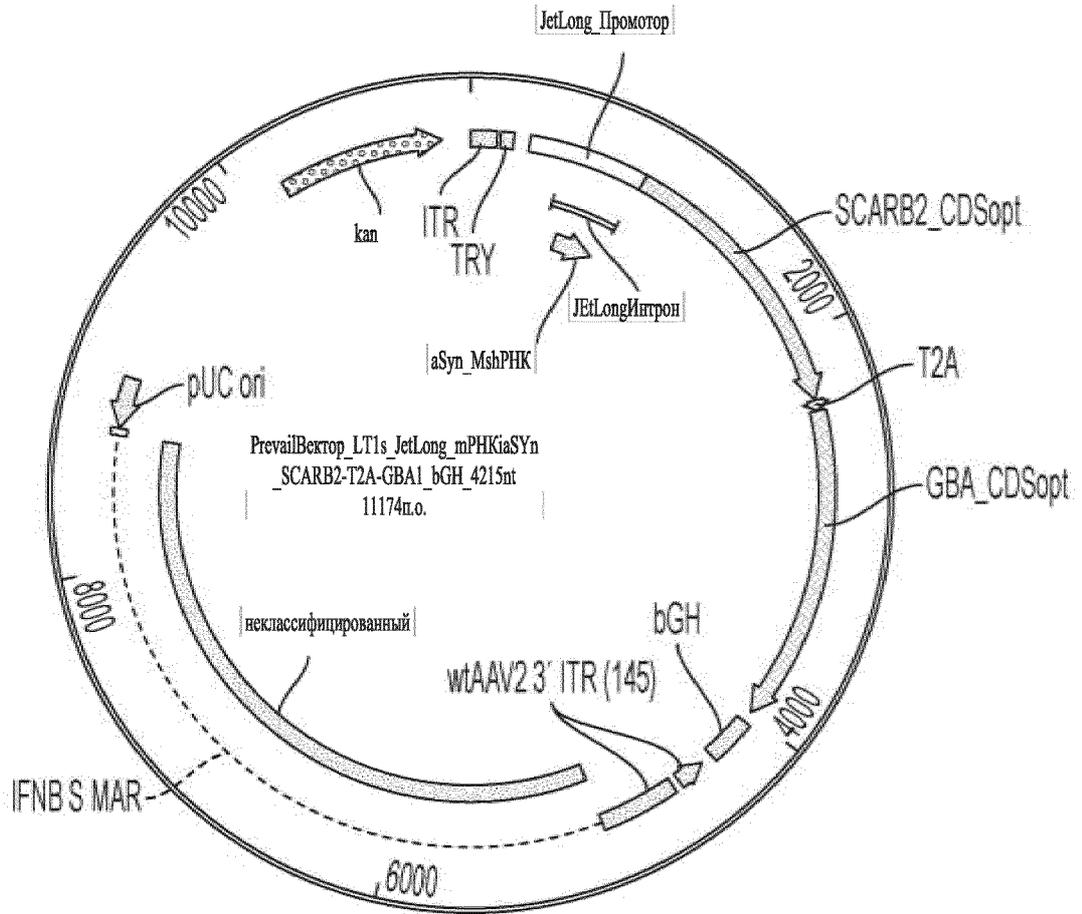
Фиг. 1



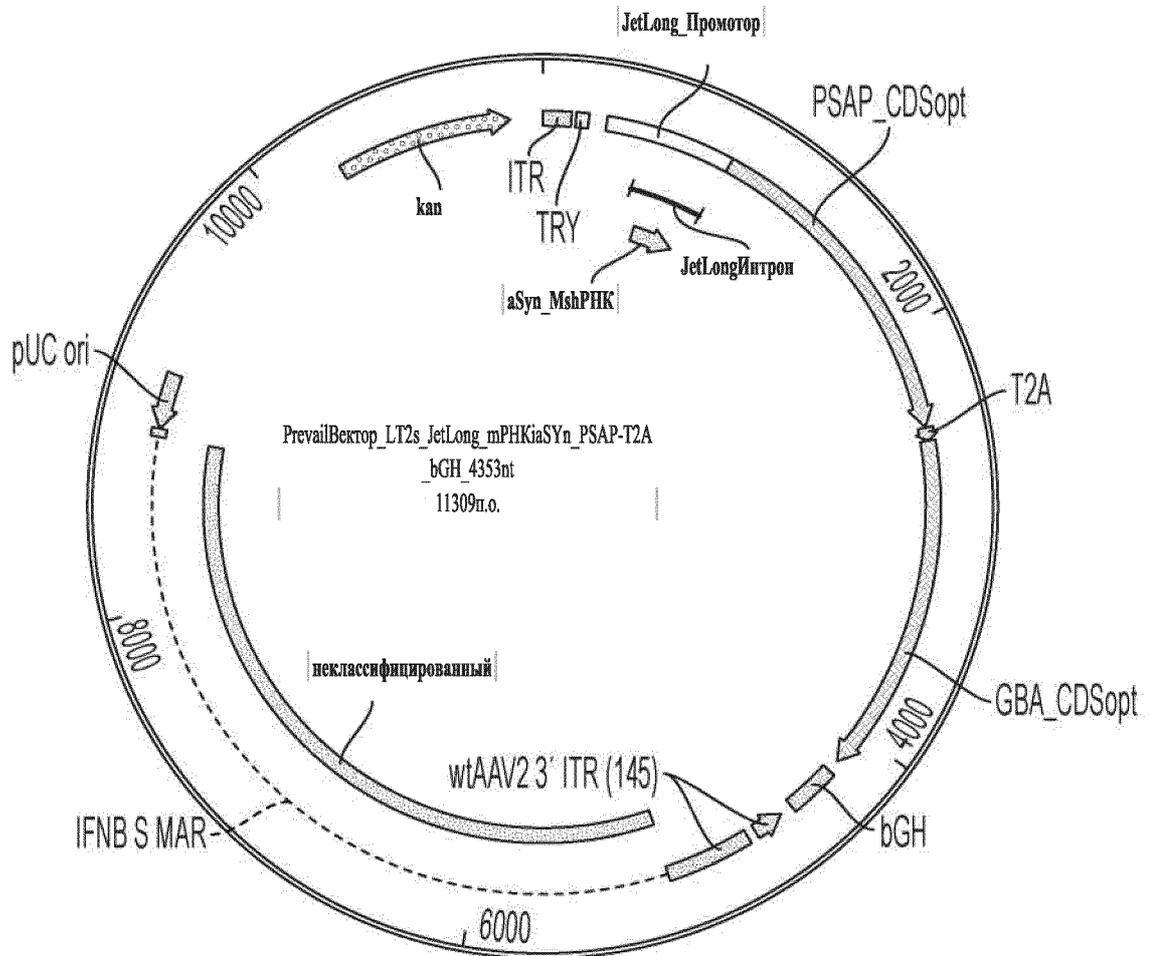
Фиг. 2



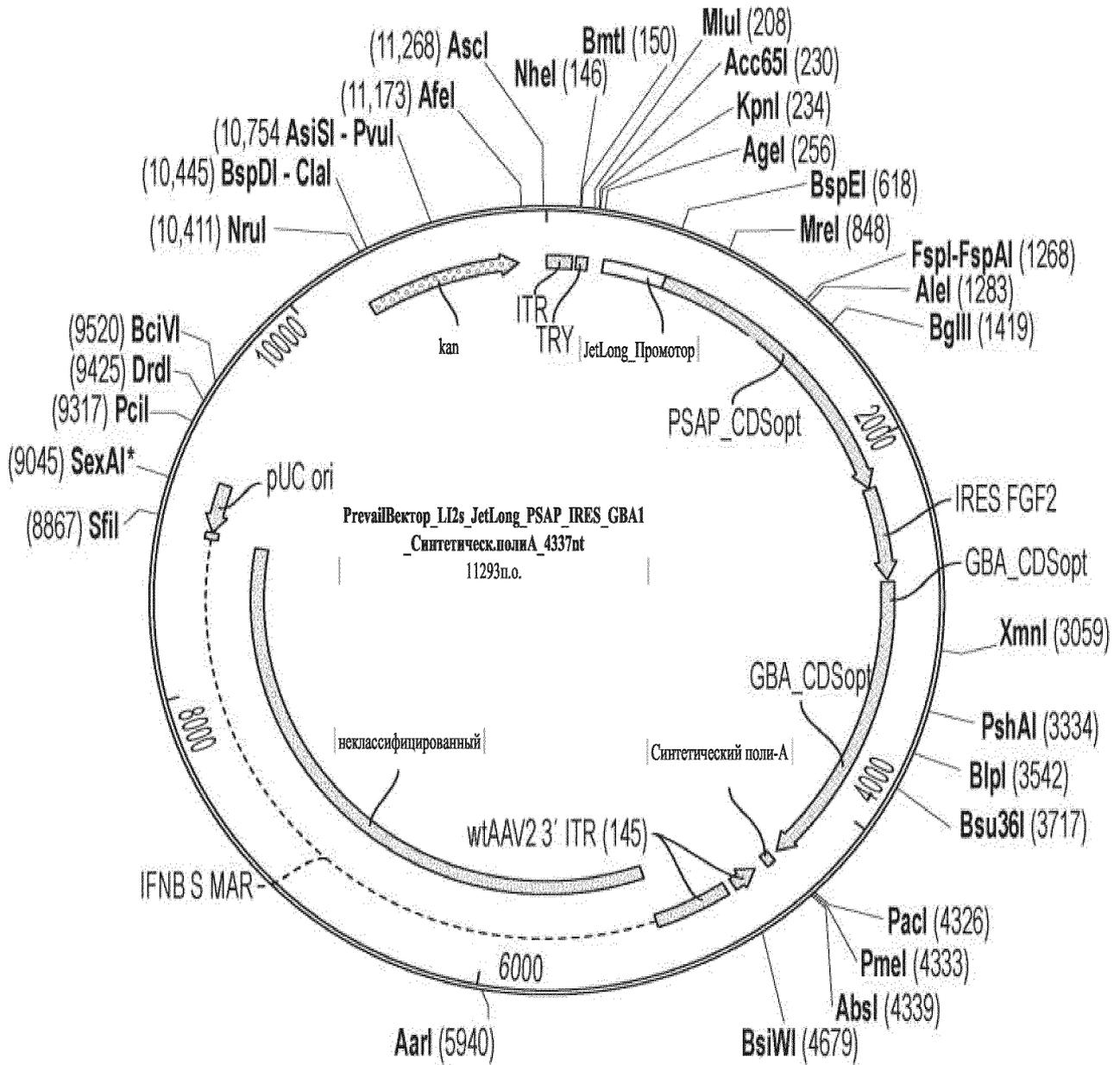
Фиг. 3



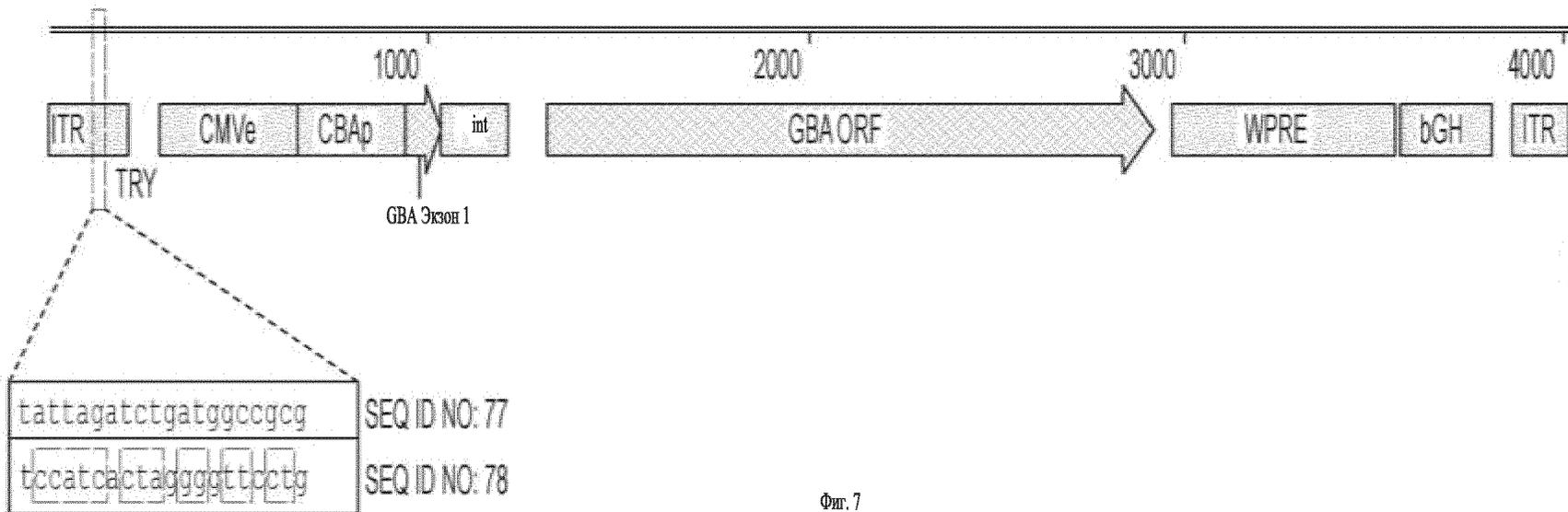
Фиг. 4



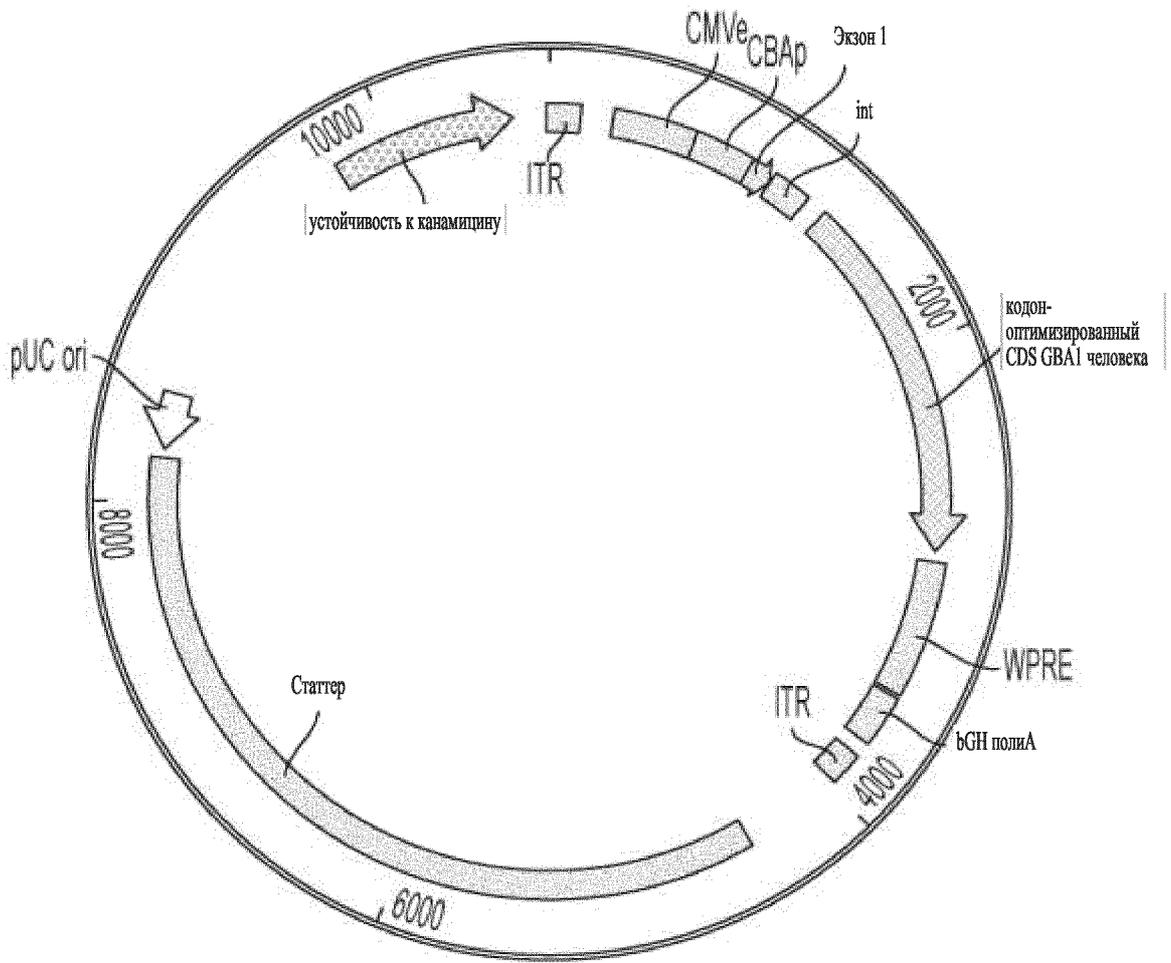
Фиг. 5



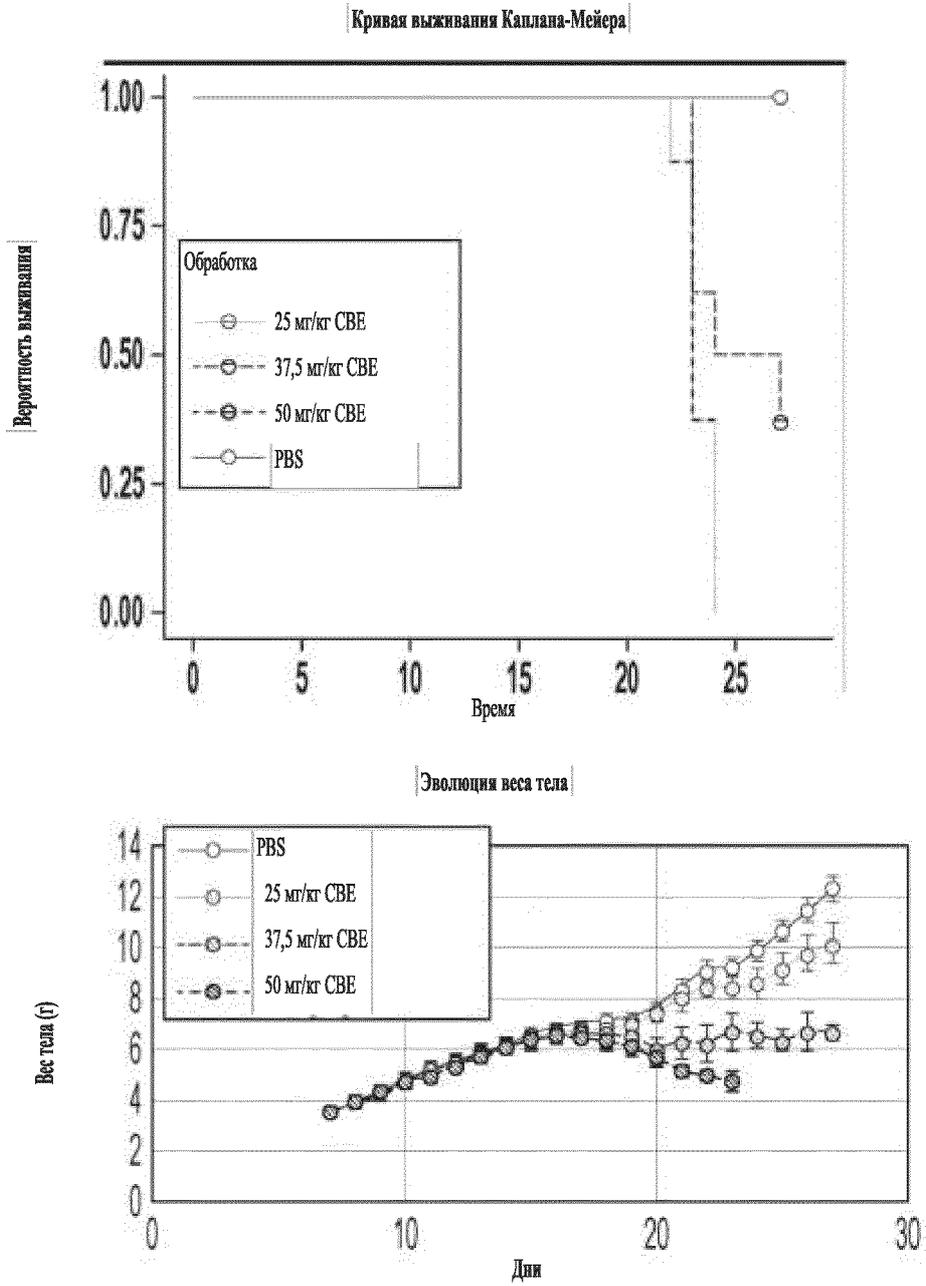
Фиг. 6



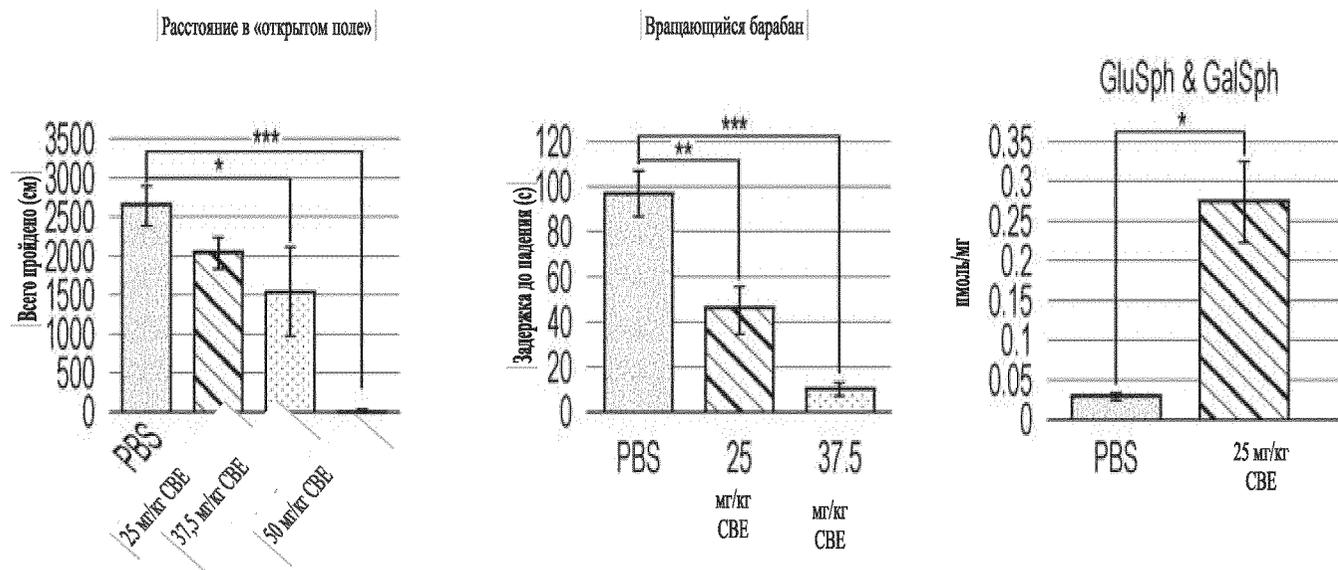
Фиг. 7



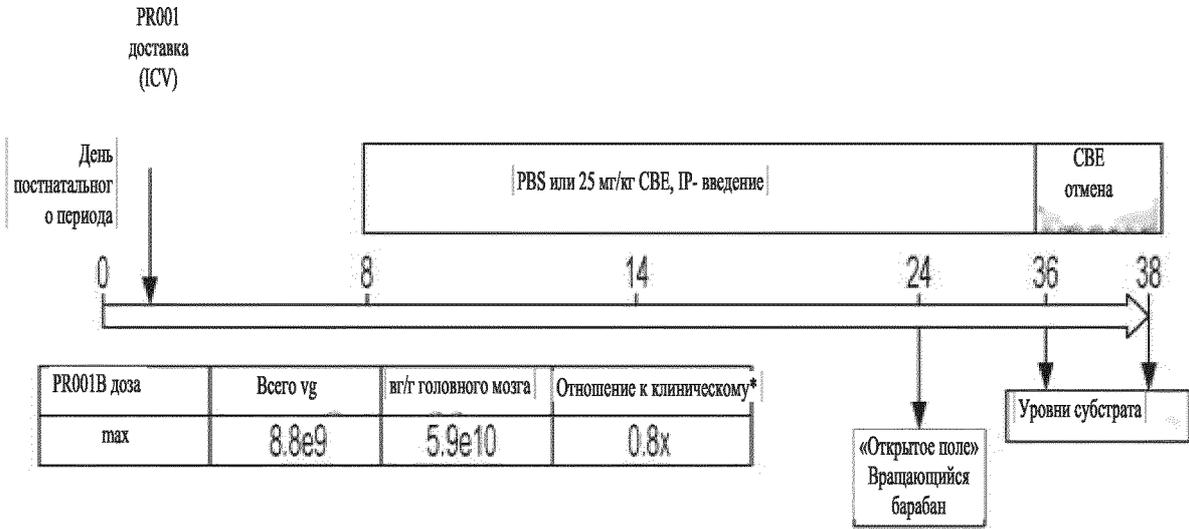
Фиг. 8



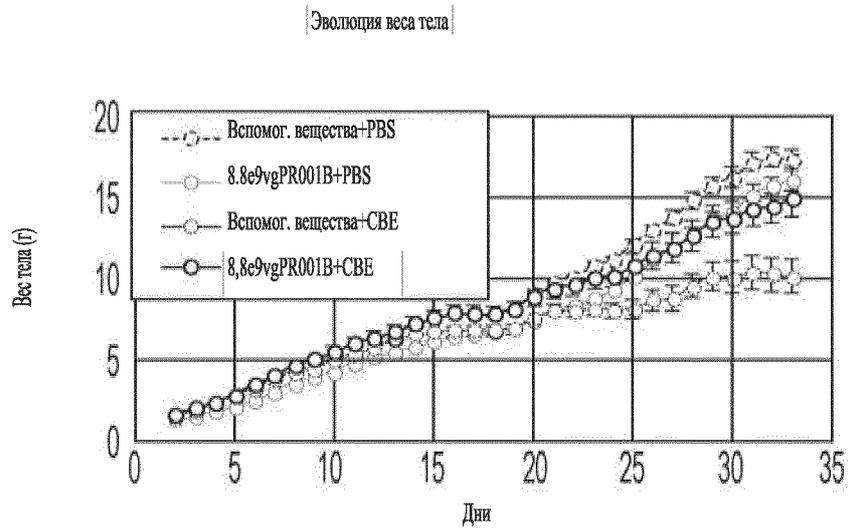
Фиг. 9



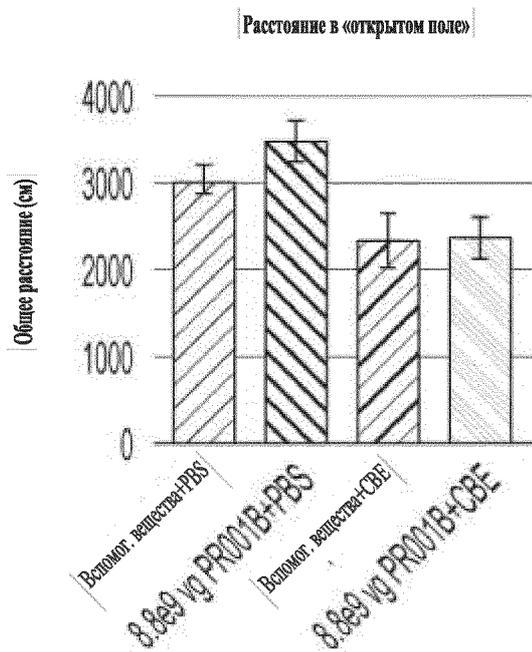
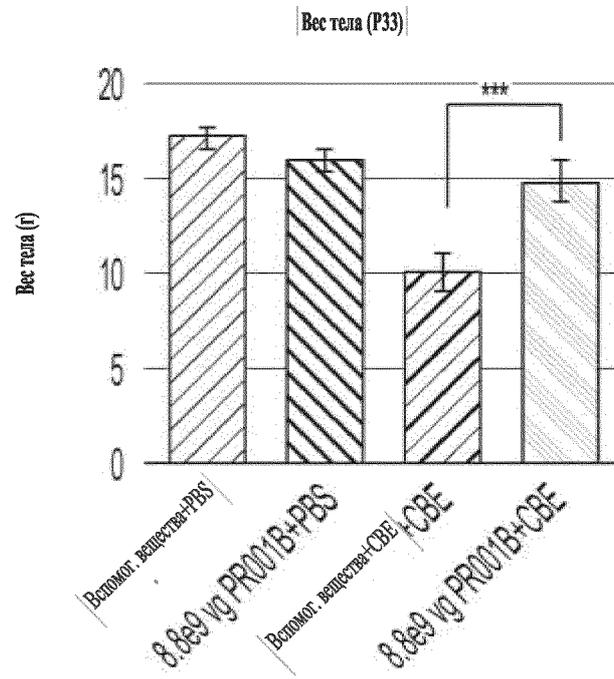
Фиг. 9 (продолжение)



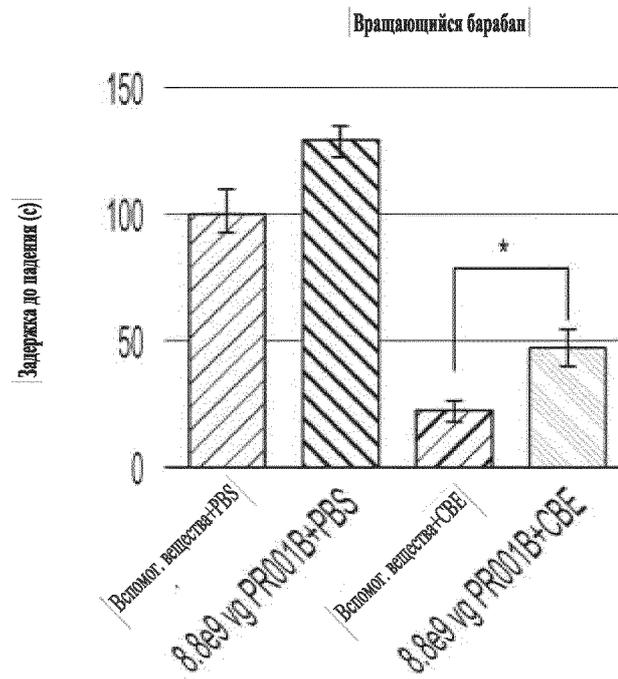
Фиг. 10



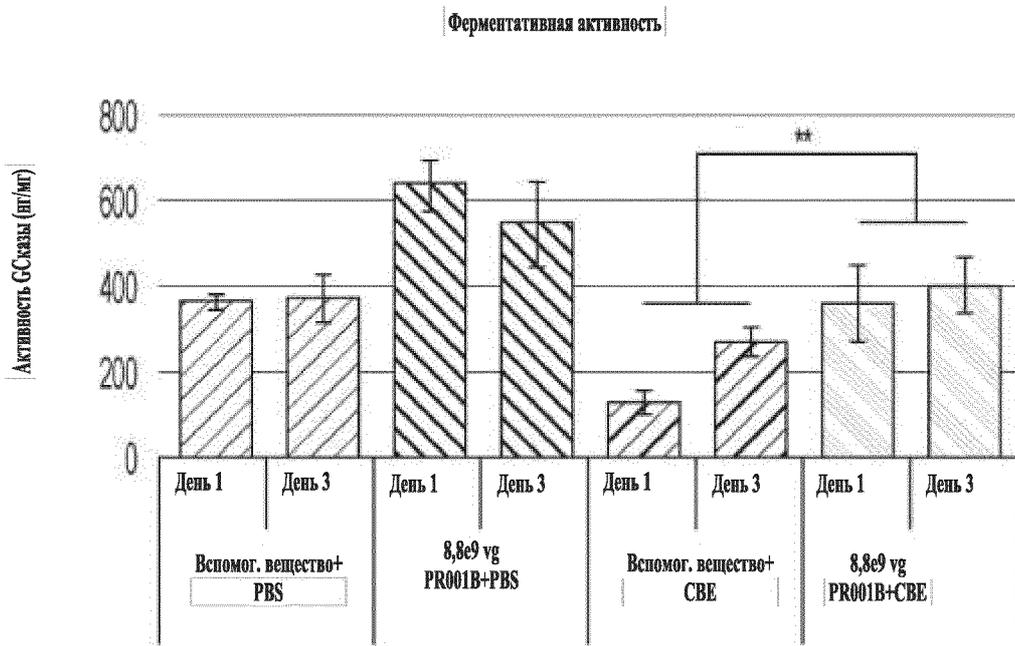
Фиг. 11



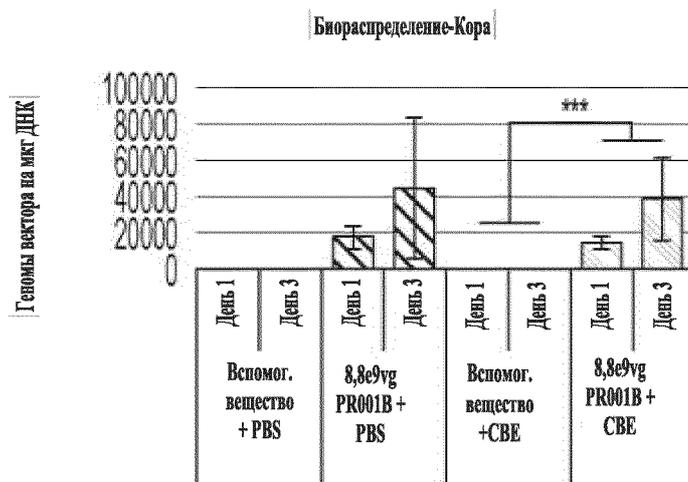
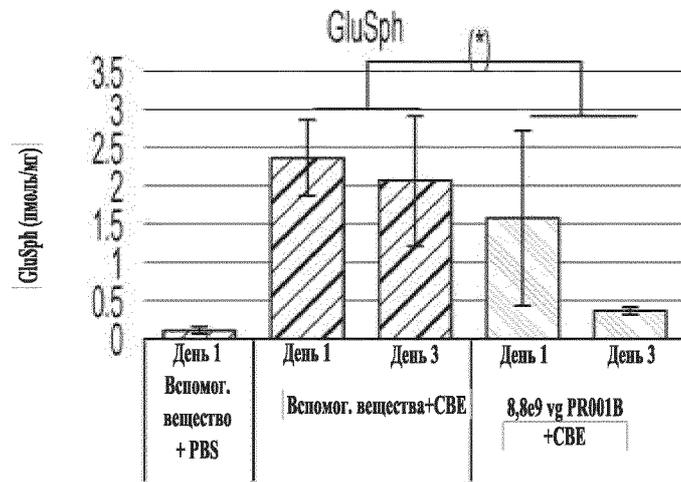
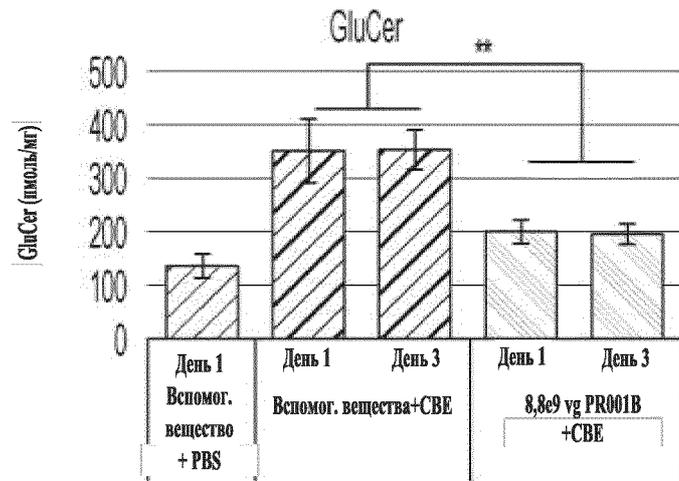
Фиг. 11 (продолжение)



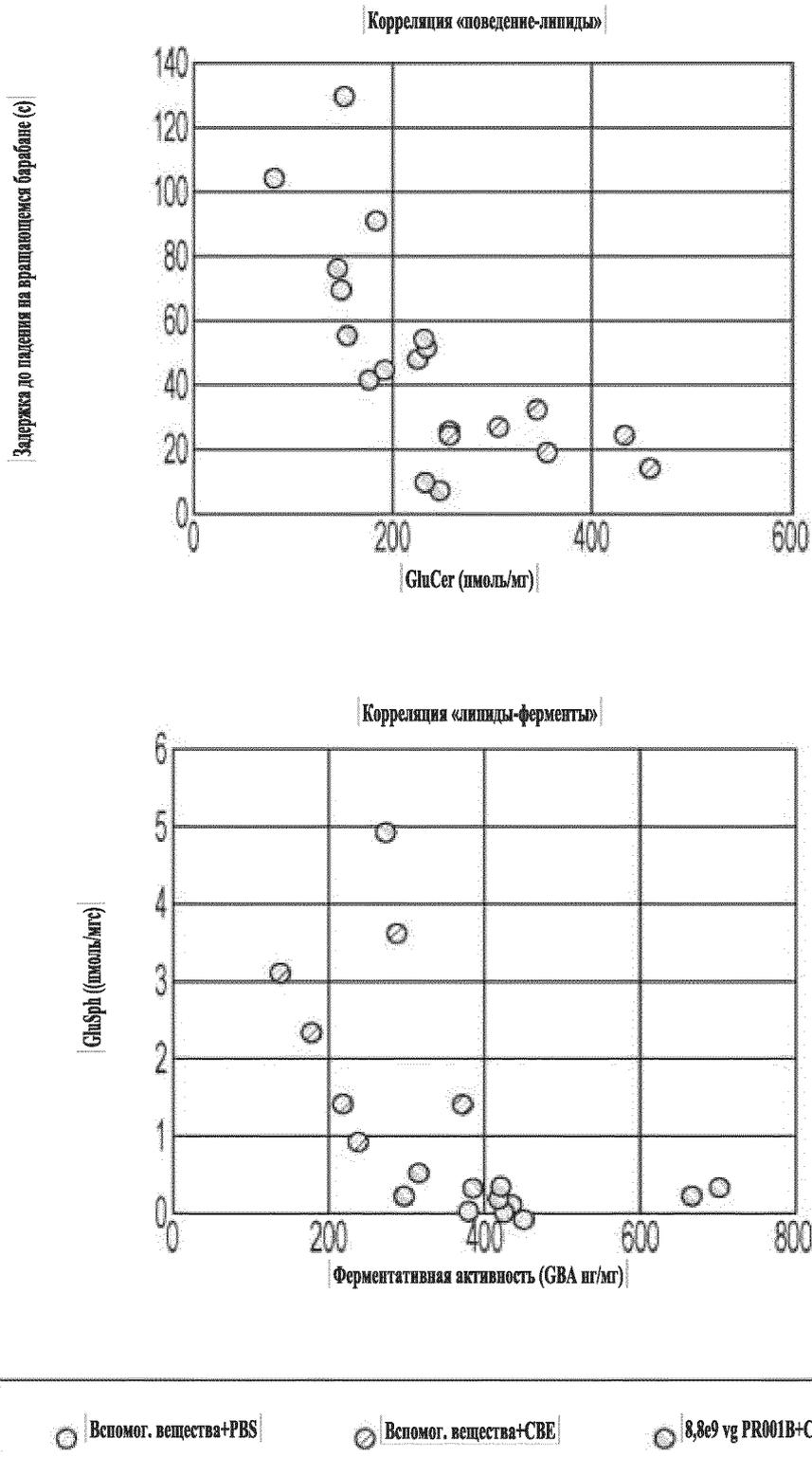
Фиг. 11 (продолжение)



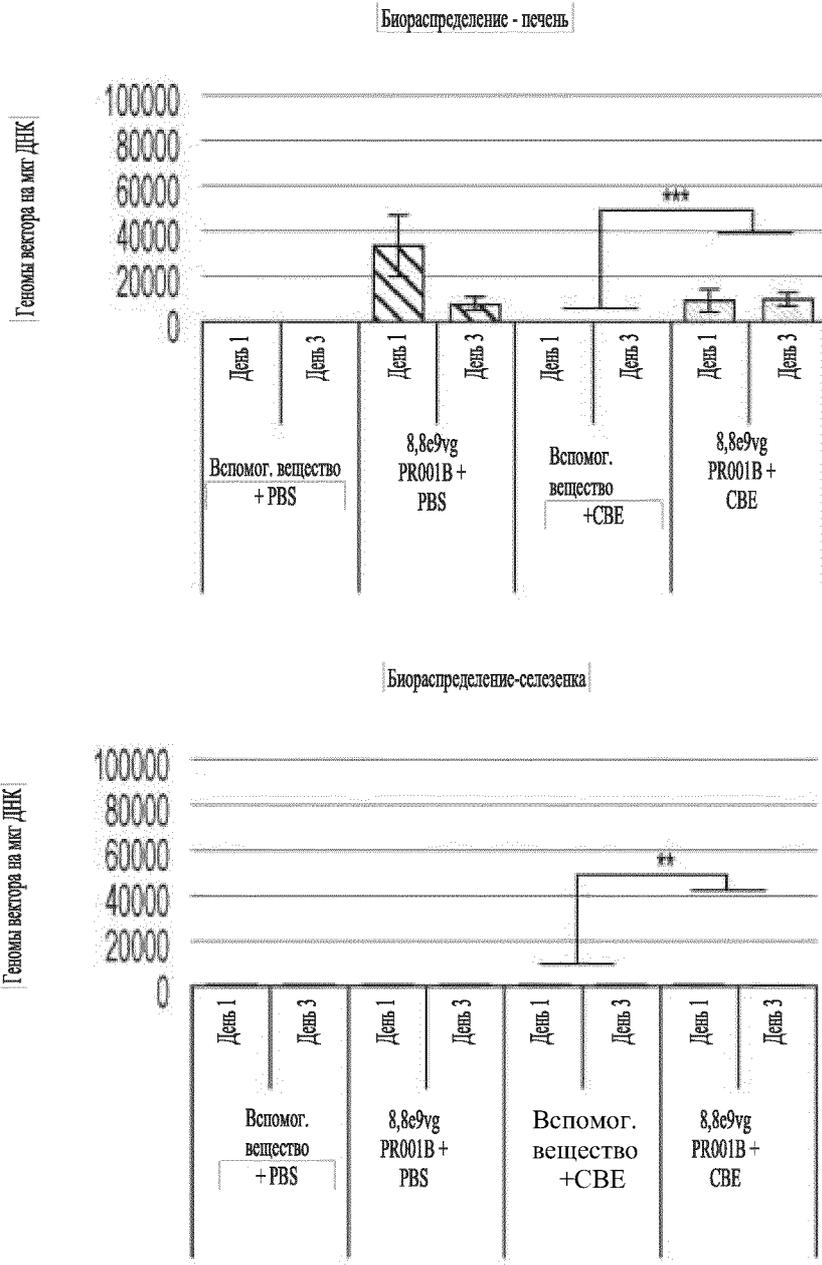
Фиг. 12



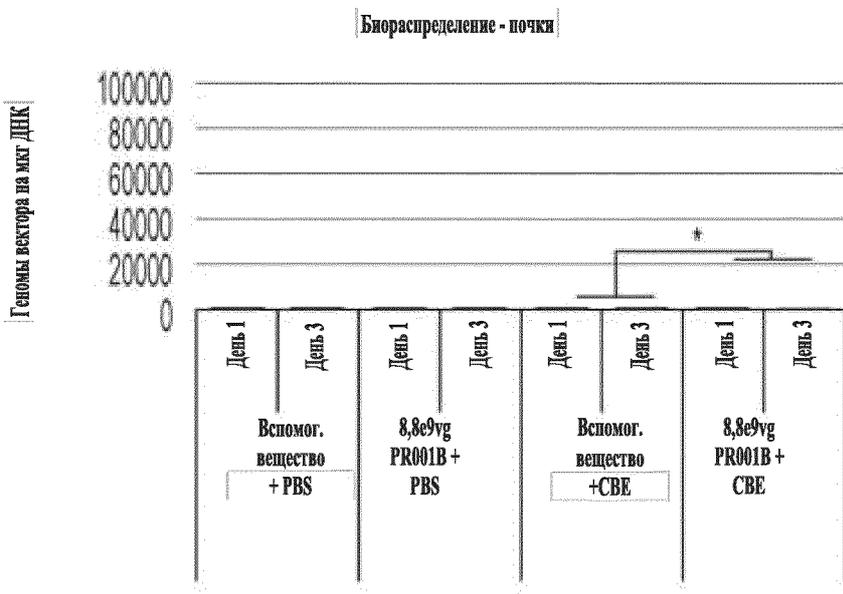
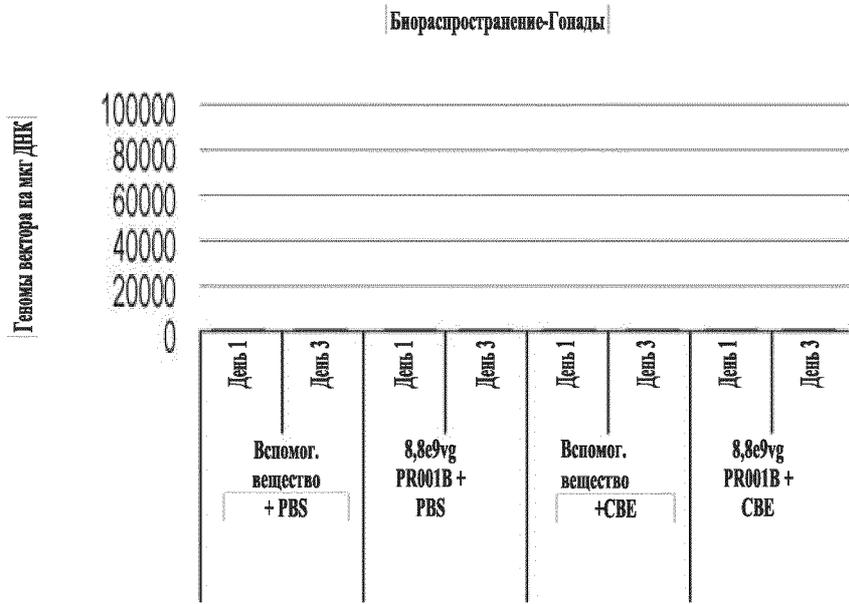
Фиг. 12 (продолжение)



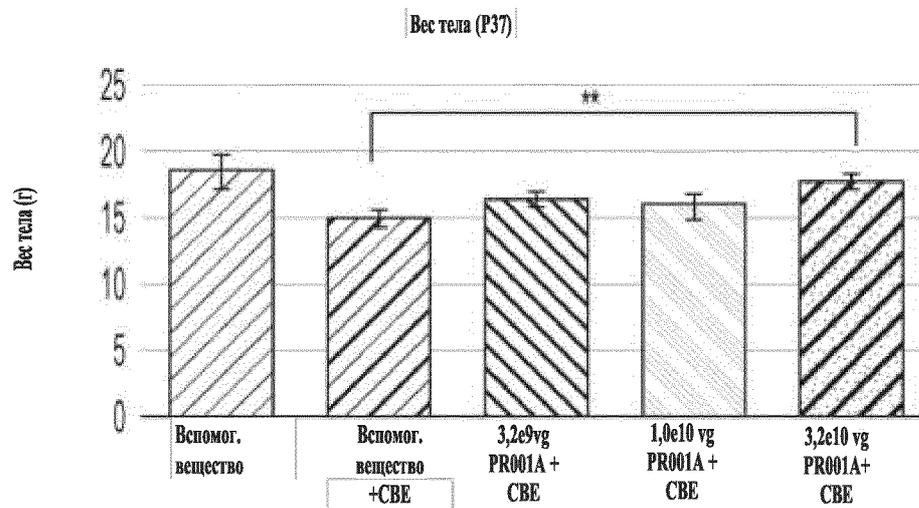
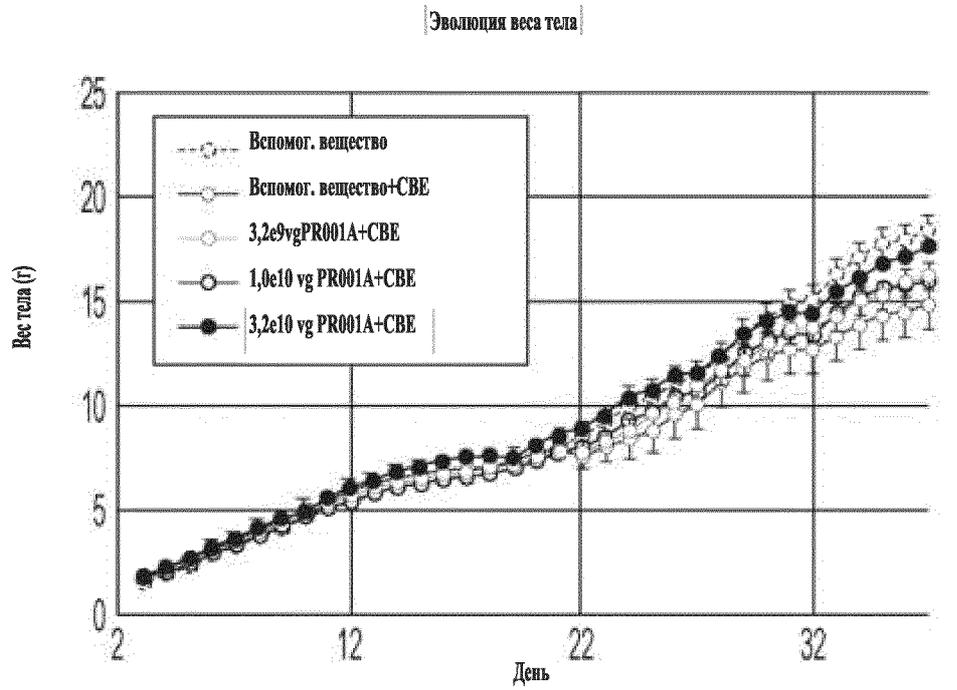
Фиг. 13



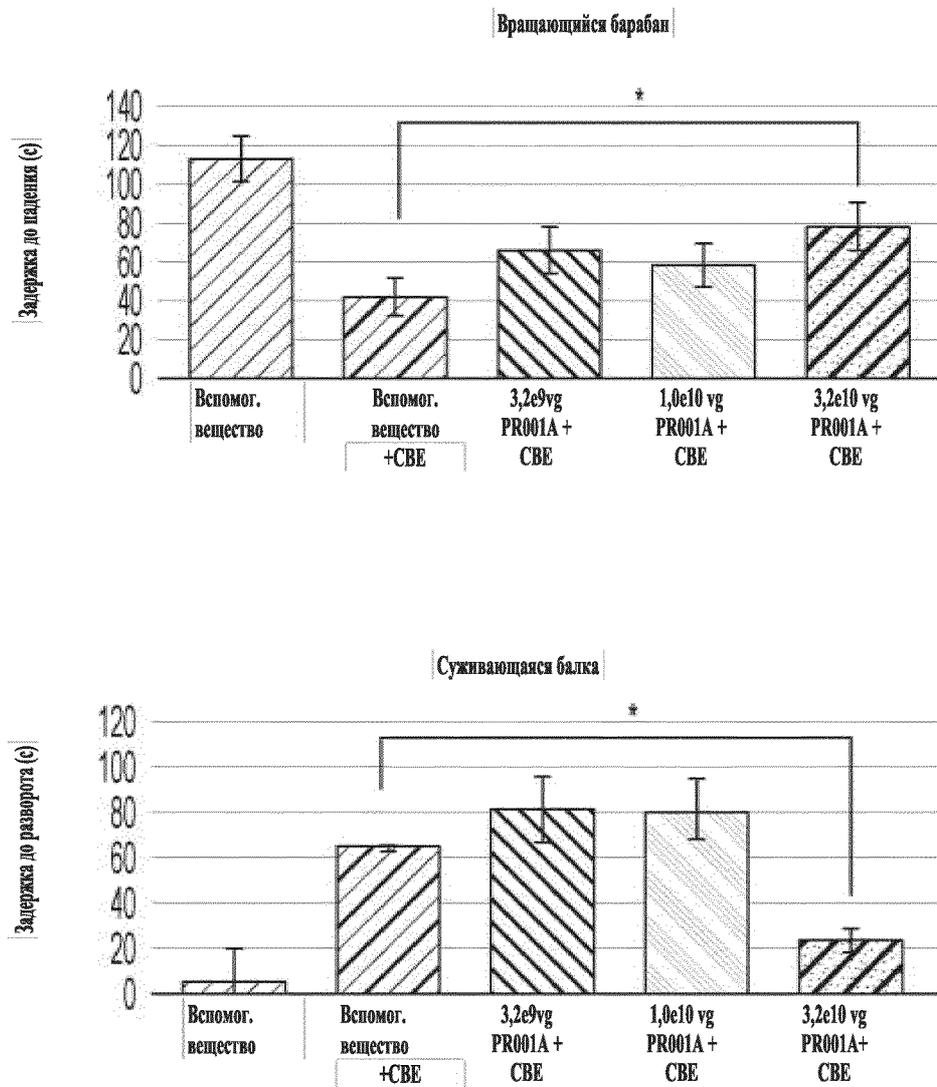
Фиг. 14



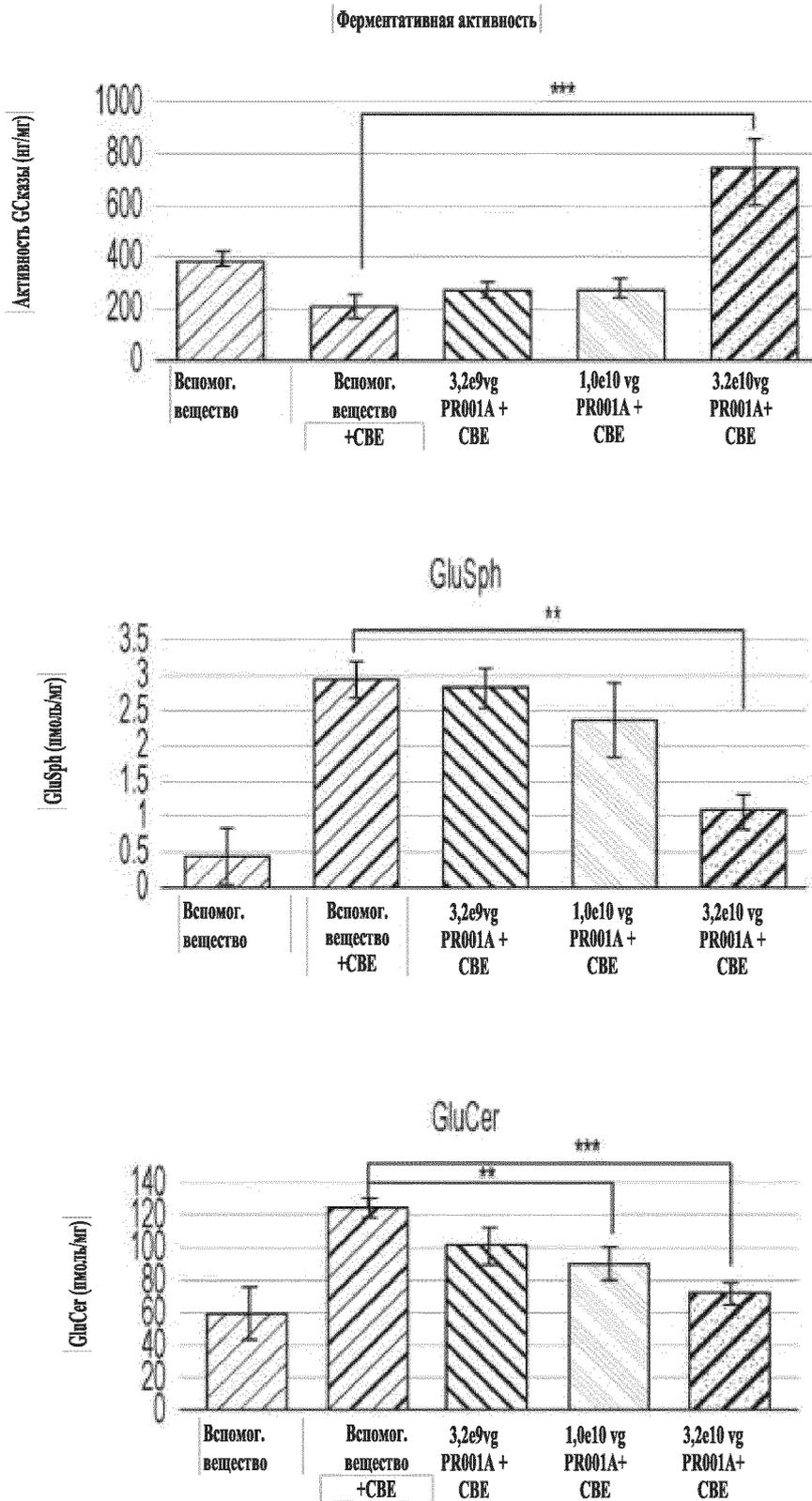
Фиг. 14 (продолжение)



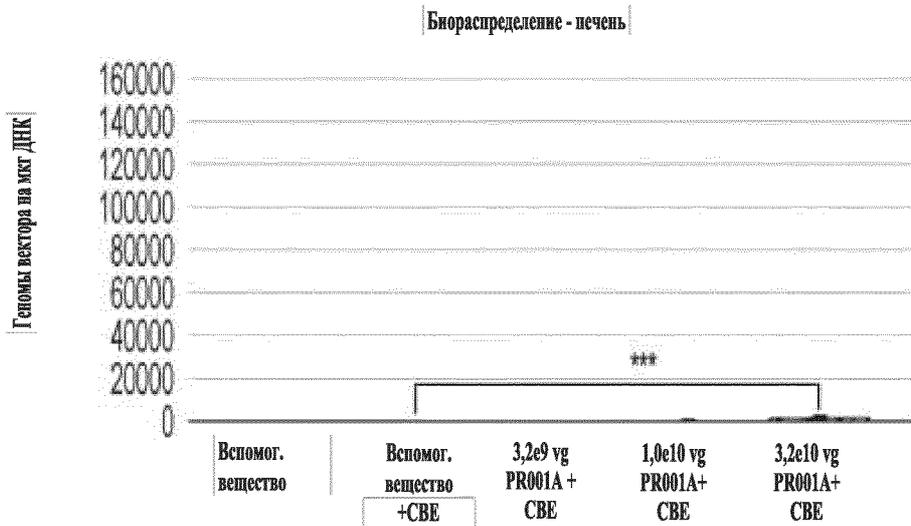
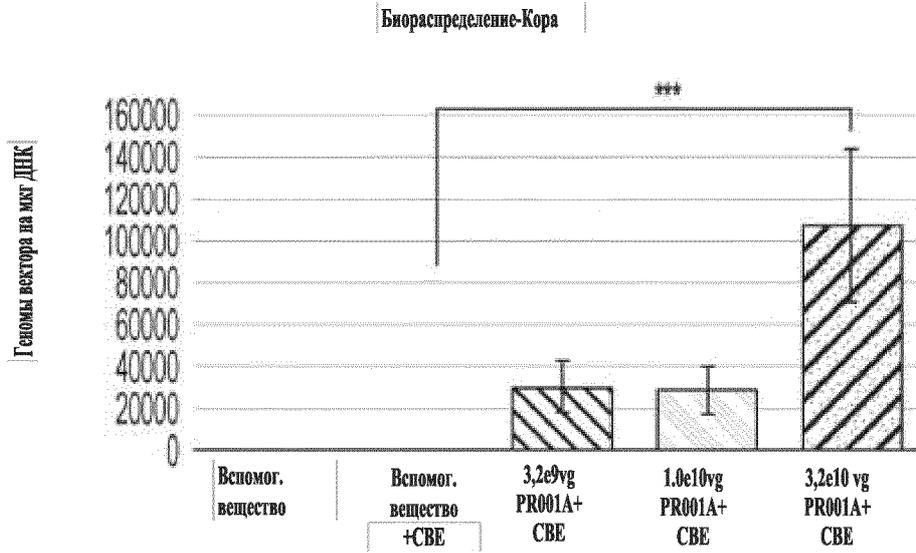
Фиг. 15



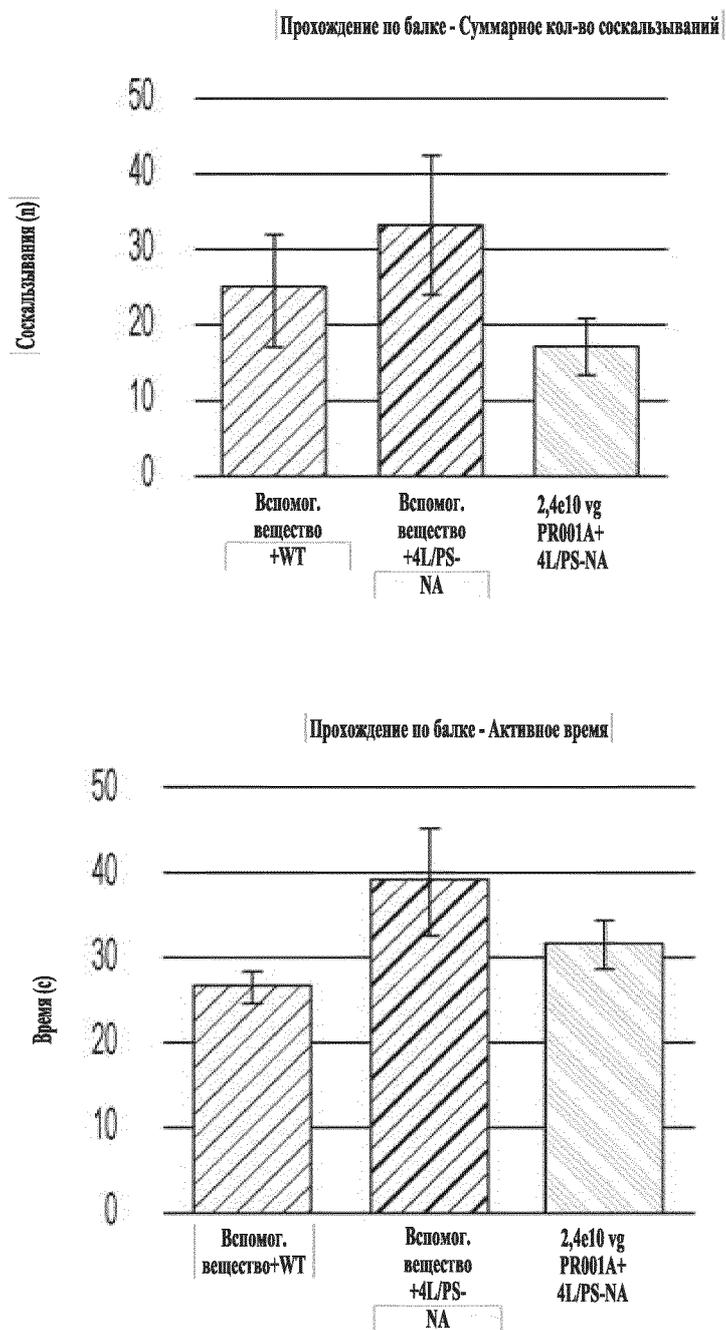
Фиг. 15 (продолжение)



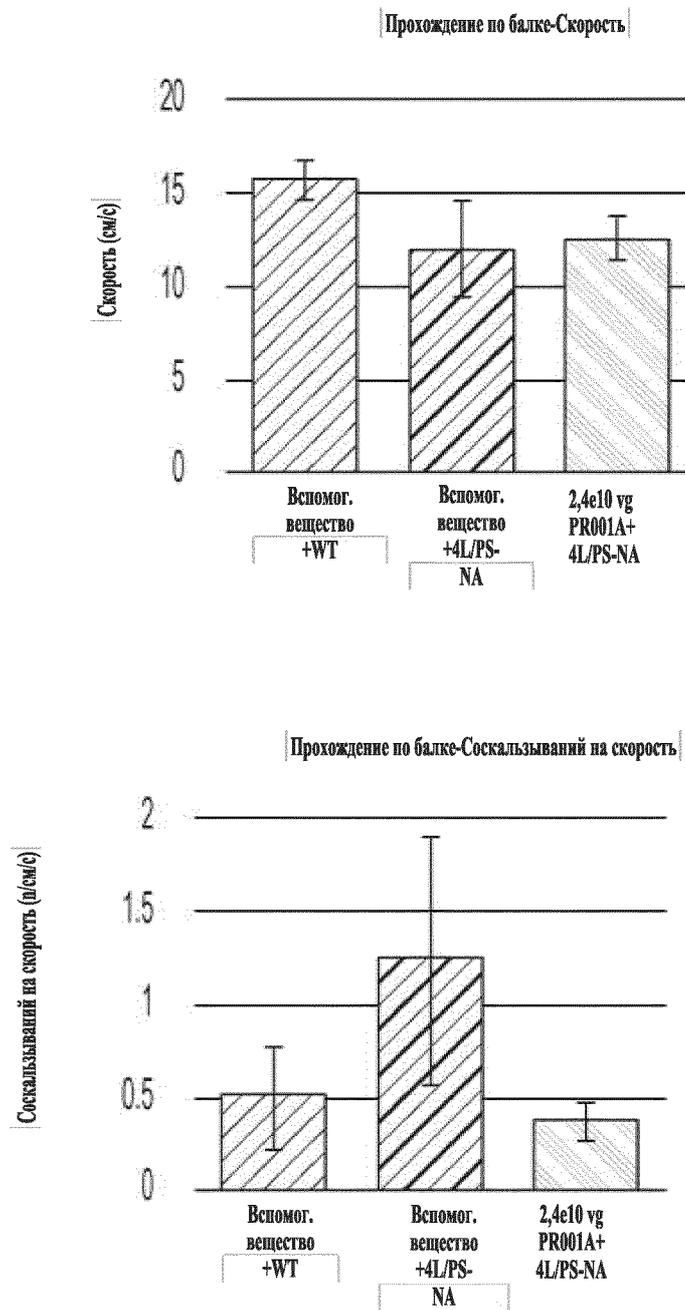
Фиг. 16



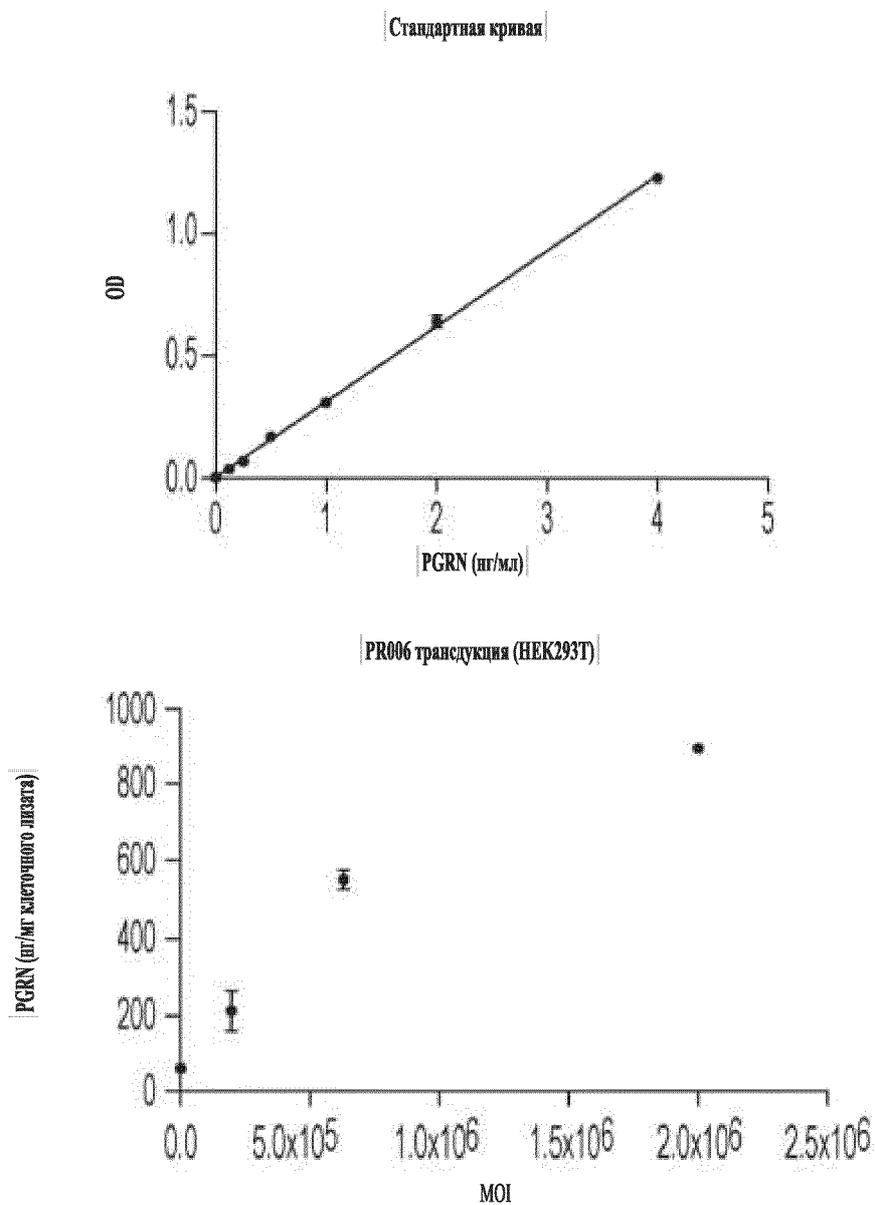
Фиг. 16 (продолжение)



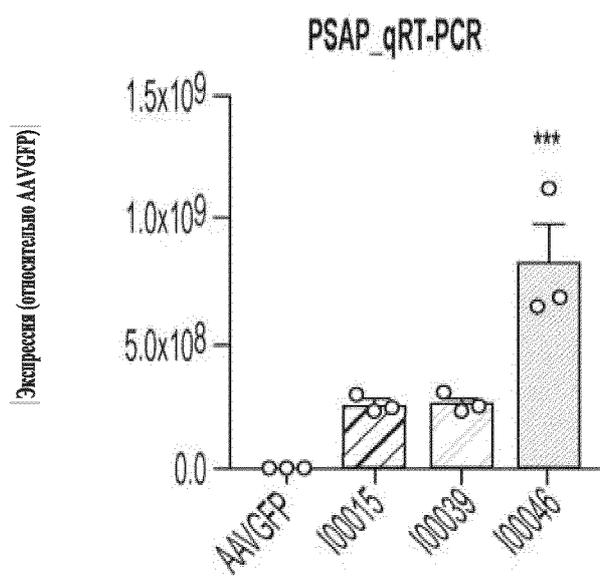
Фиг. 17



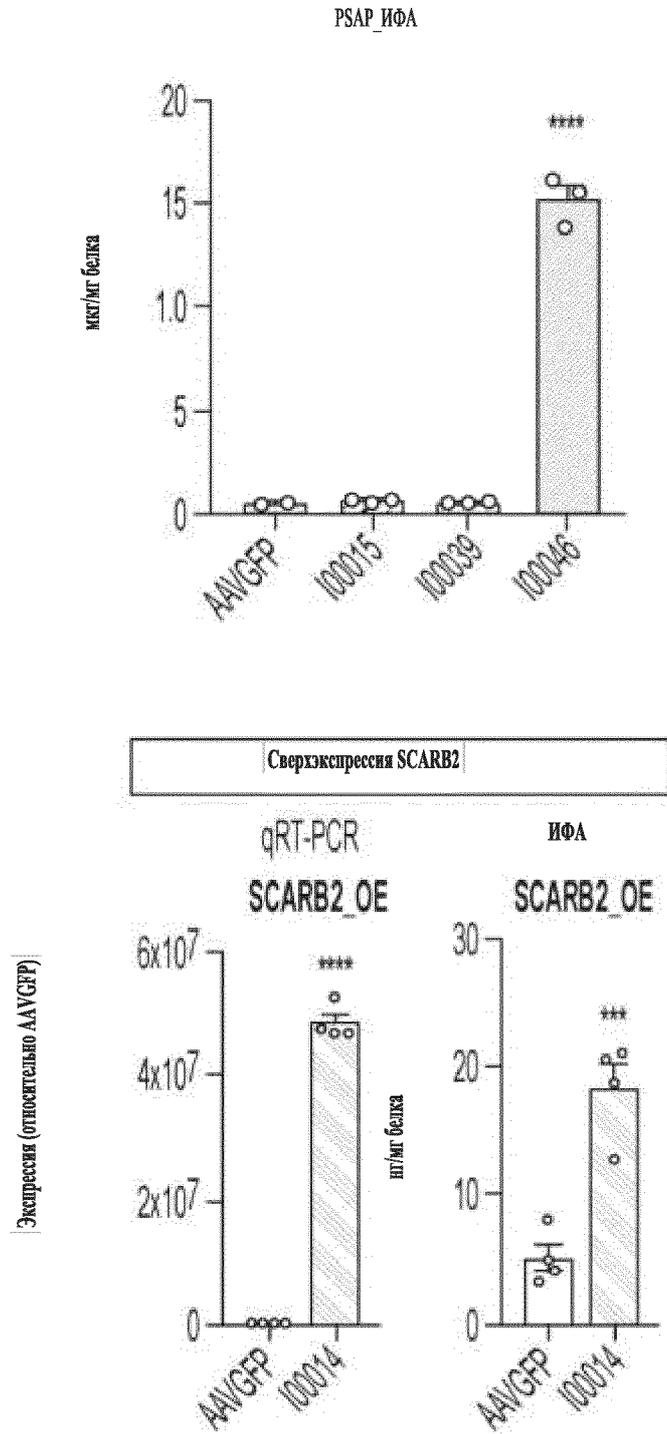
[Фиг. 17 (продолж.)]



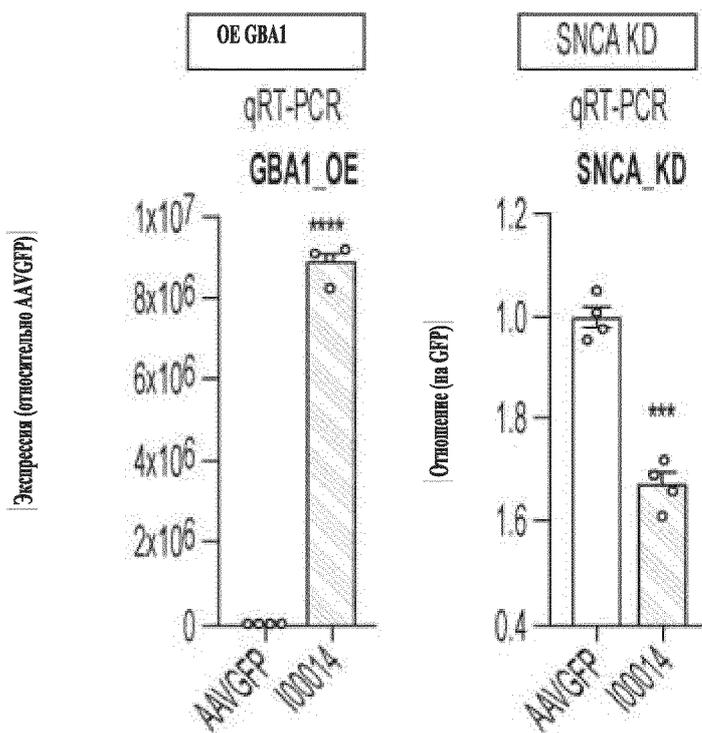
Фиг. 18



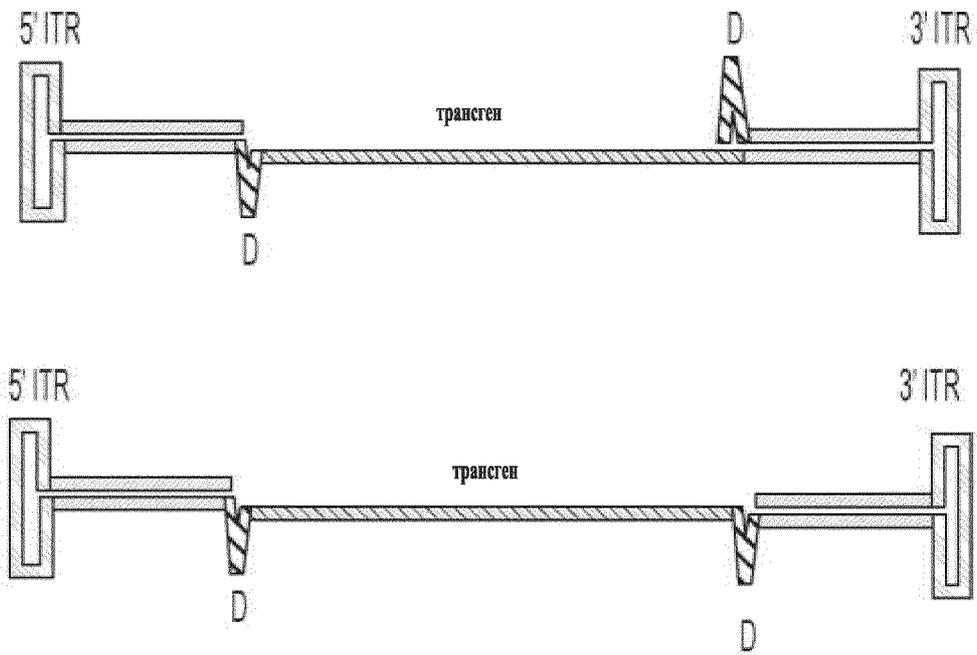
Фиг. 19



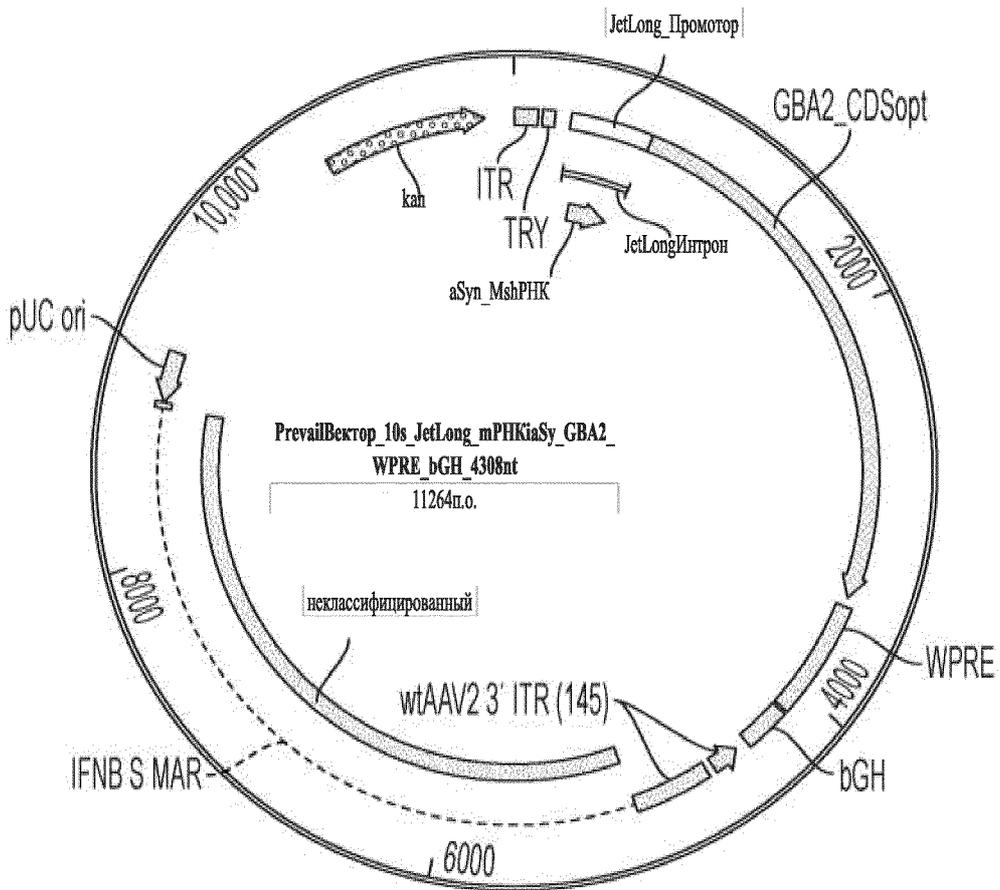
Фиг. 19 (продолжение)



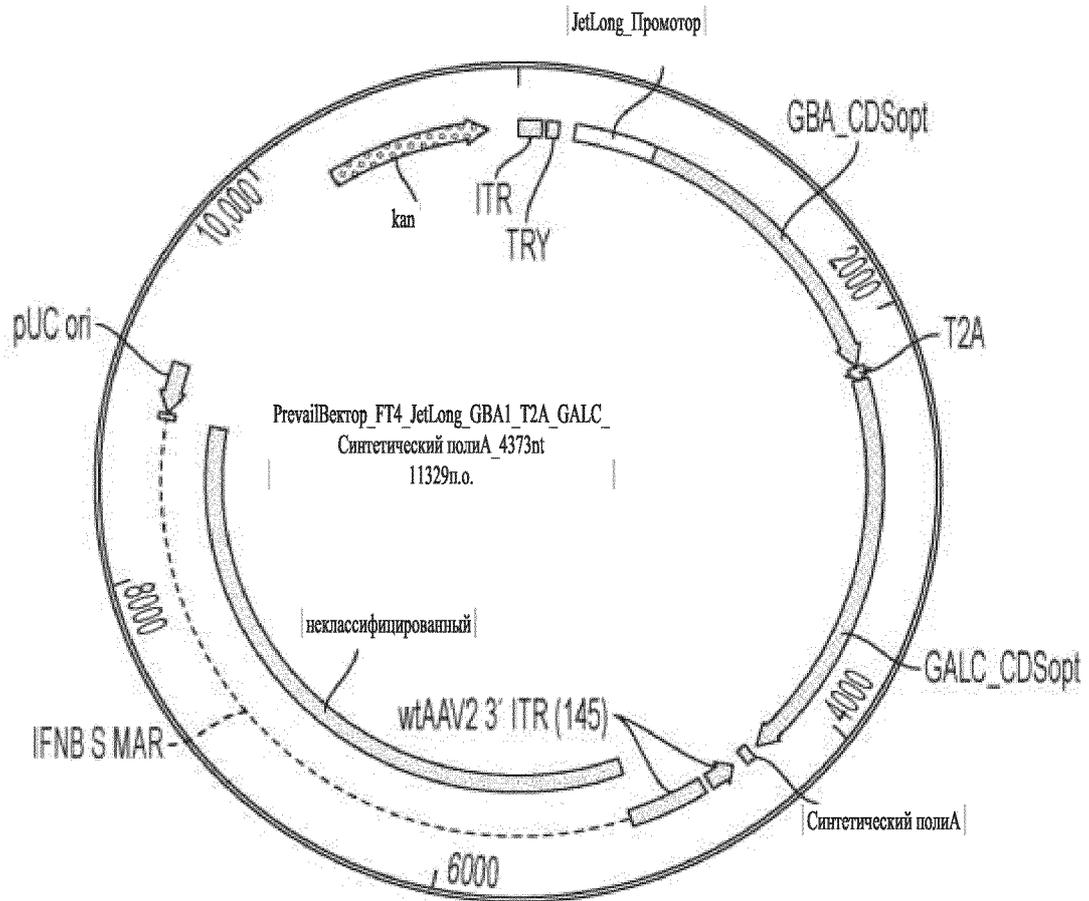
Фиг. 19 (продолжение)



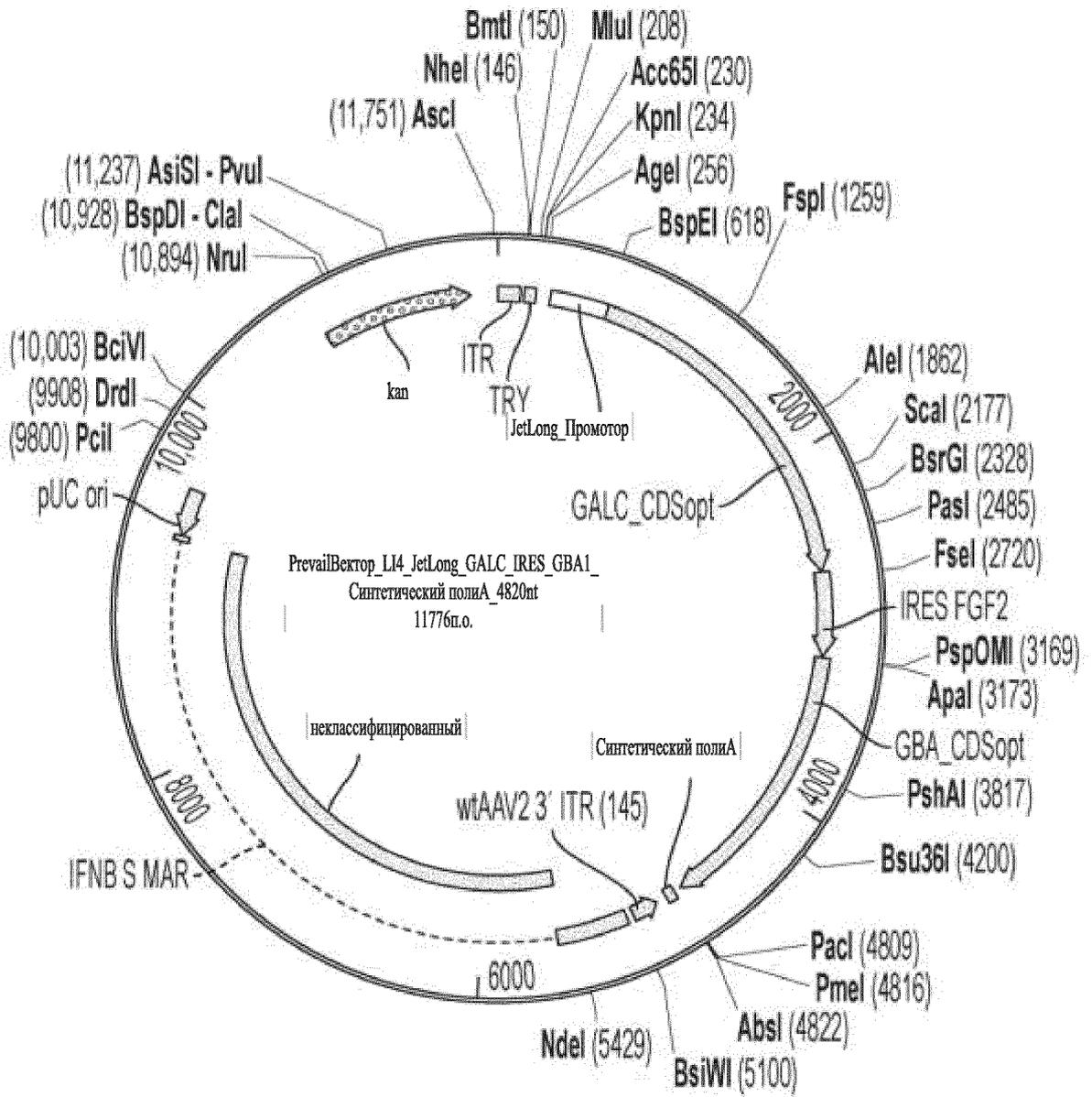
Фиг. 20



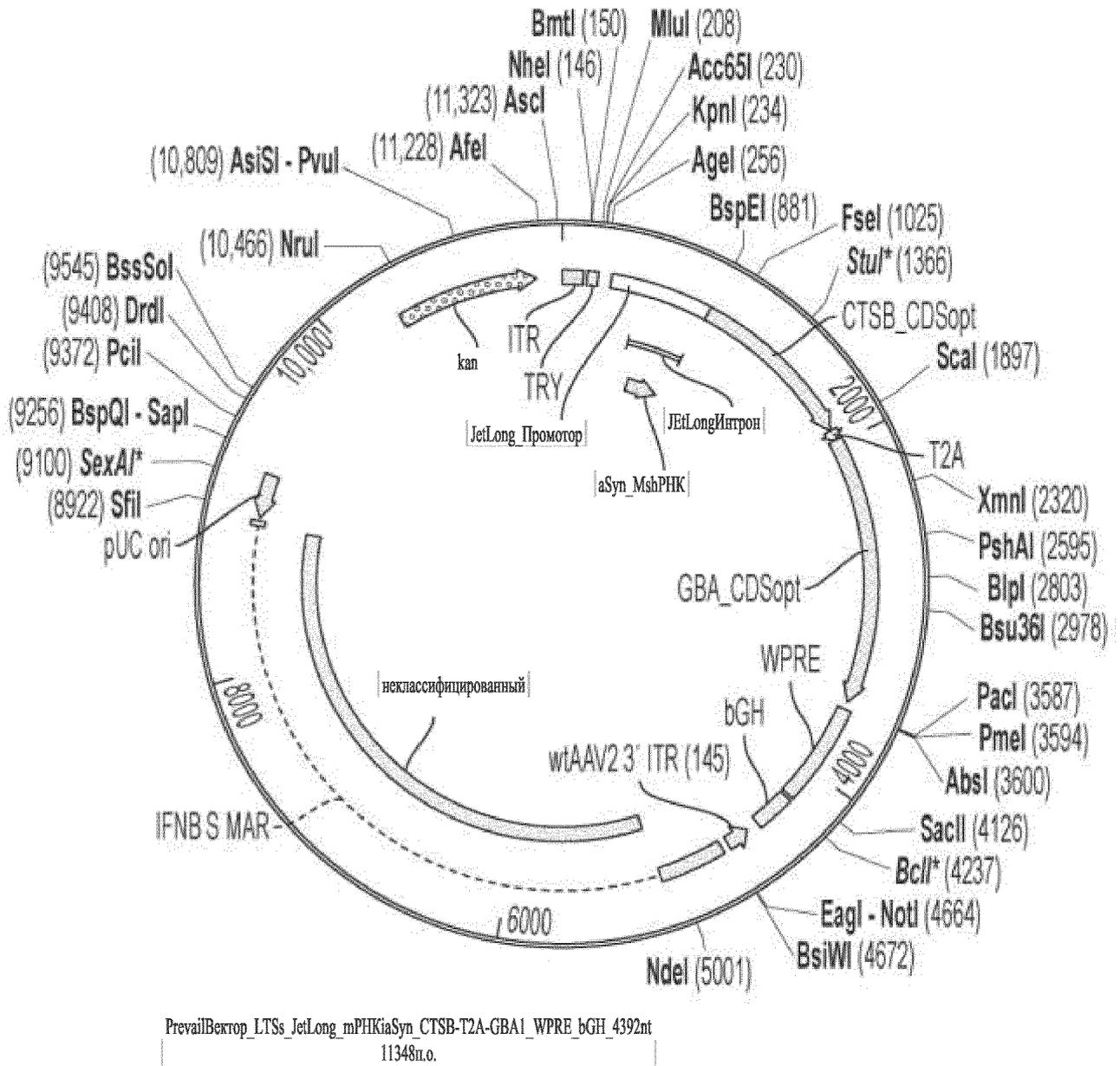
Фиг. 21



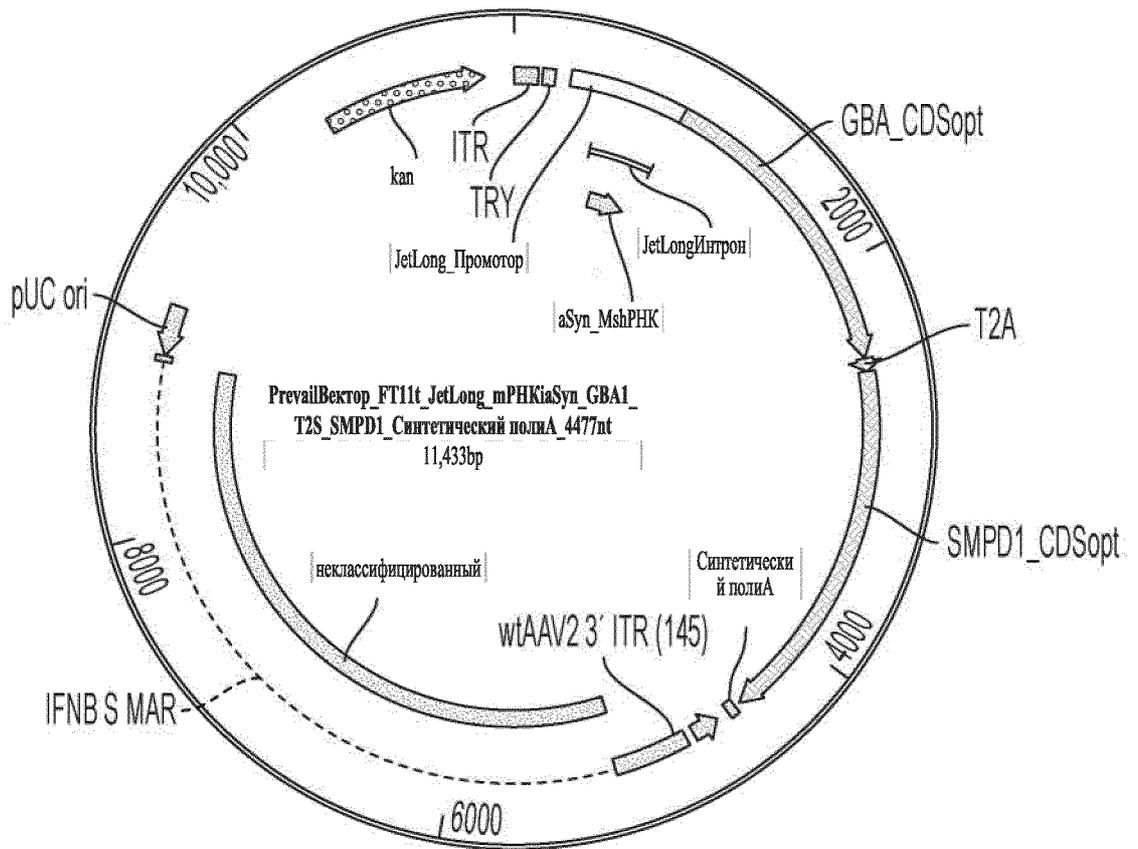
Фиг. 22



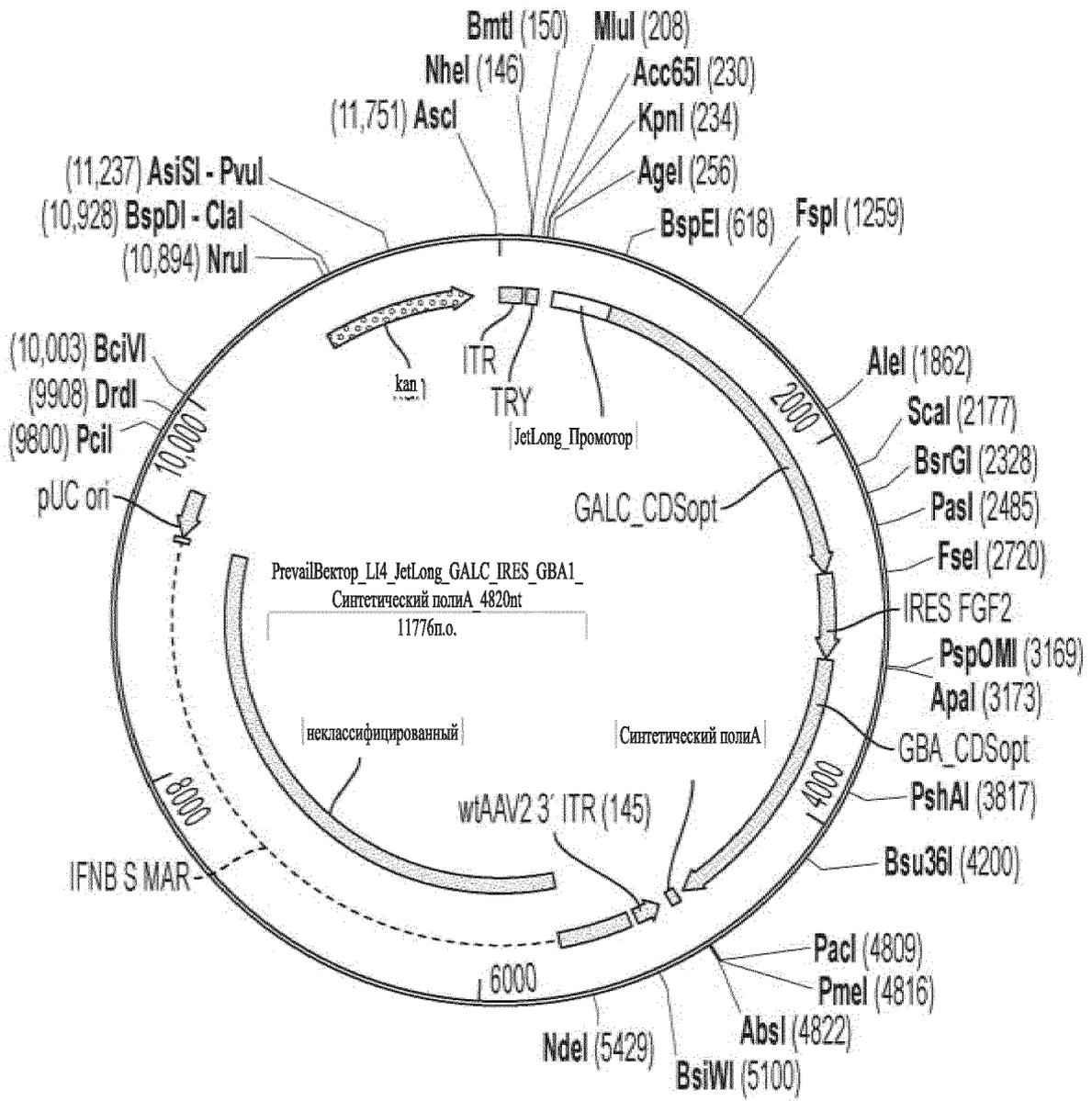
Фиг. 23



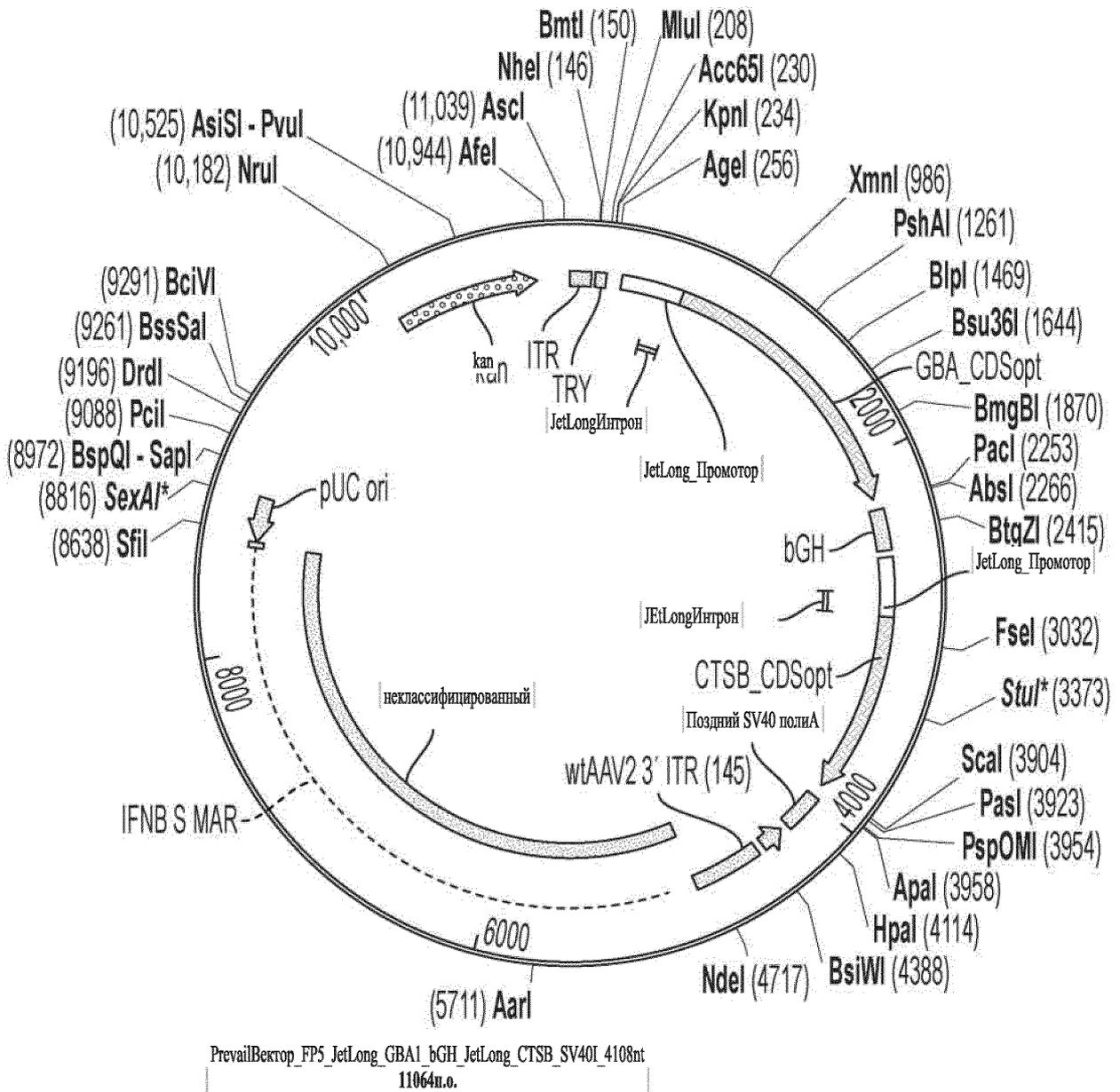
Фиг. 24



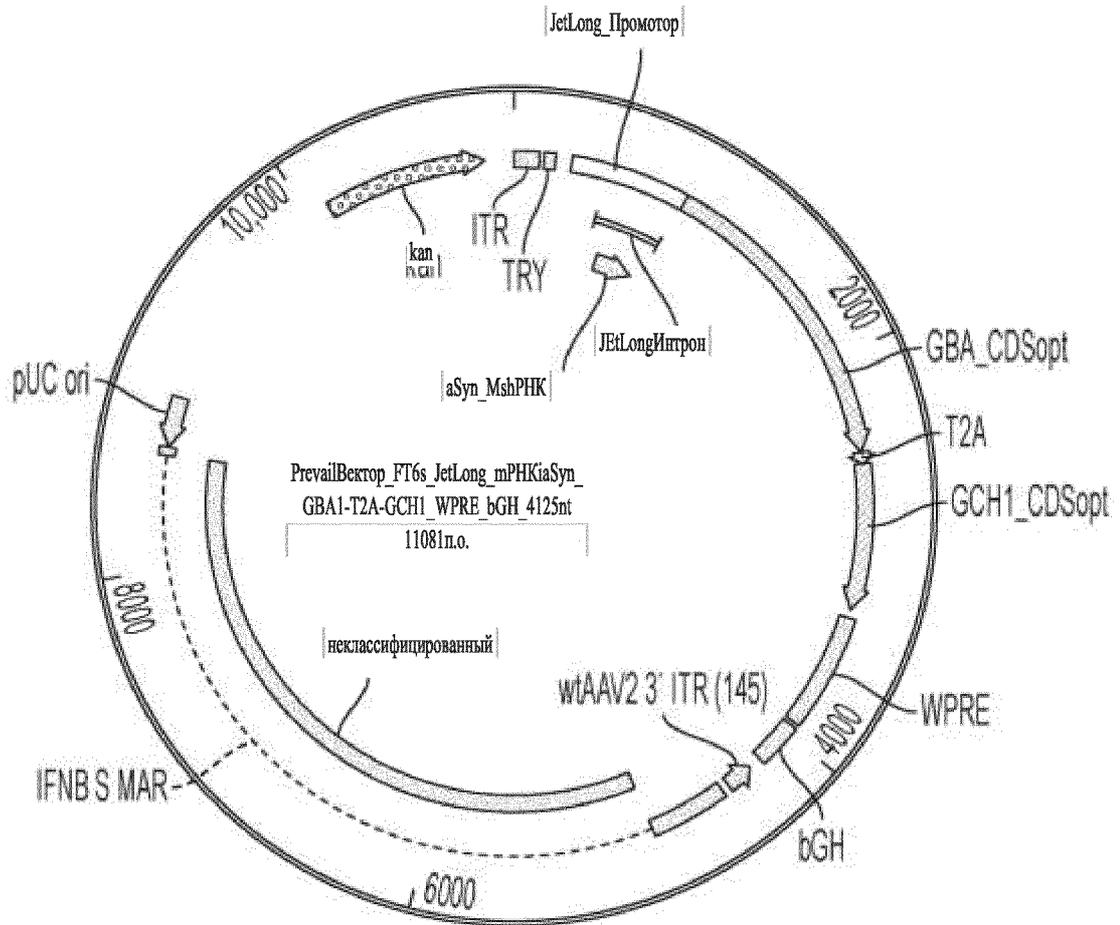
Фиг. 25



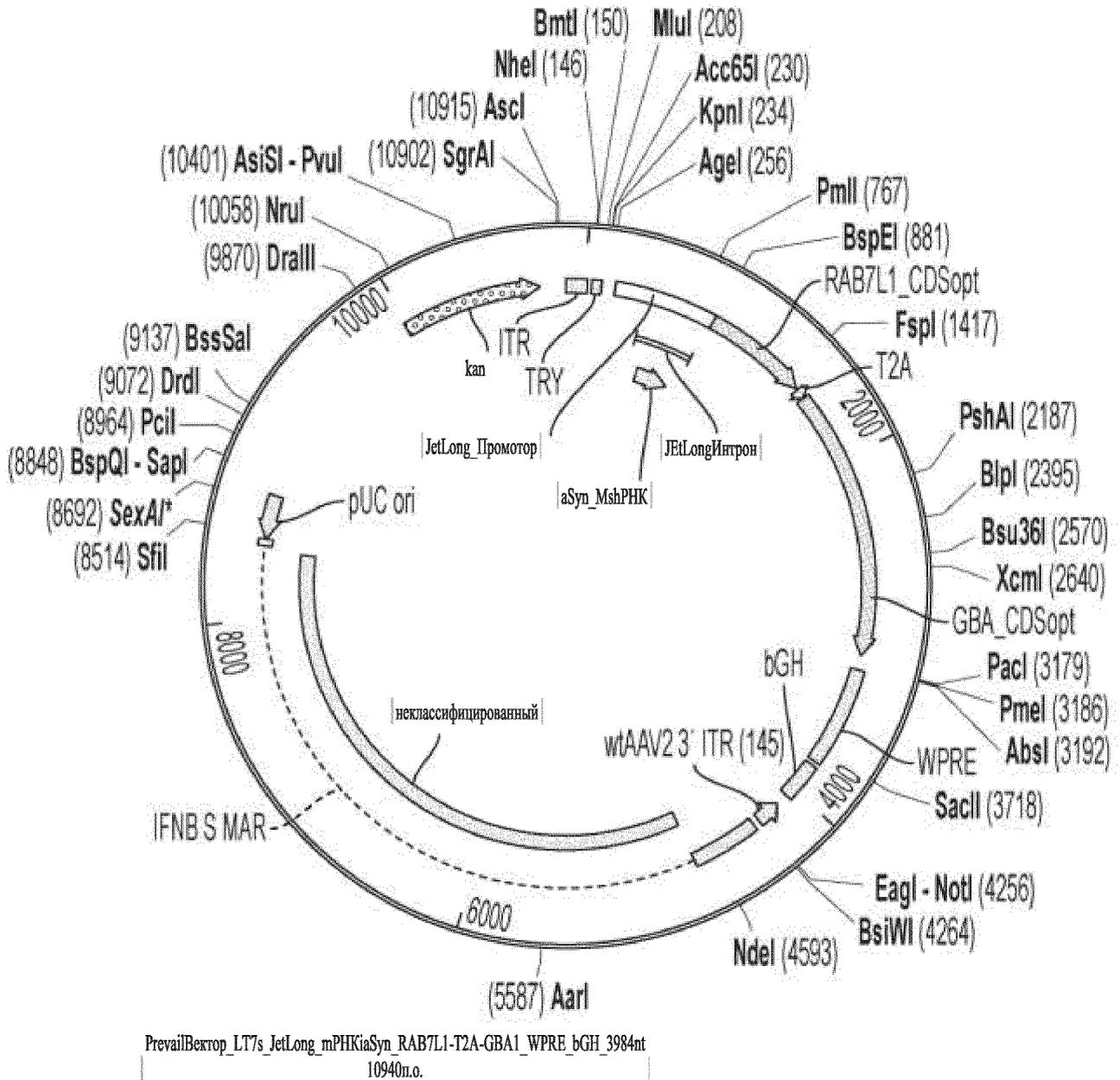
Фиг. 26



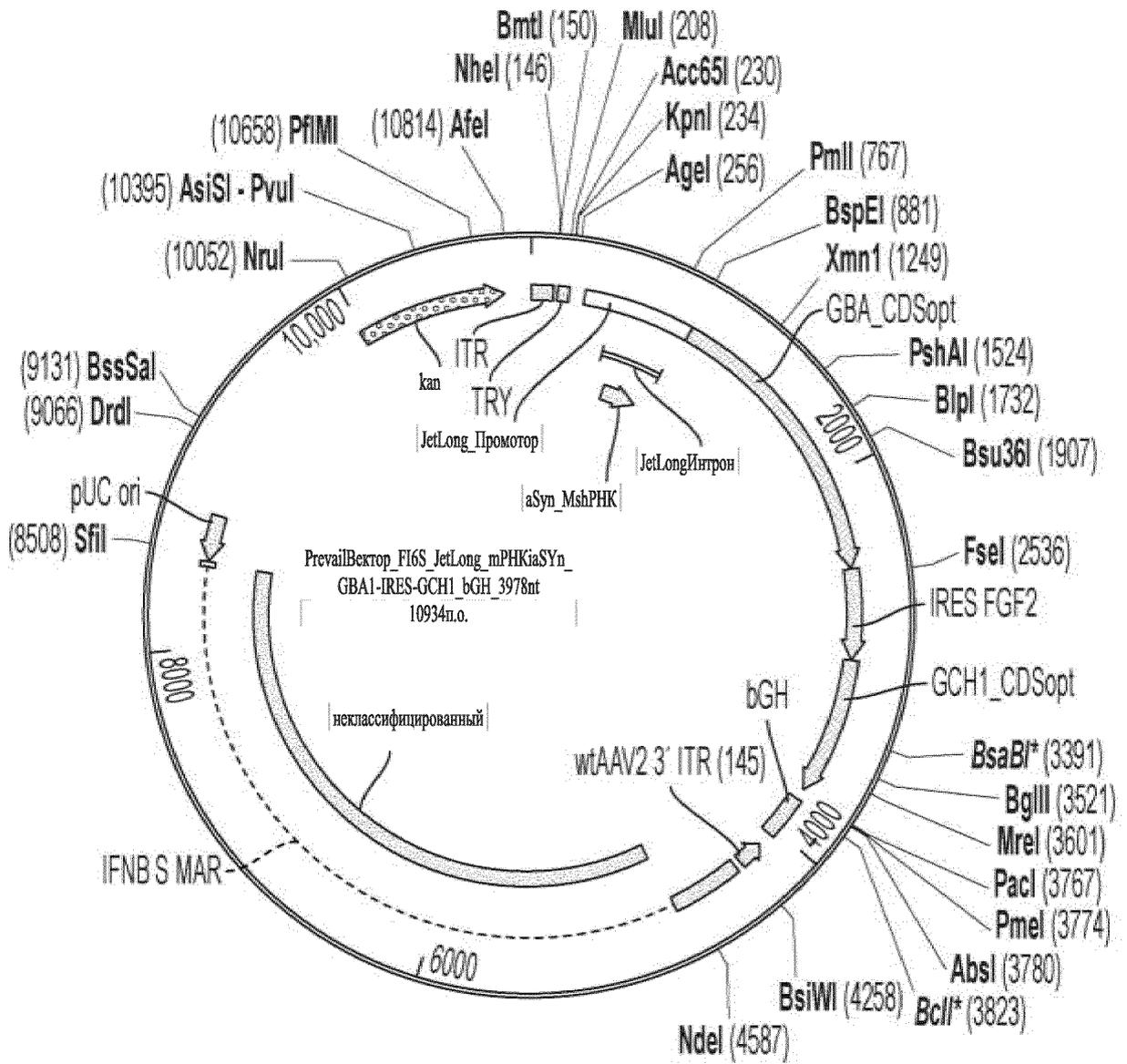
Фиг. 27



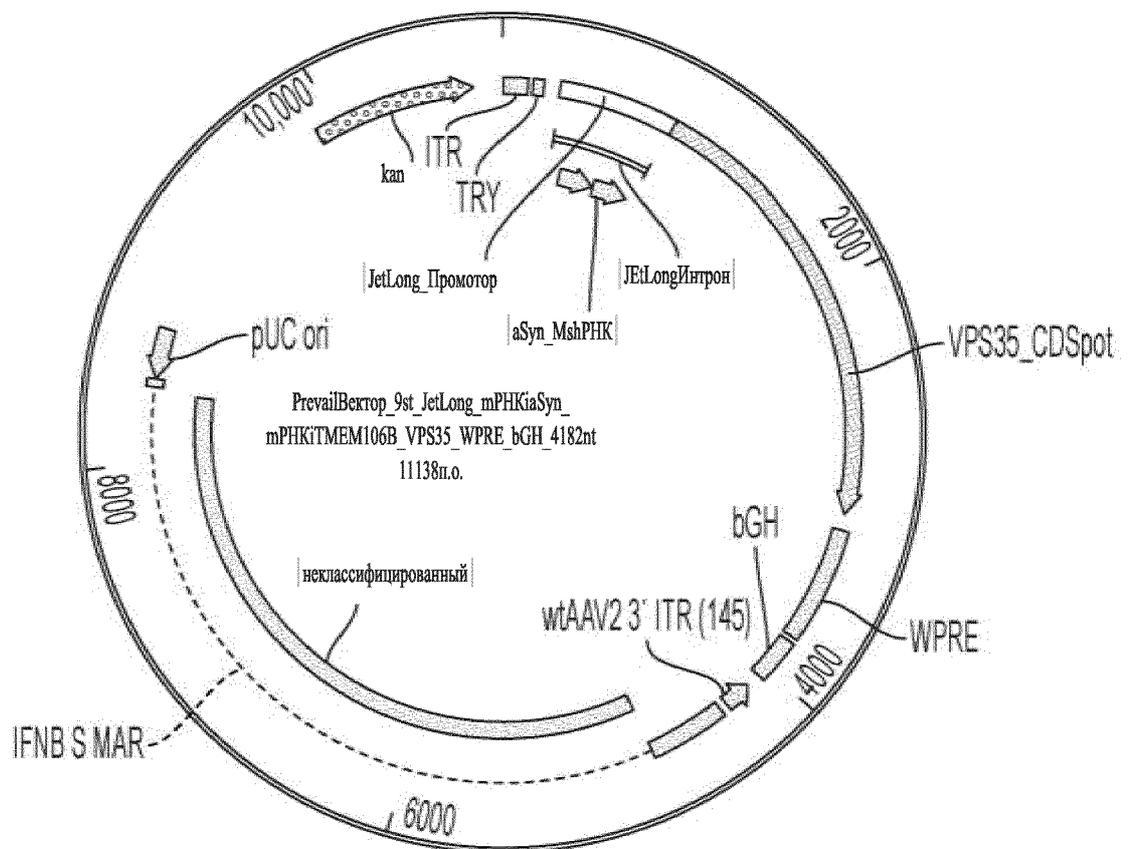
Фиг. 28



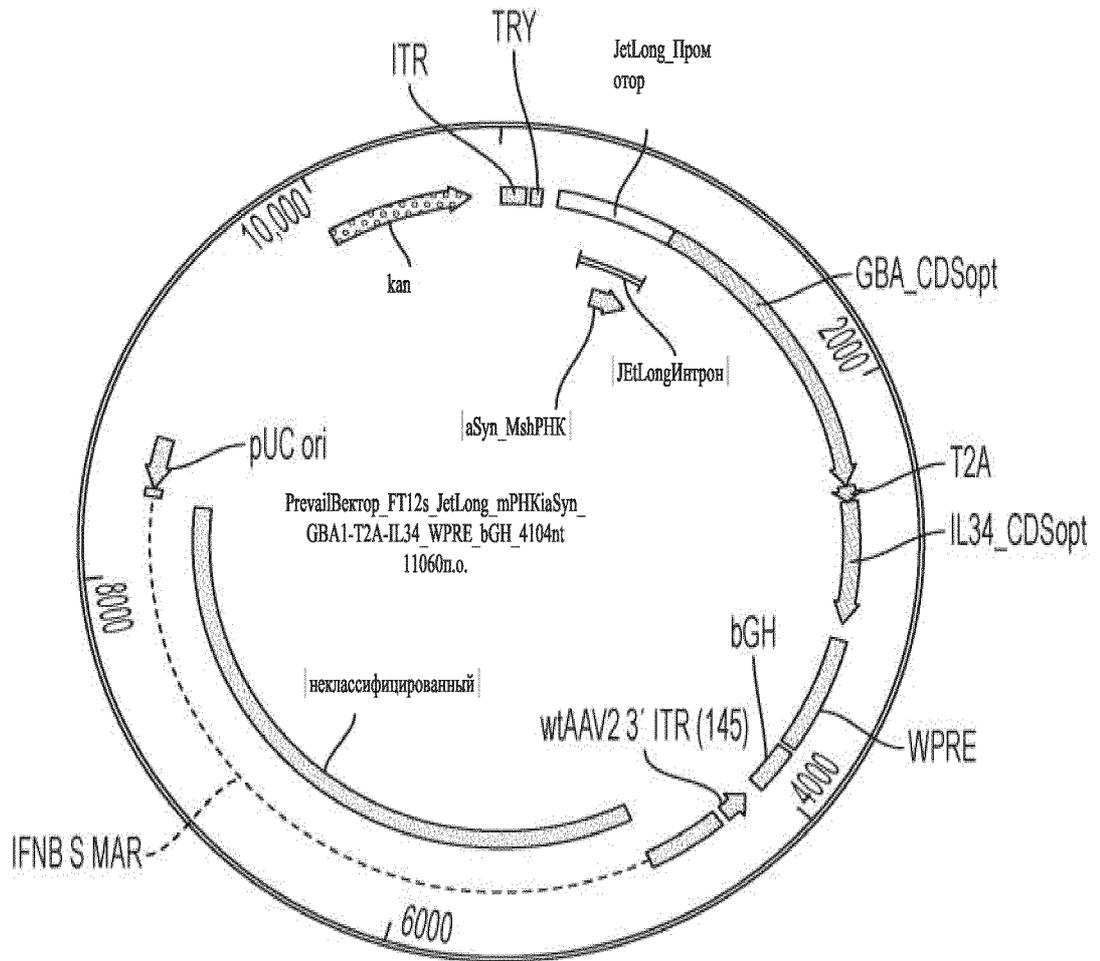
Фиг. 29



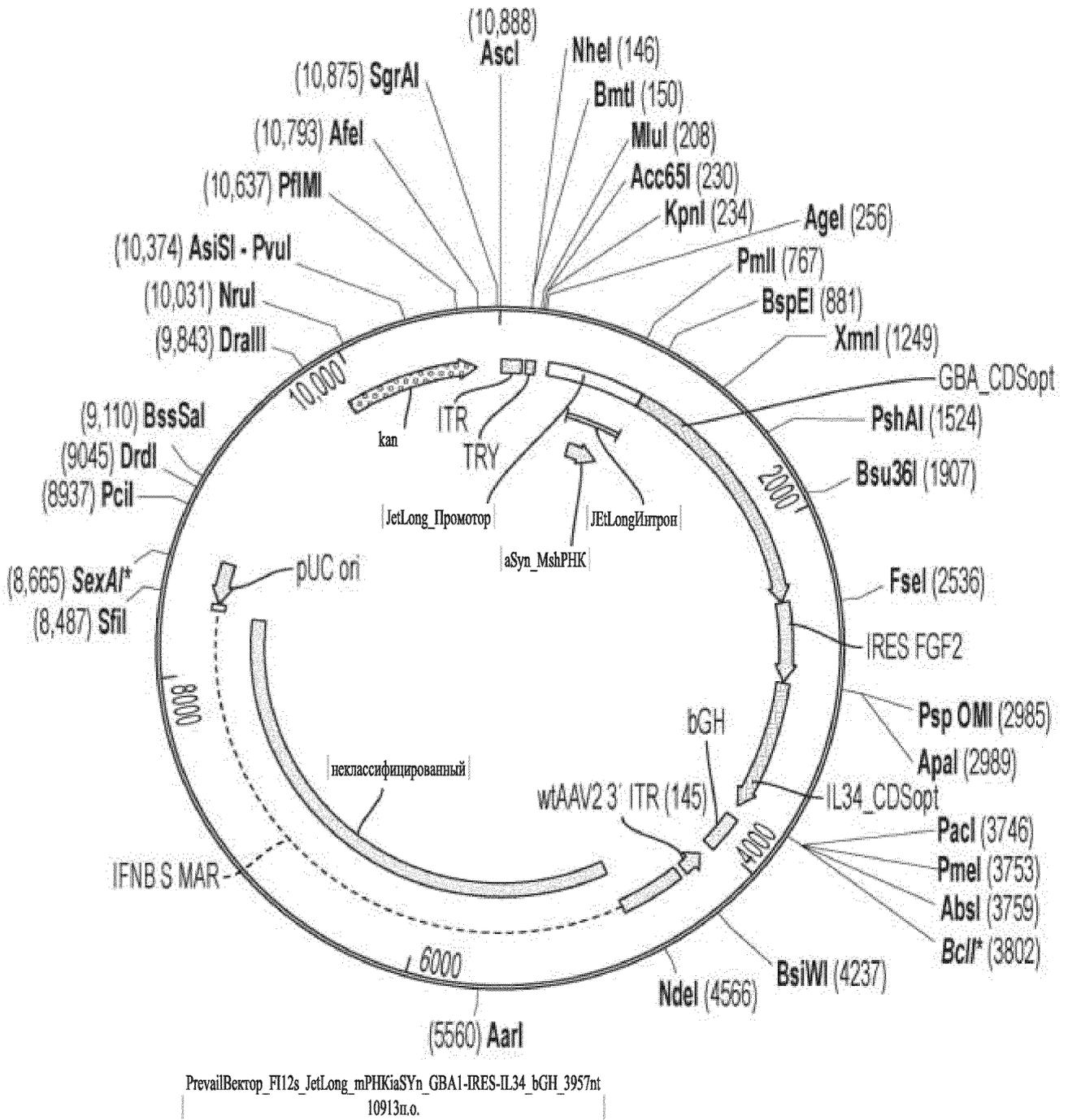
Фиг. 30



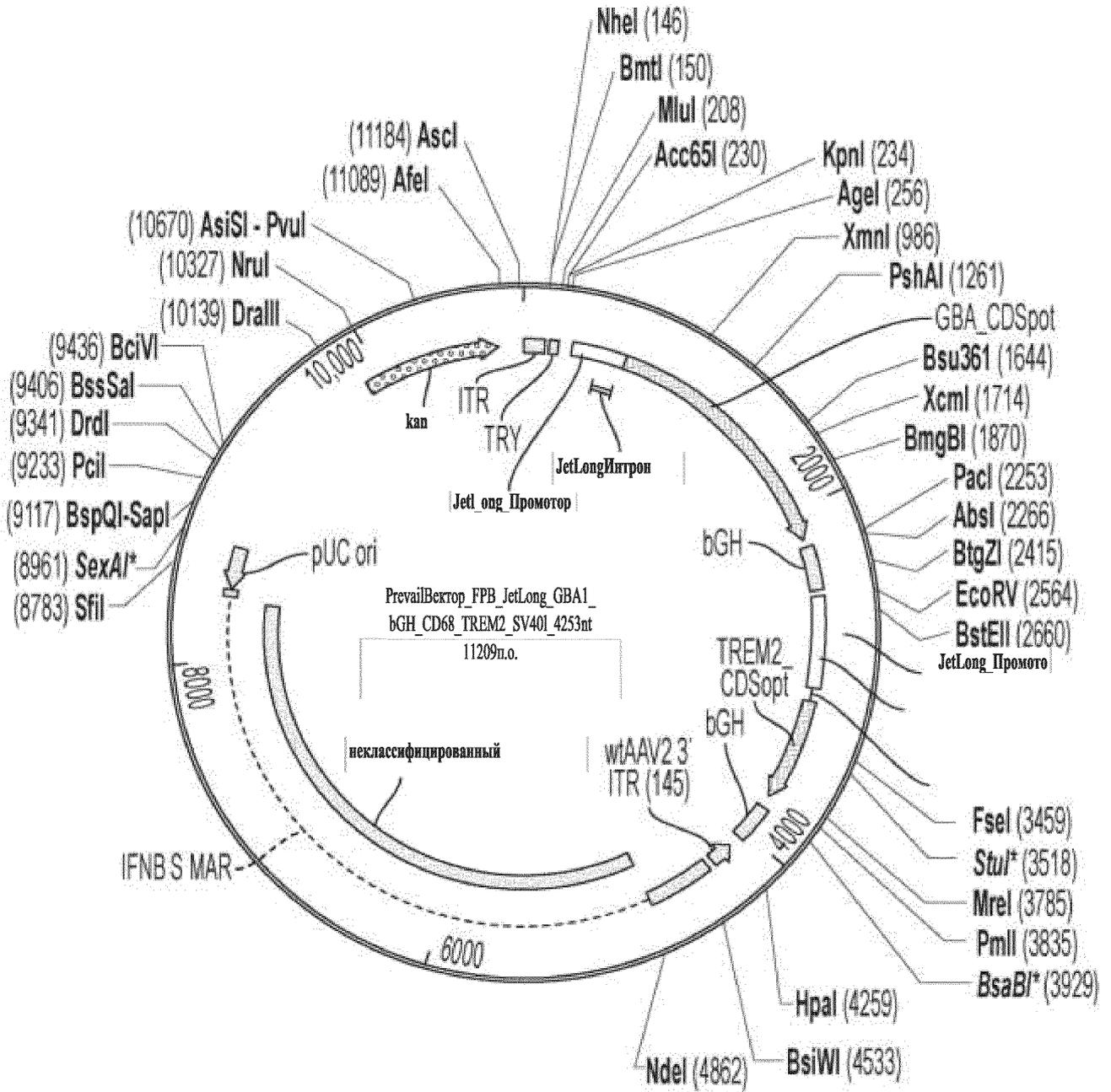
Фиг. 31



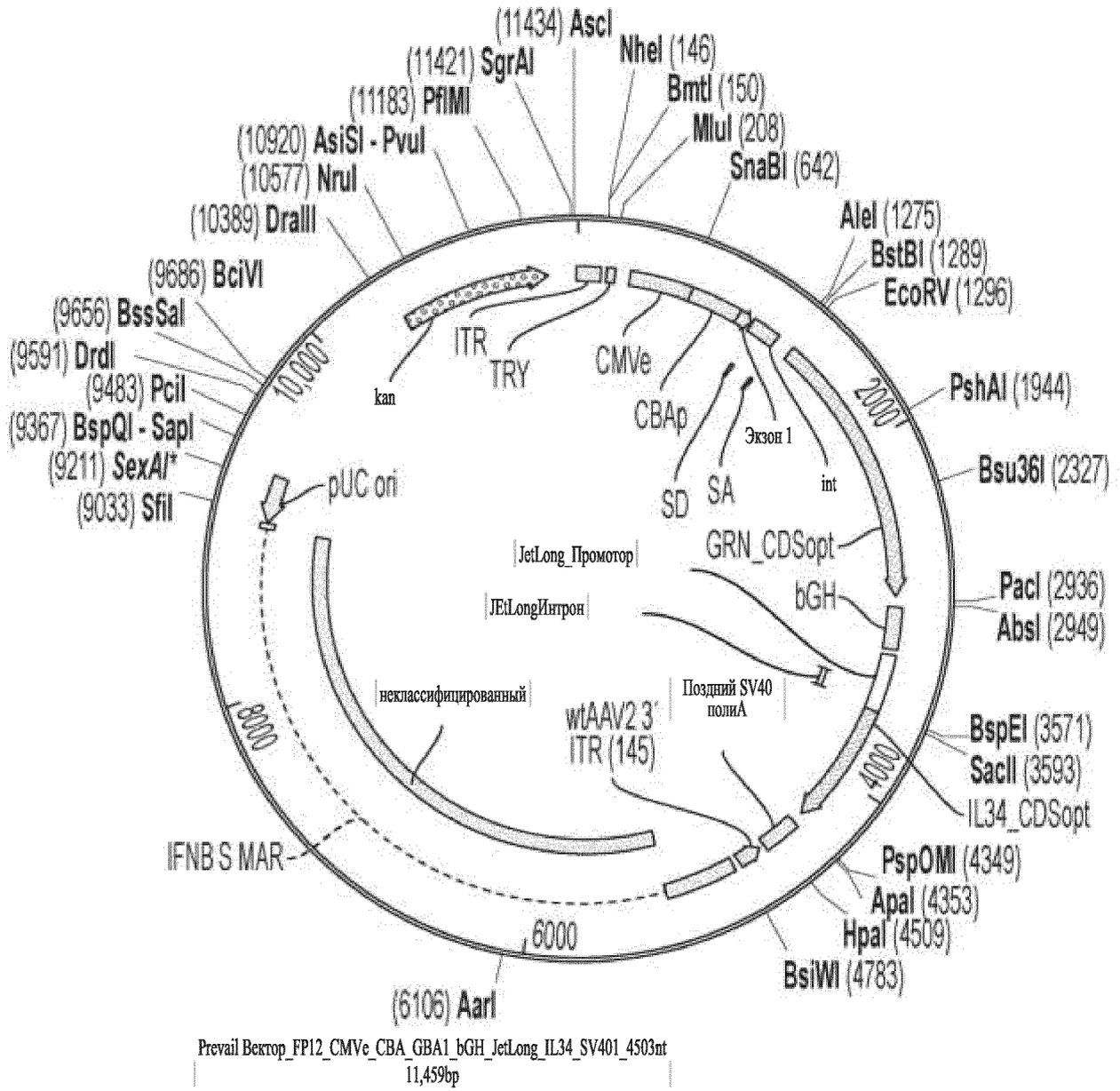
Фиг. 32



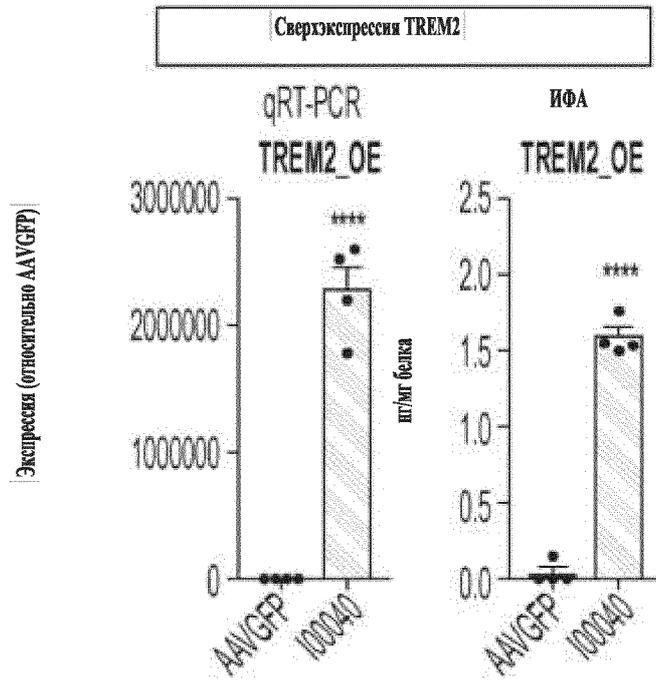
Фиг. 33



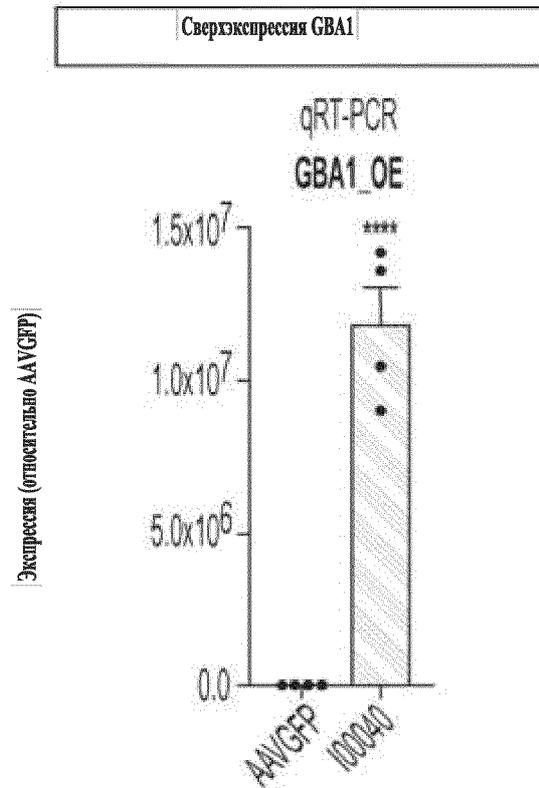
Фиг. 34



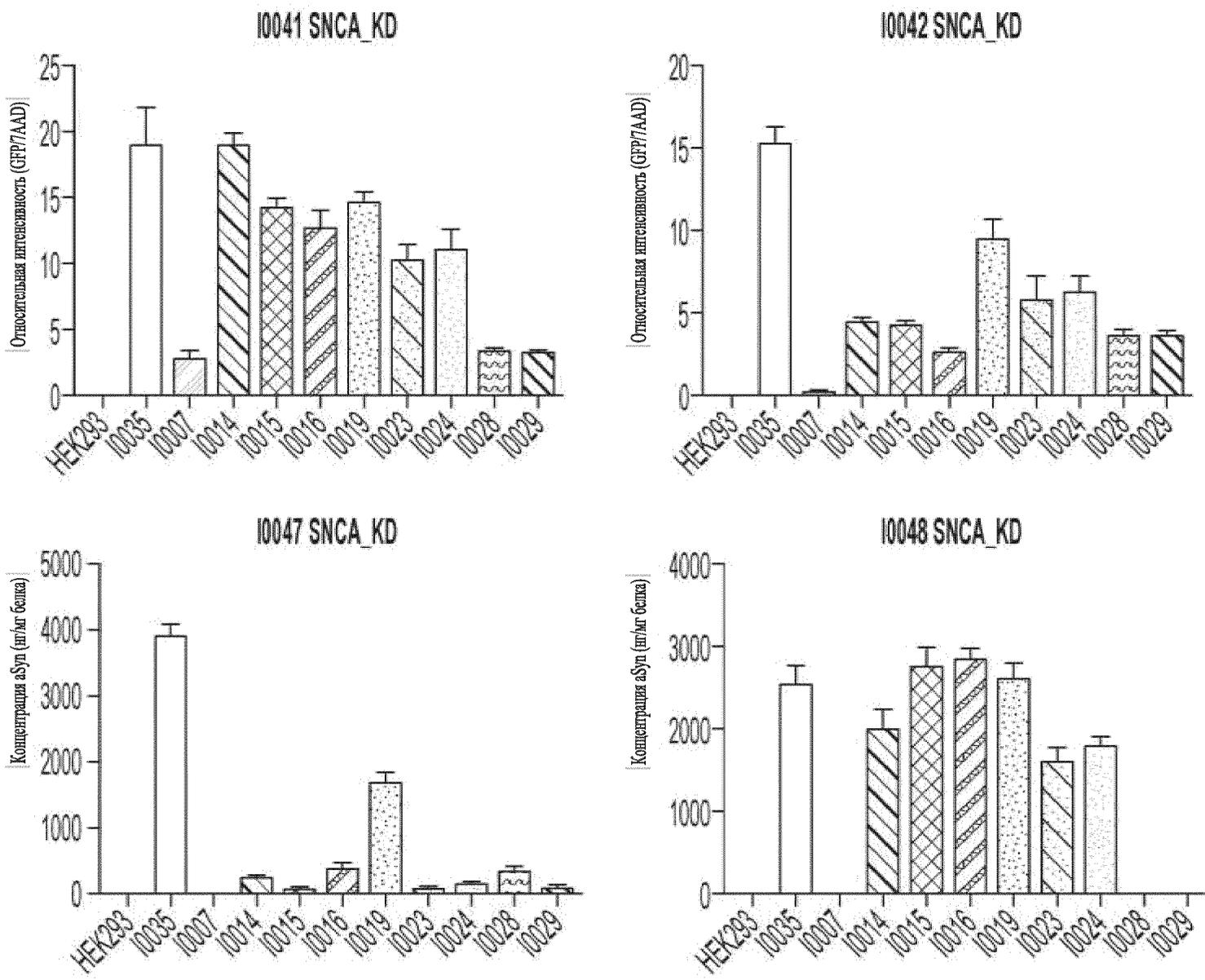
Фиг. 35



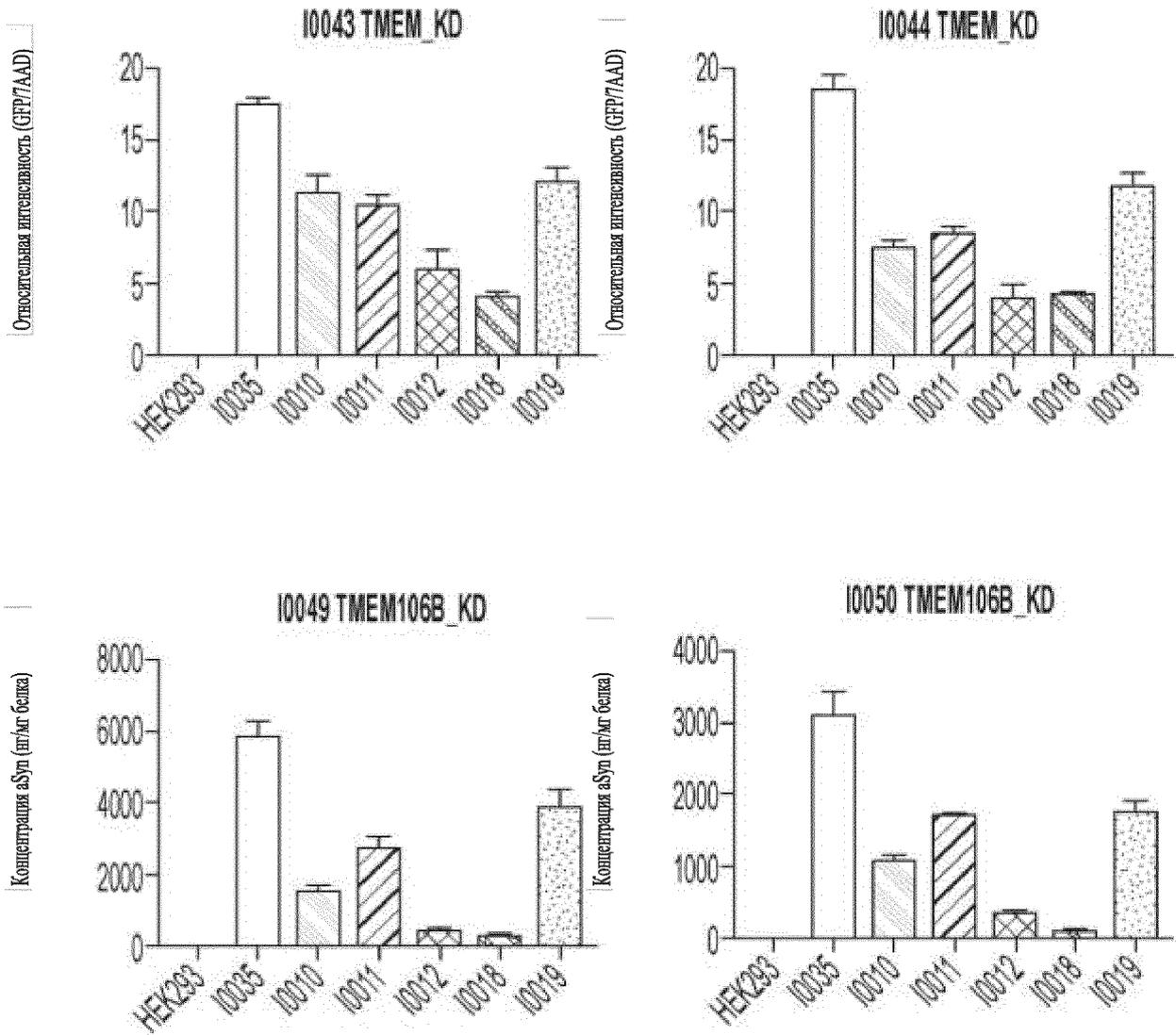
Фиг. 36А



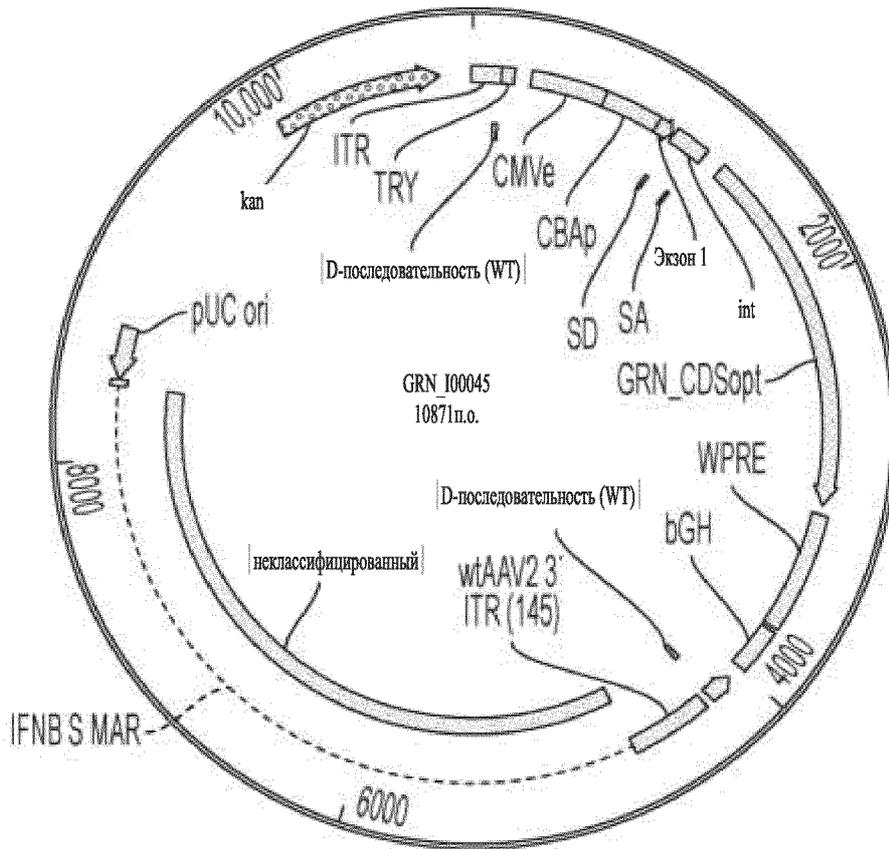
Фиг. 36В



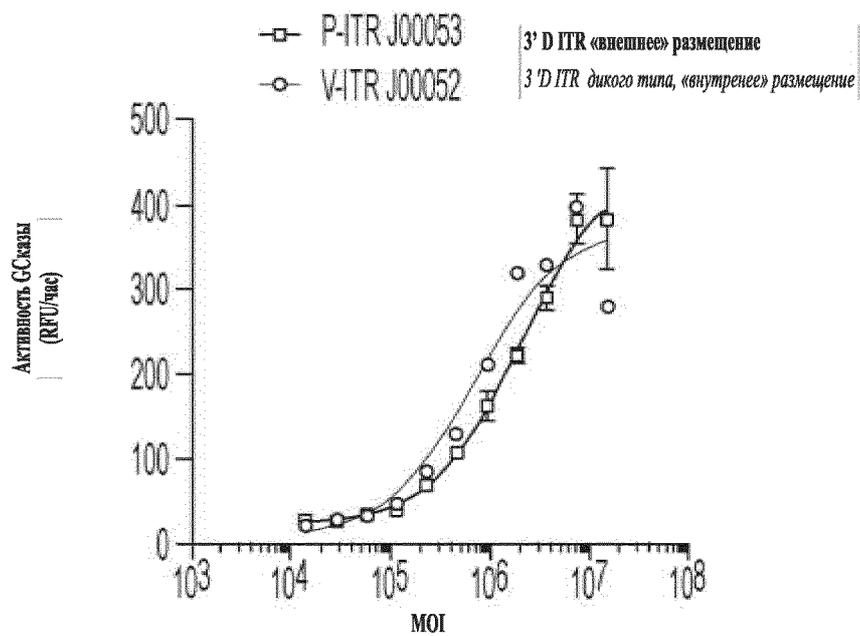
Фиг. 37



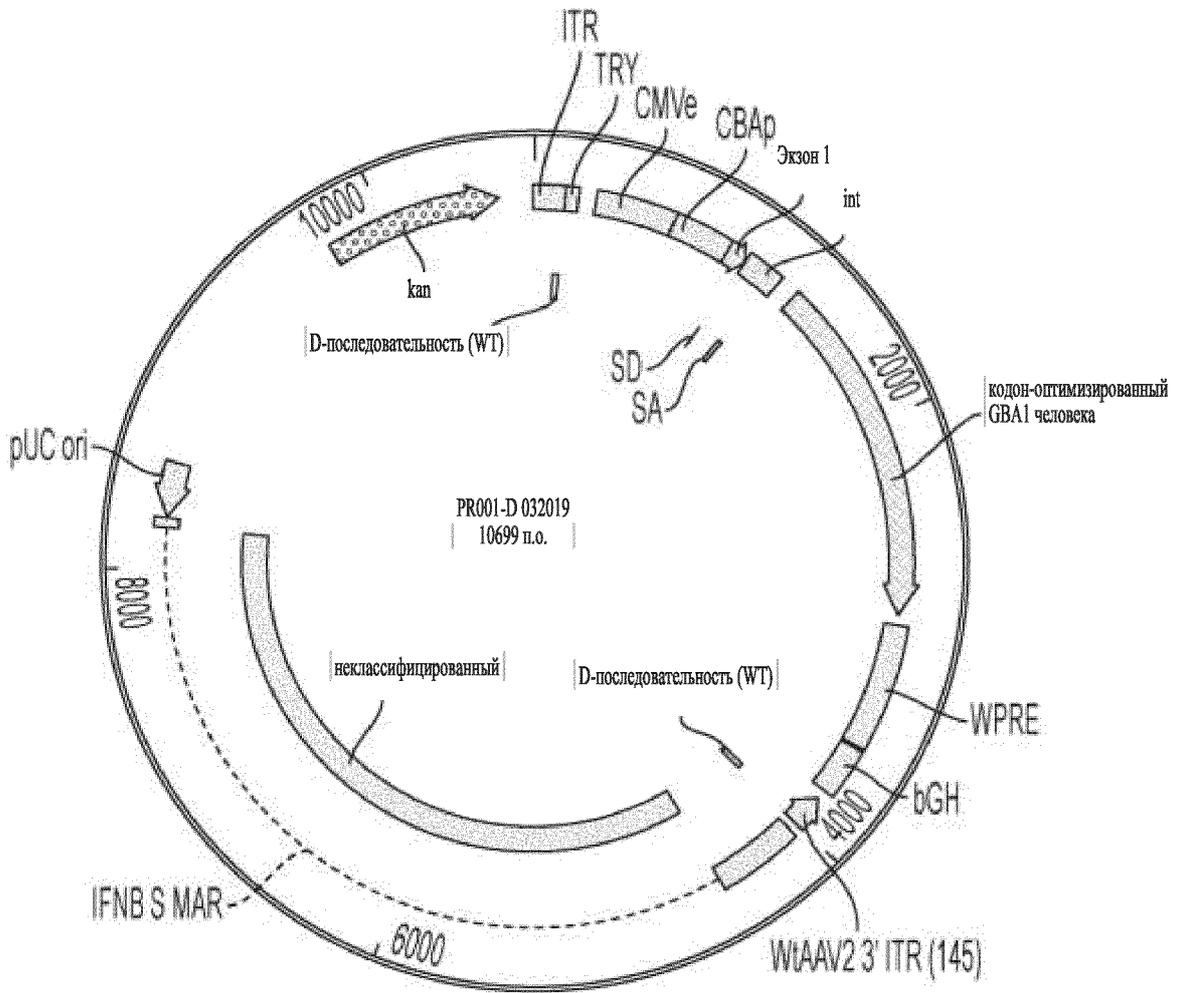
Фиг. 38



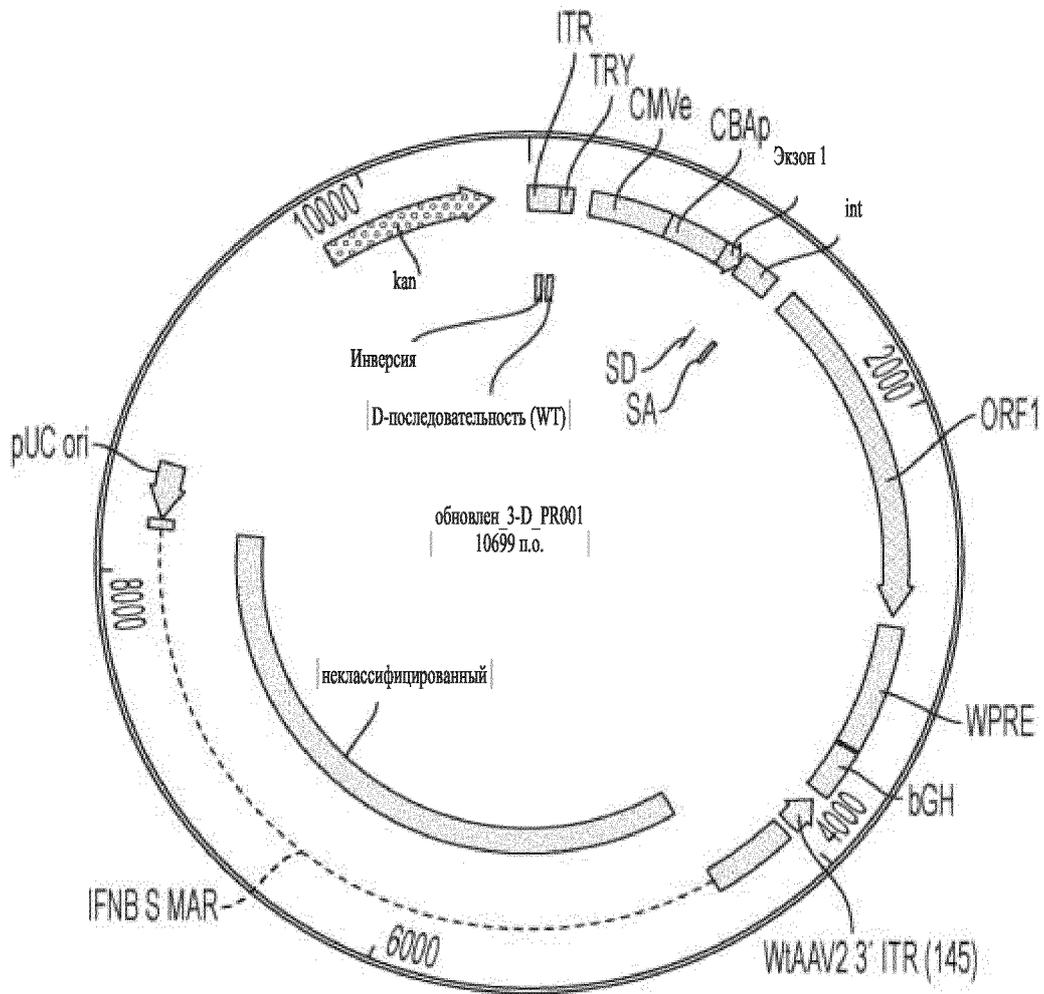
Фиг. 39



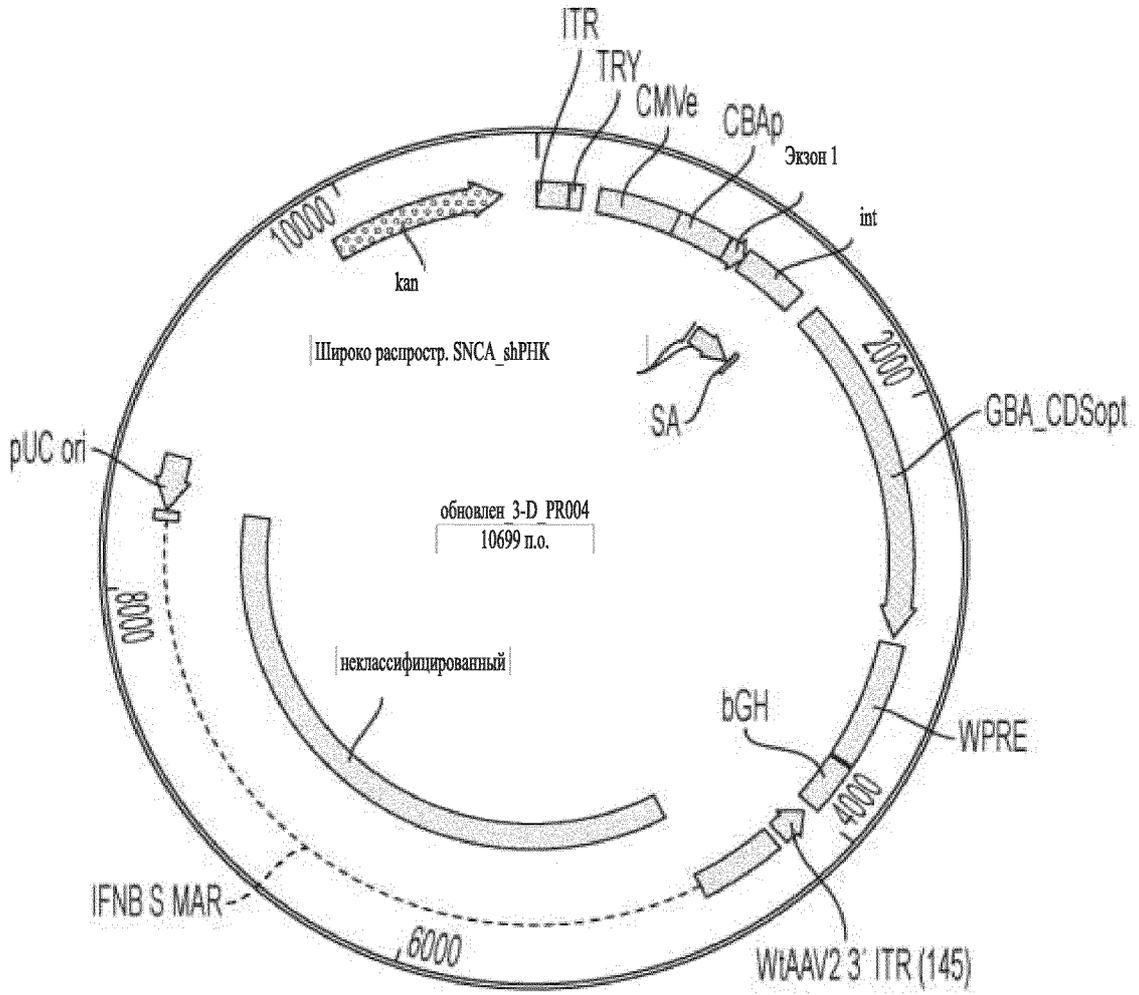
Фиг. 40



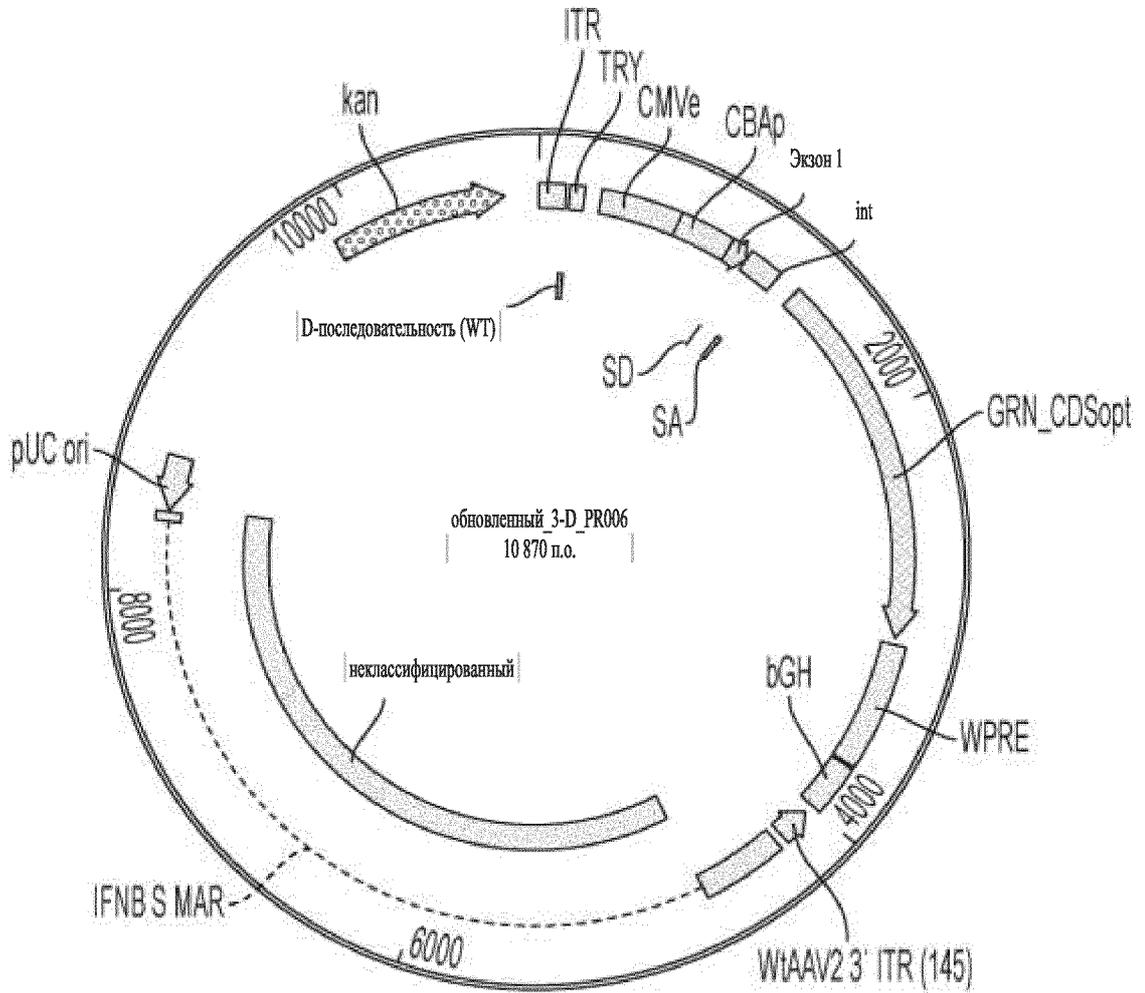
Фиг. 41



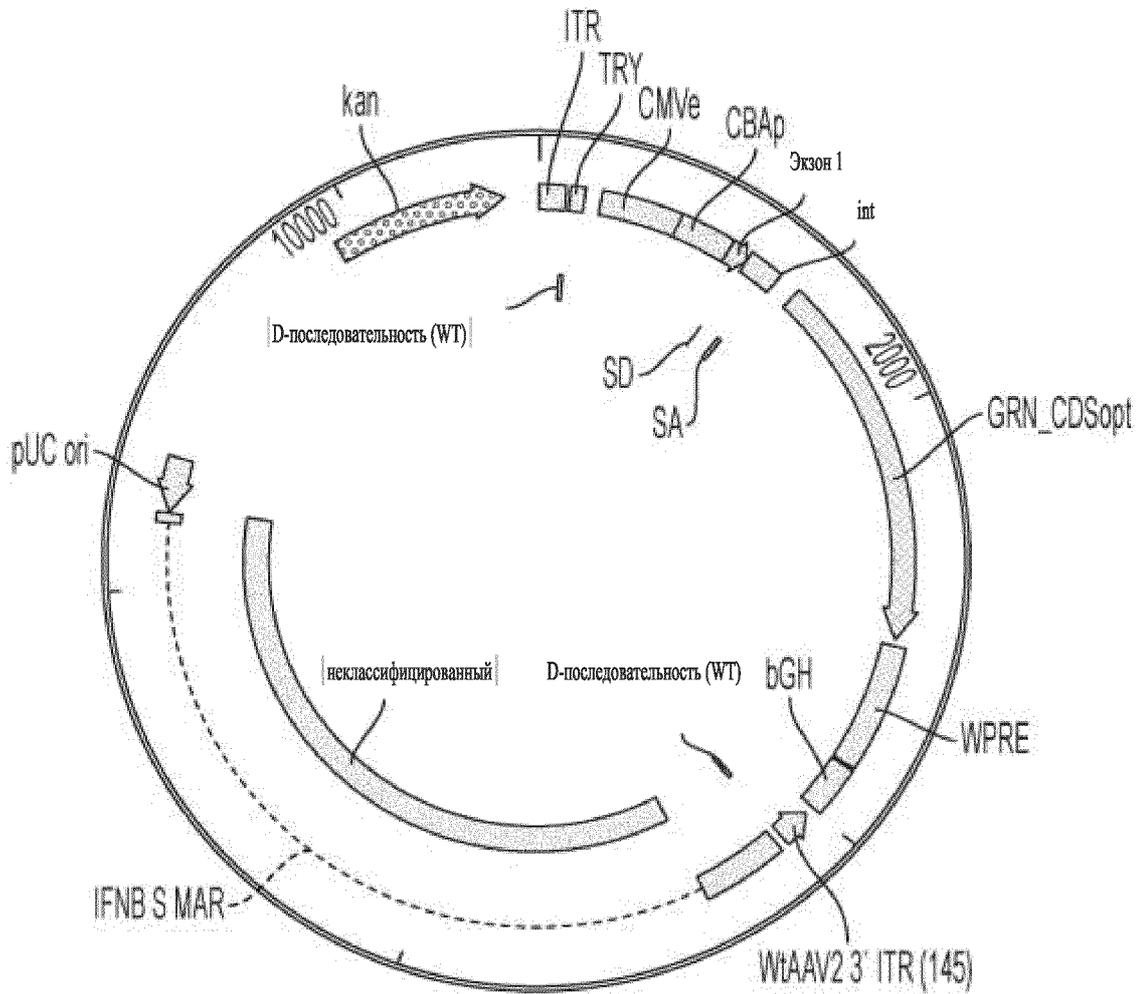
Фиг. 42



Фиг. 43



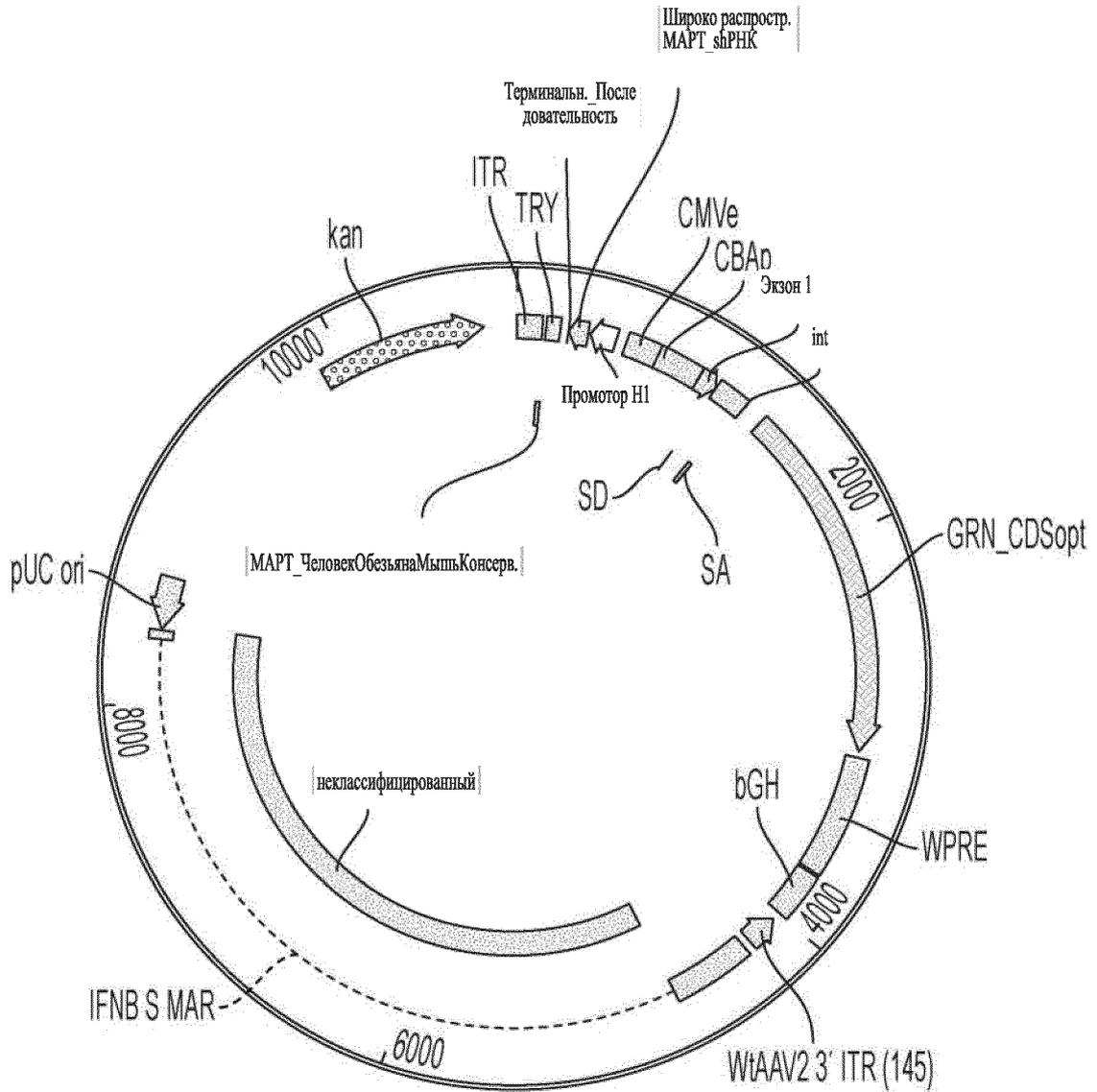
Фиг. 44



обновлен_38.GRN_PW выровнен как с VM, так и с P (1)

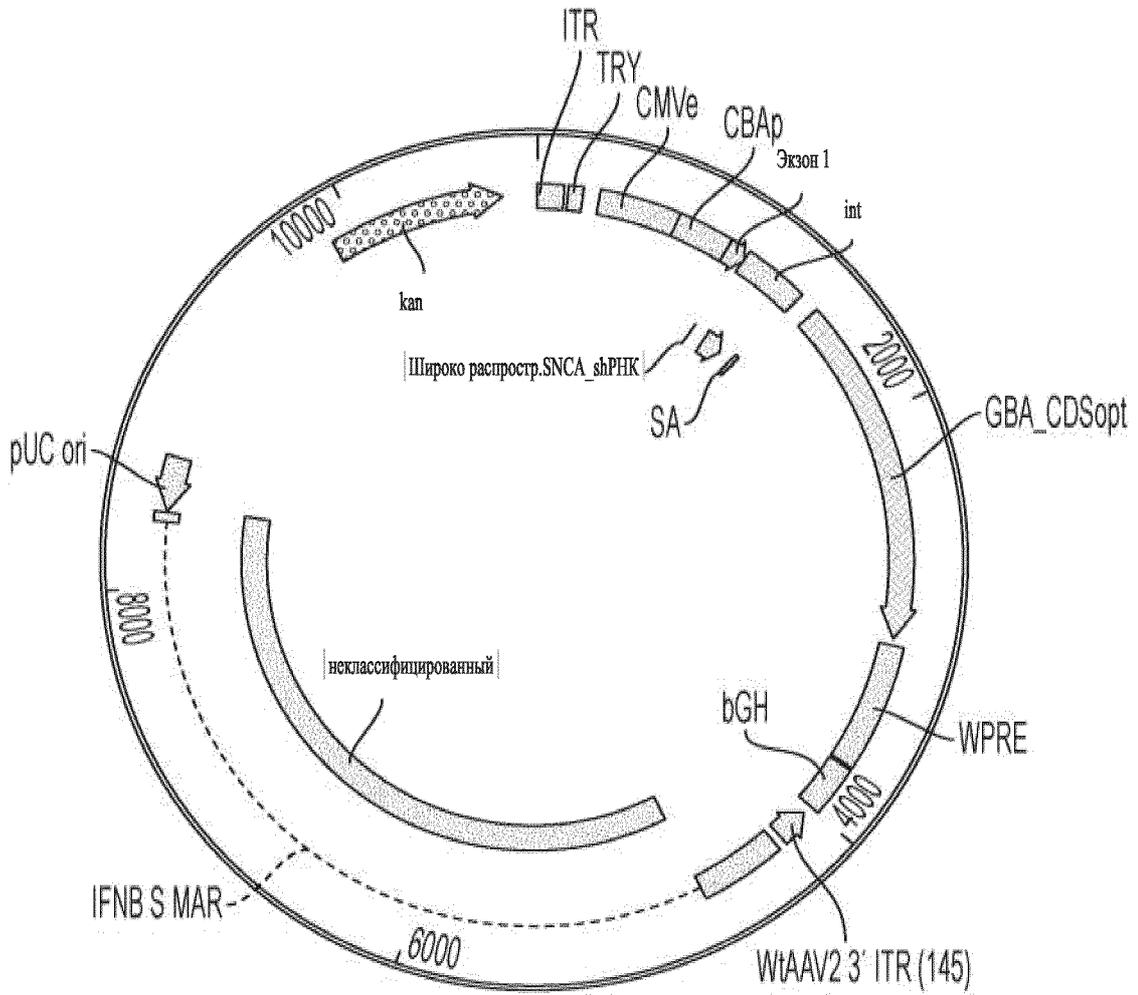
10 870 п.о.

Фиг. 45



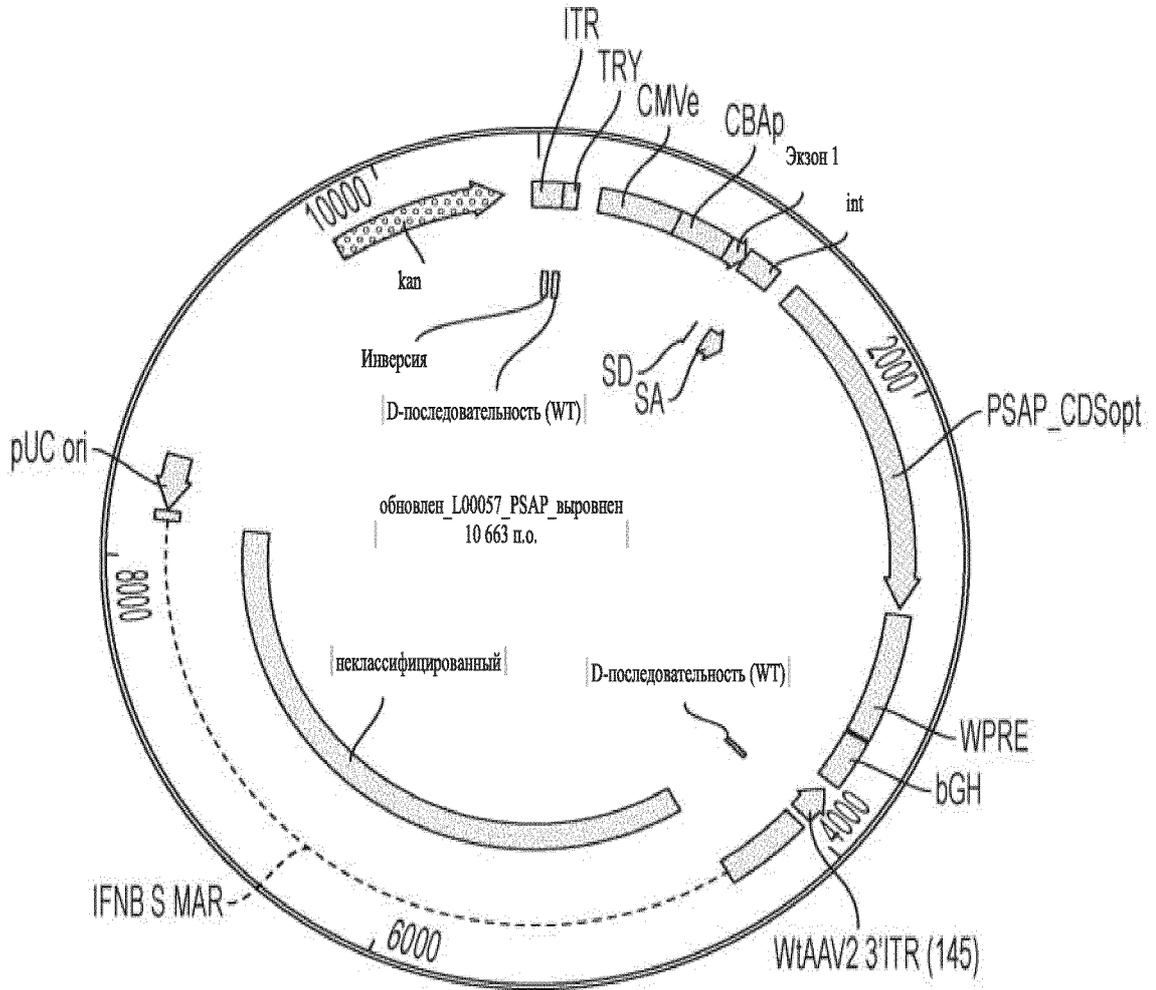
обновлен_H1_Широко распротр.КонсервMARTshRNK_GRN_выравнивание
11 264 п.о.

Фиг. 46

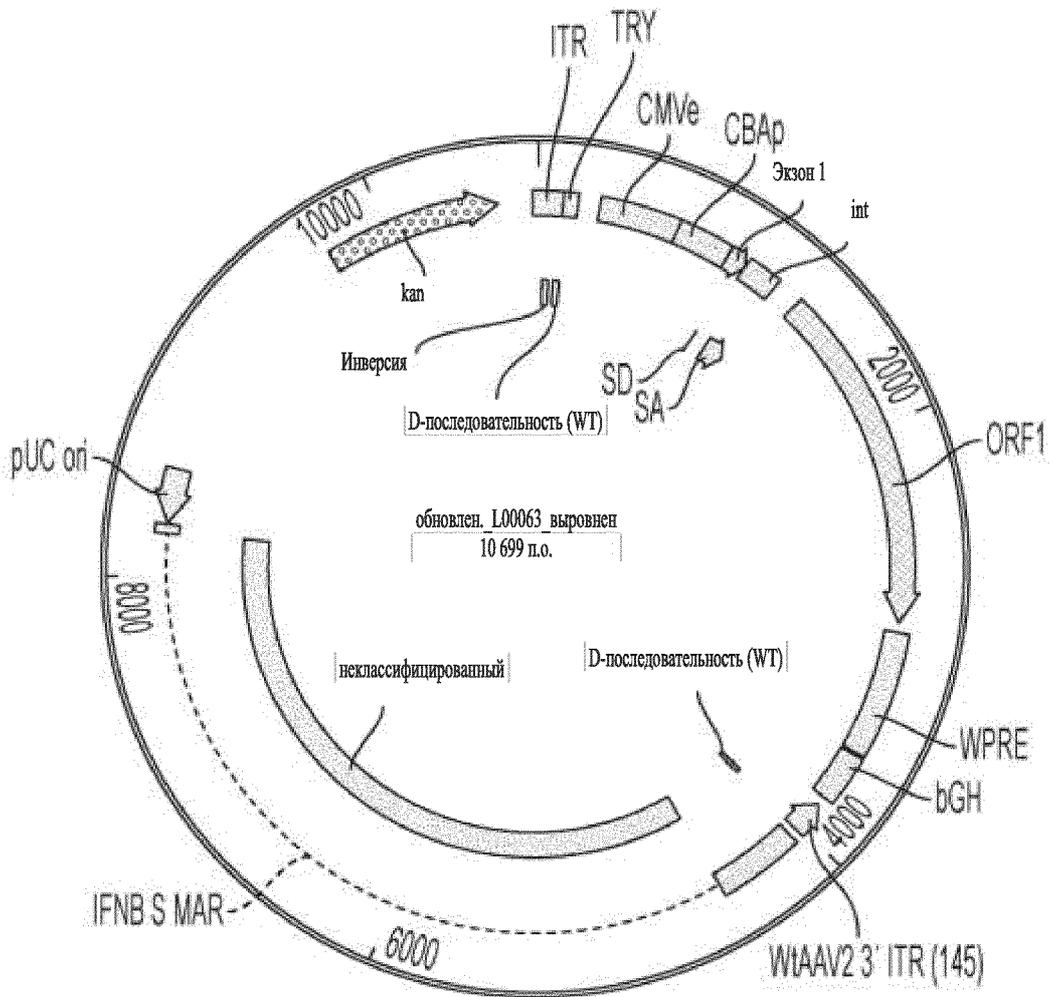


обновлен Интронный SNCA Широко распротр sh_GBA1 выровнен 10848п.о.

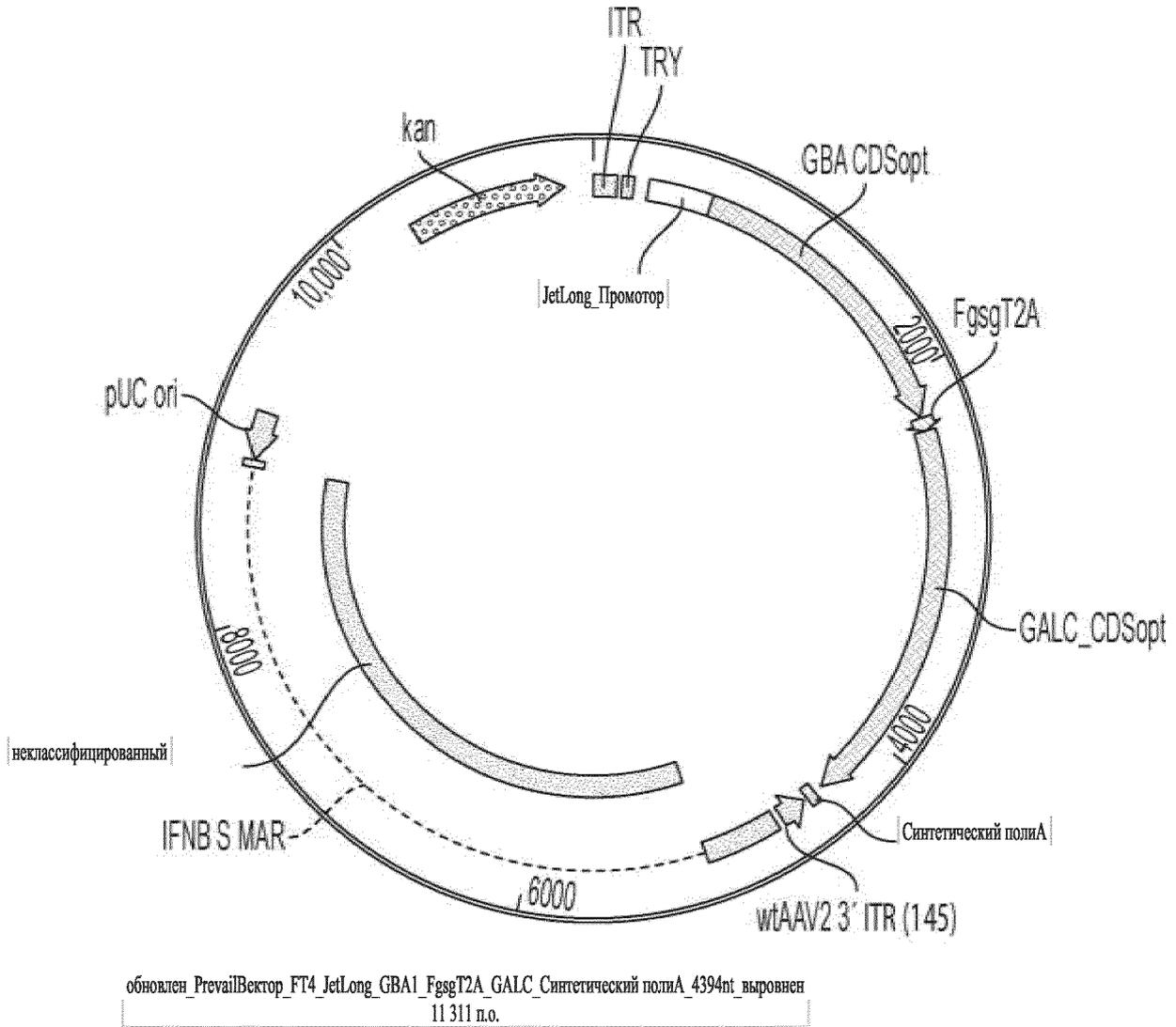
Фиг. 47



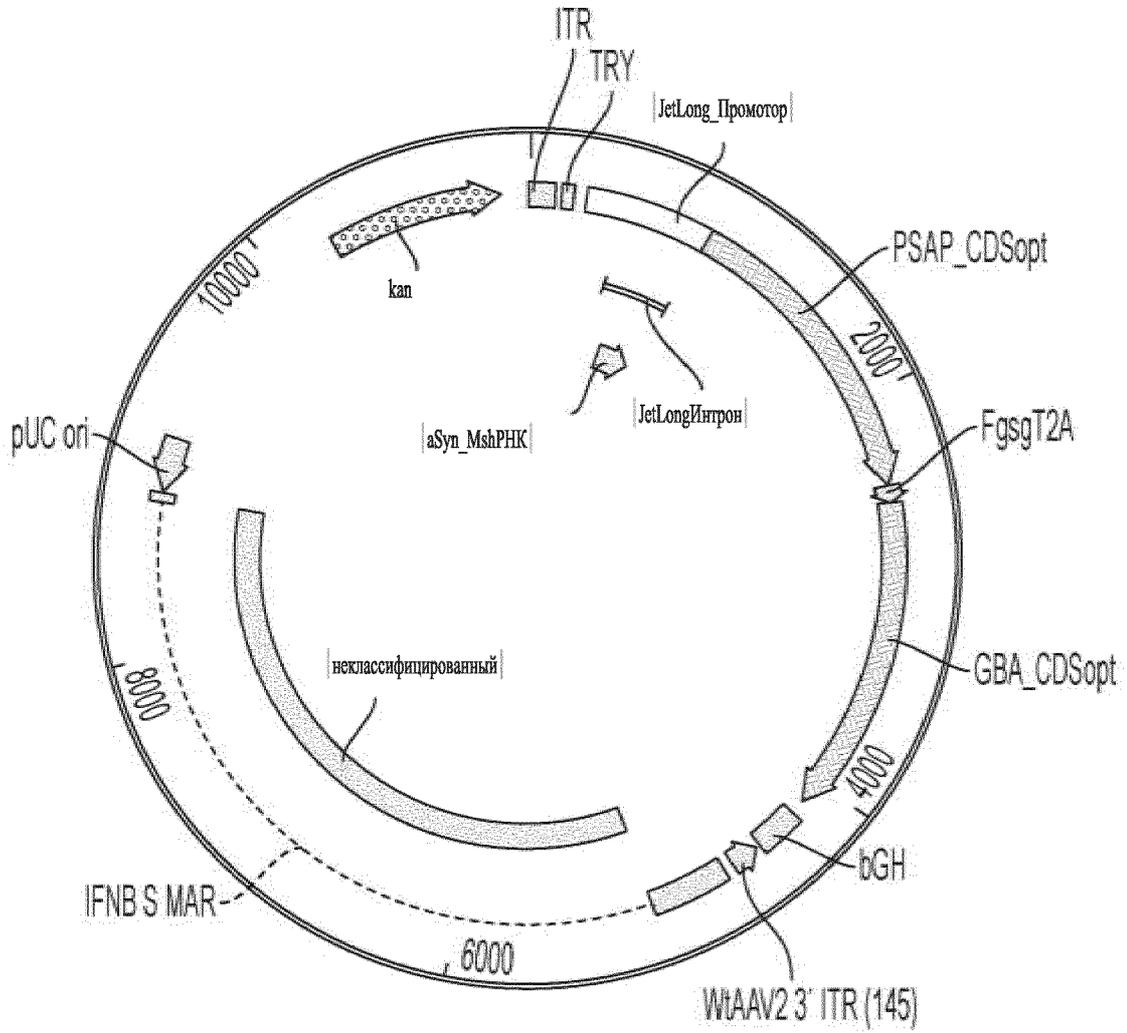
Фиг. 48



Фиг. 49

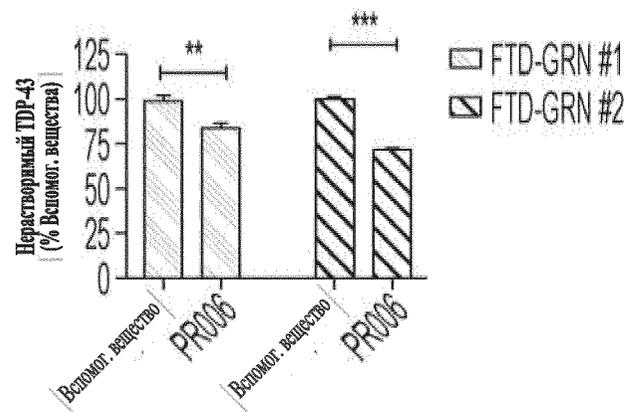
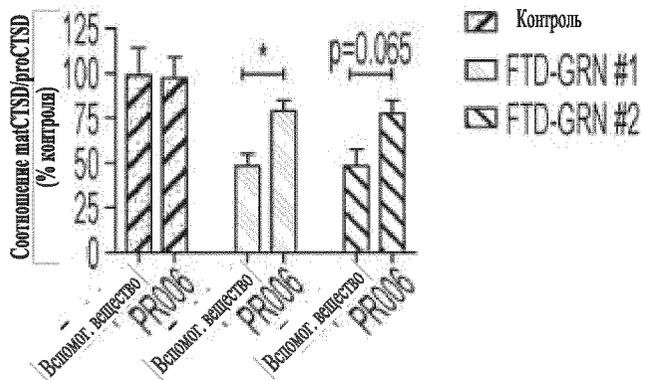
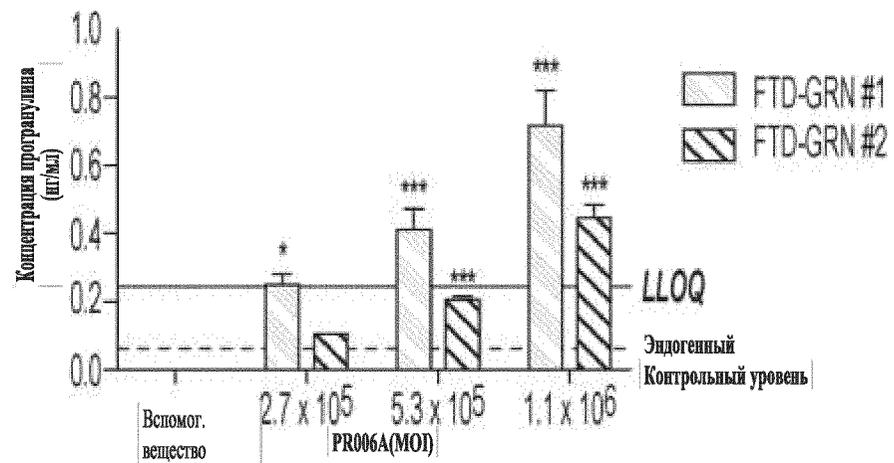
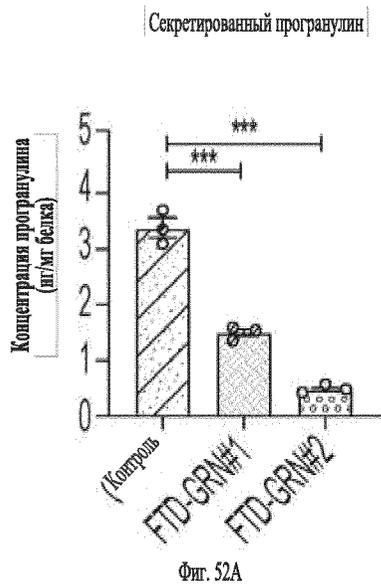


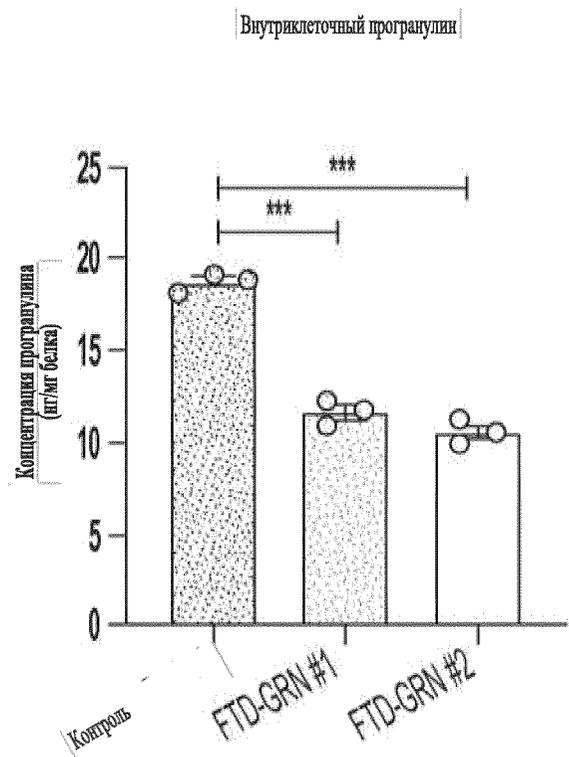
Фиг. 50



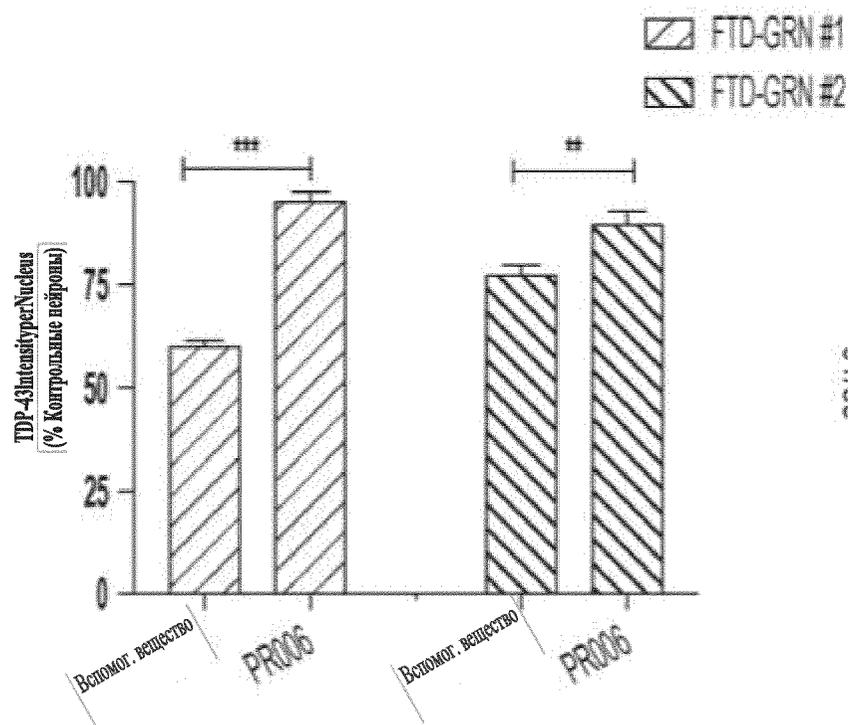
обновлен PrevailВектор LT2s JetLong мPHKiaSYn PSAP-FgsgT2A-GBA1 bGH 4374nt выровнен
11292п.о.

Фиг. 51

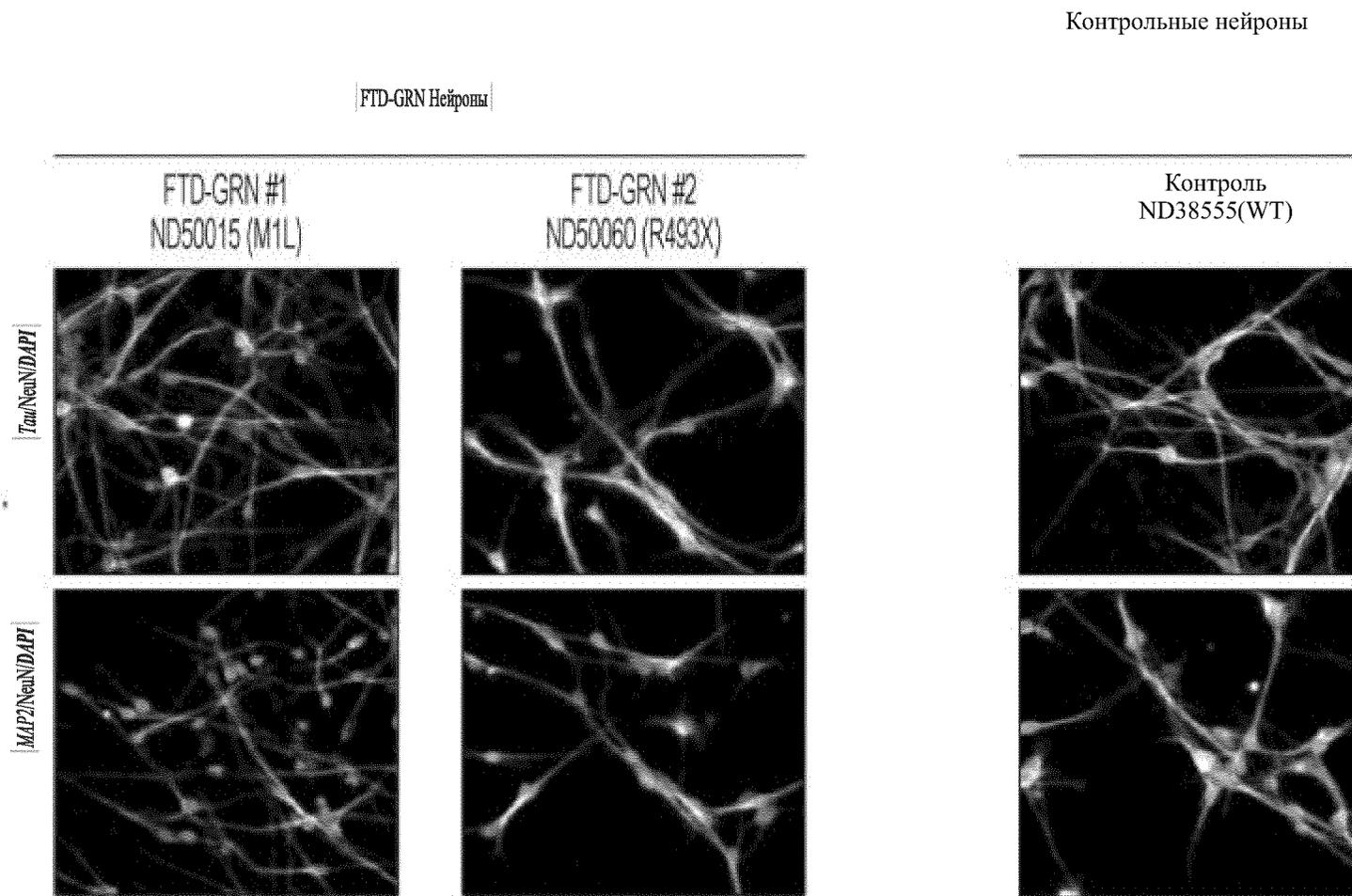




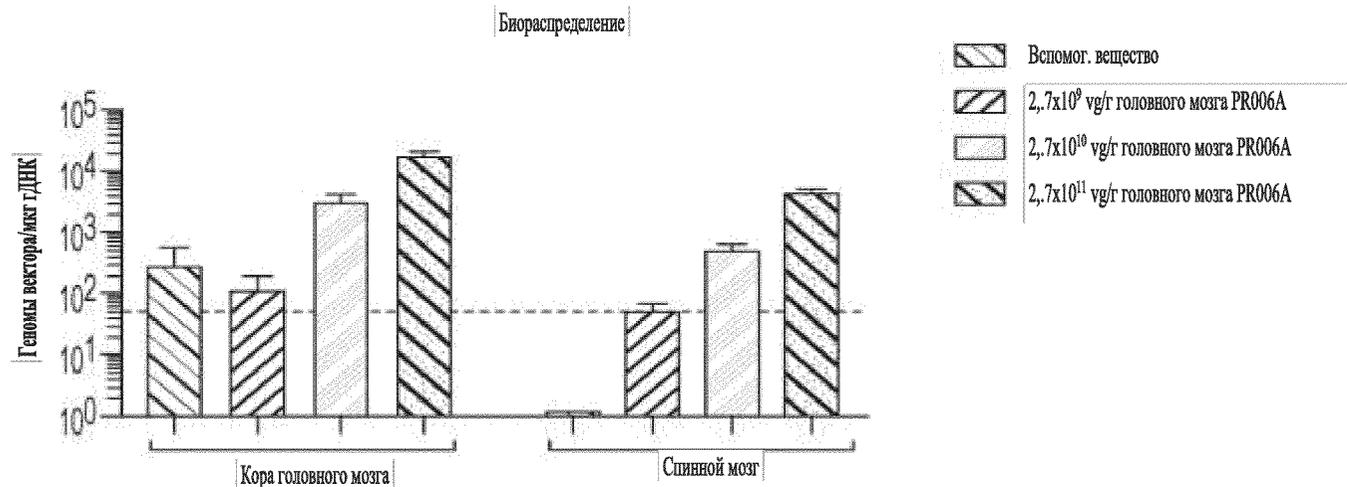
Фиг. 52E



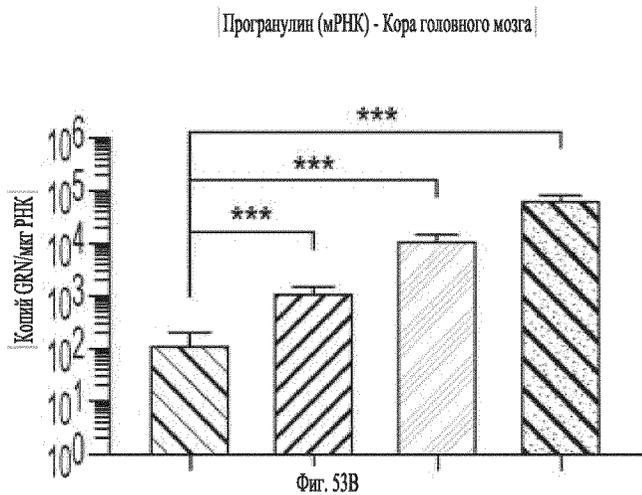
Фиг. 52F



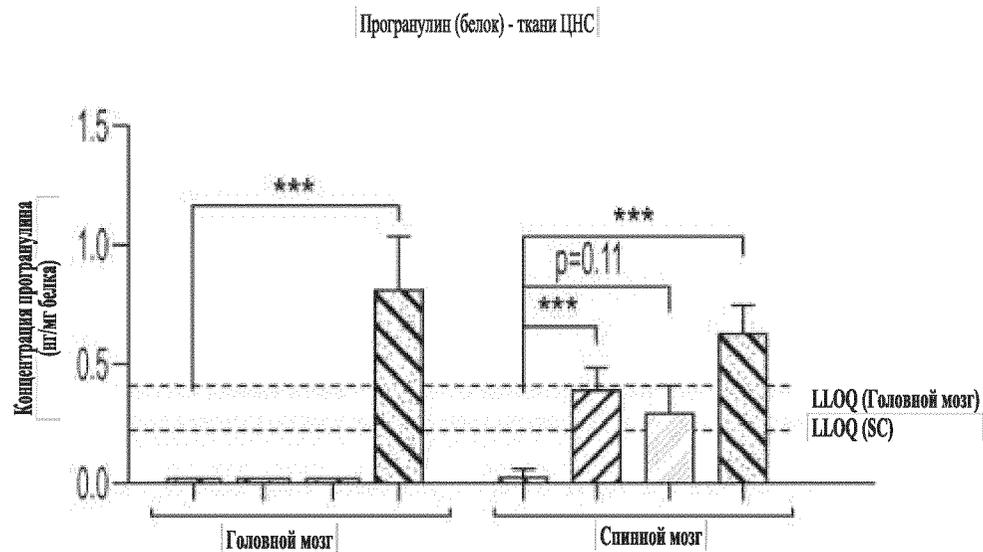
Фиг. 52G



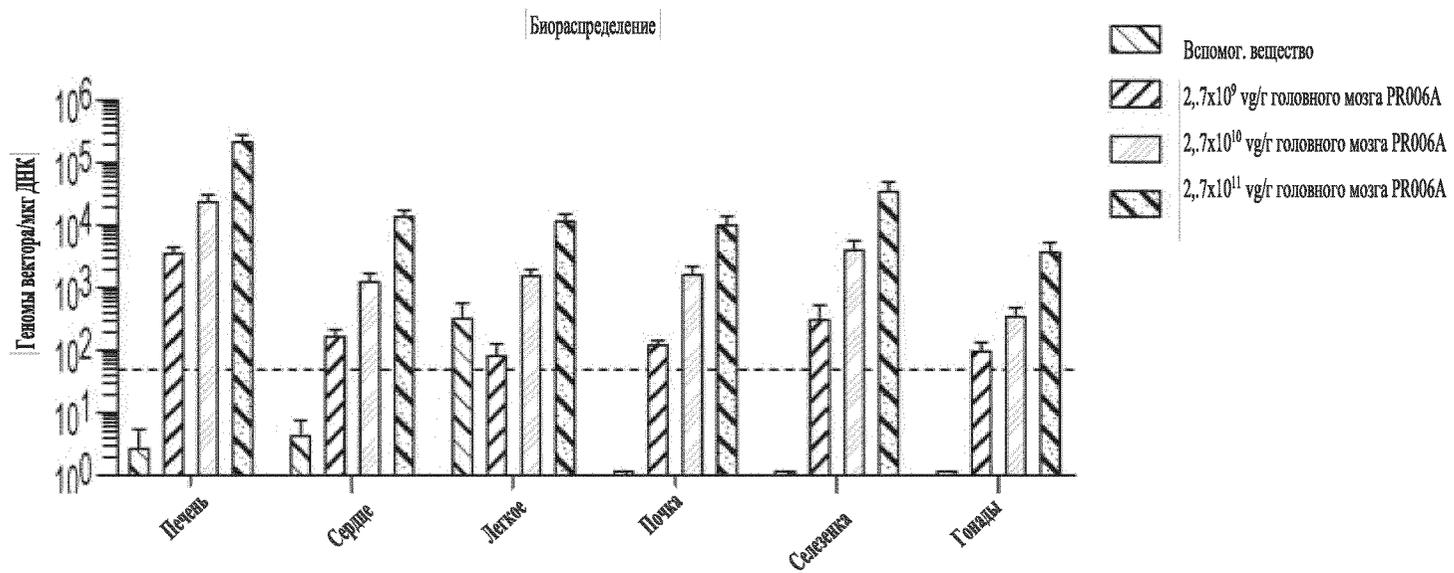
Фиг. 53А



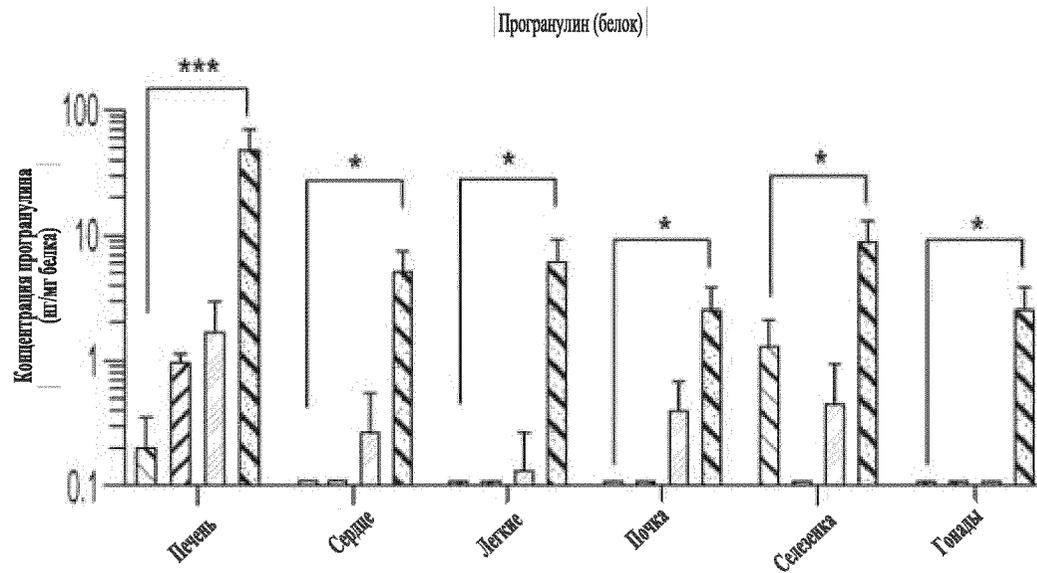
Фиг. 53В



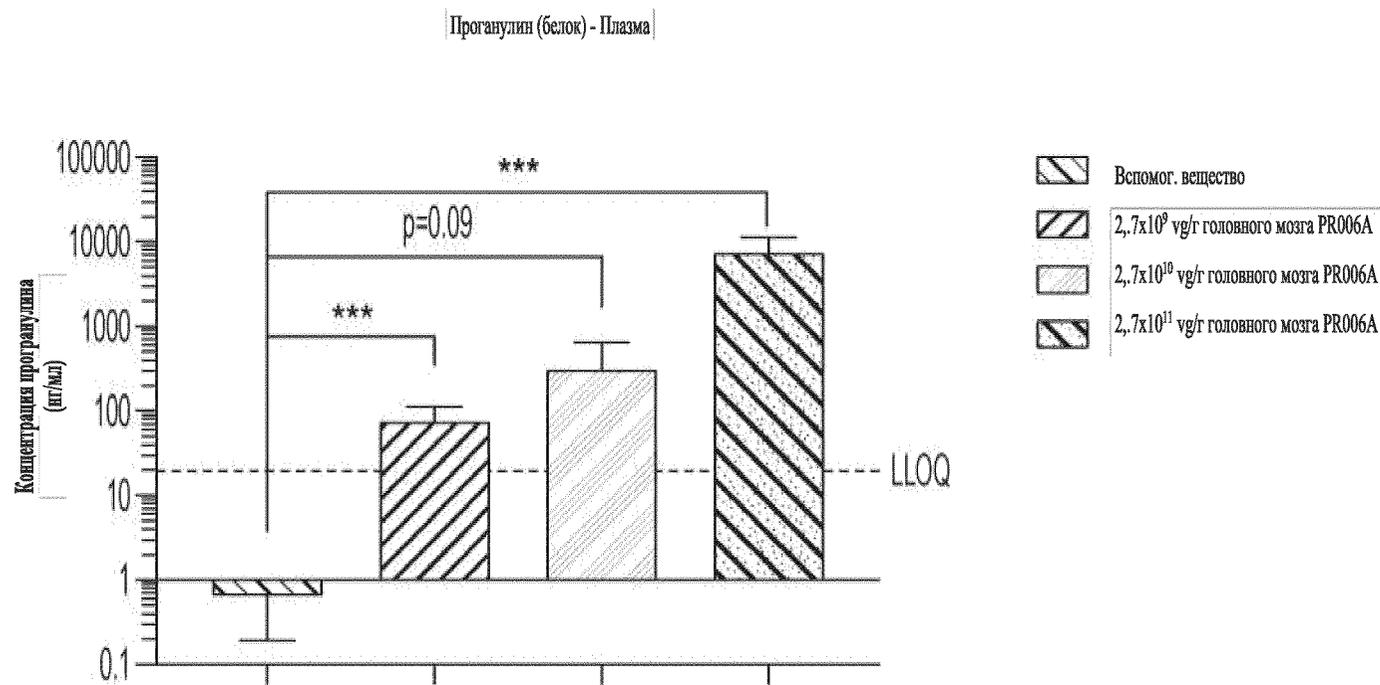
Фиг. 53С



Фиг. 53D

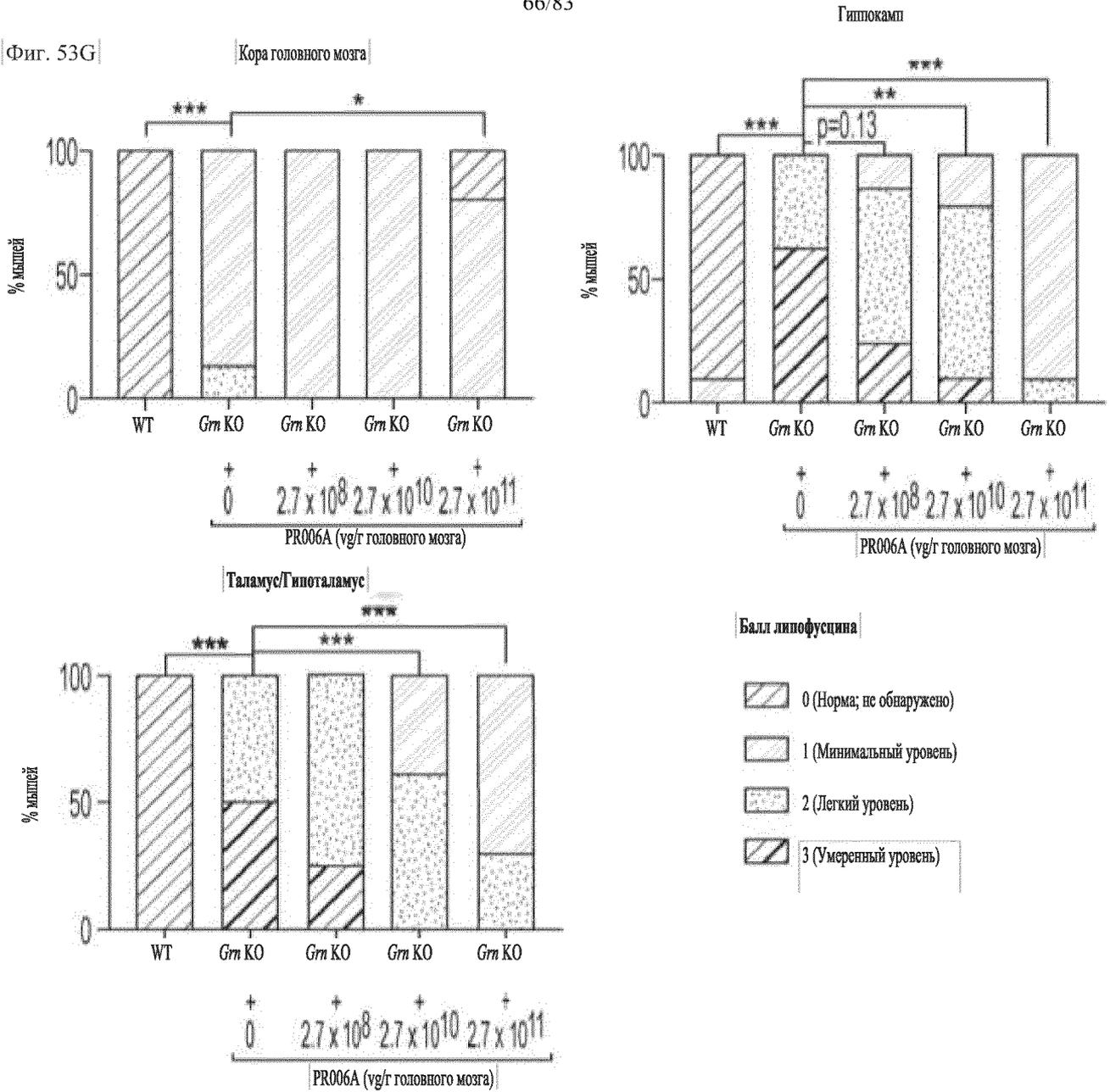


Фиг. 53E

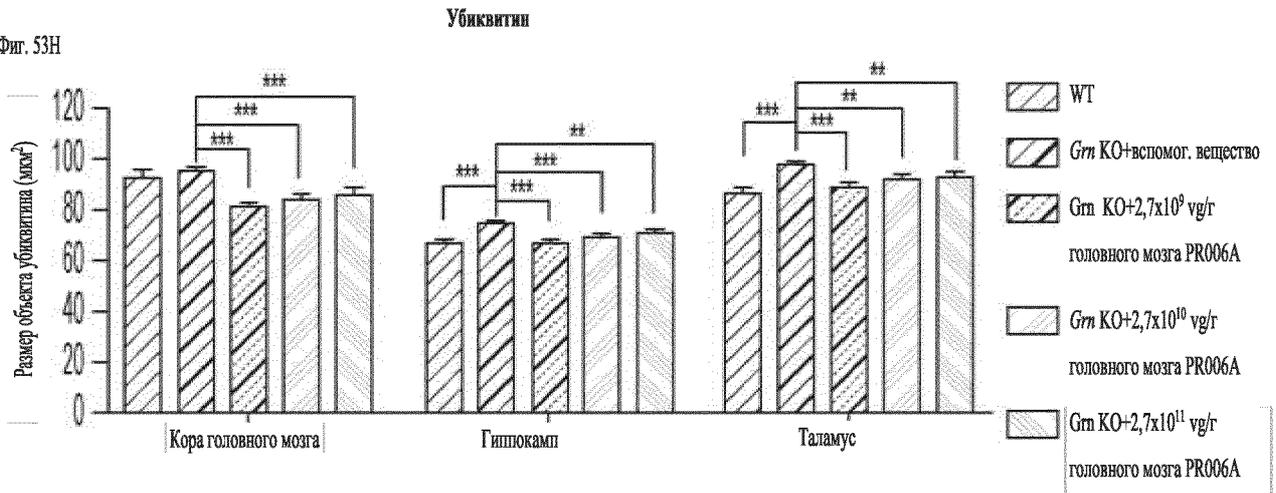


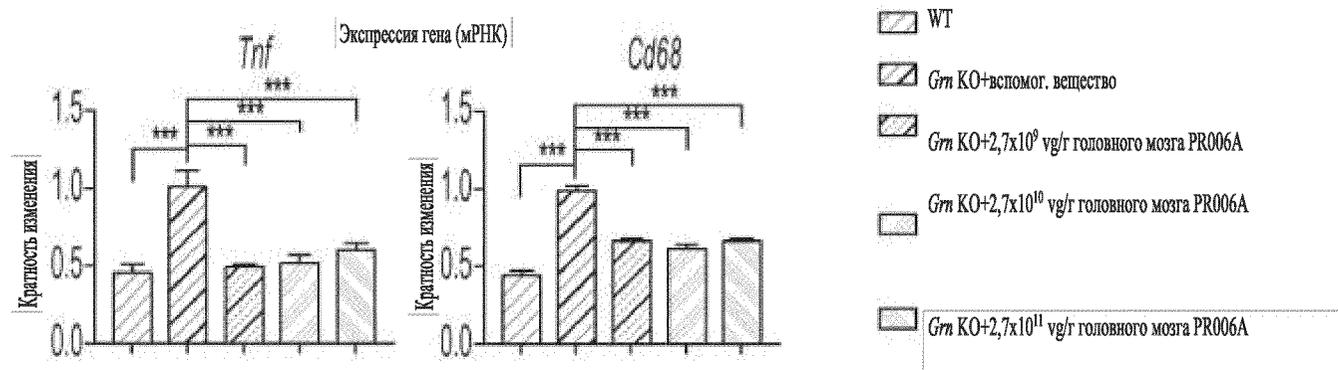
Фиг. 53F

Фиг. 53G

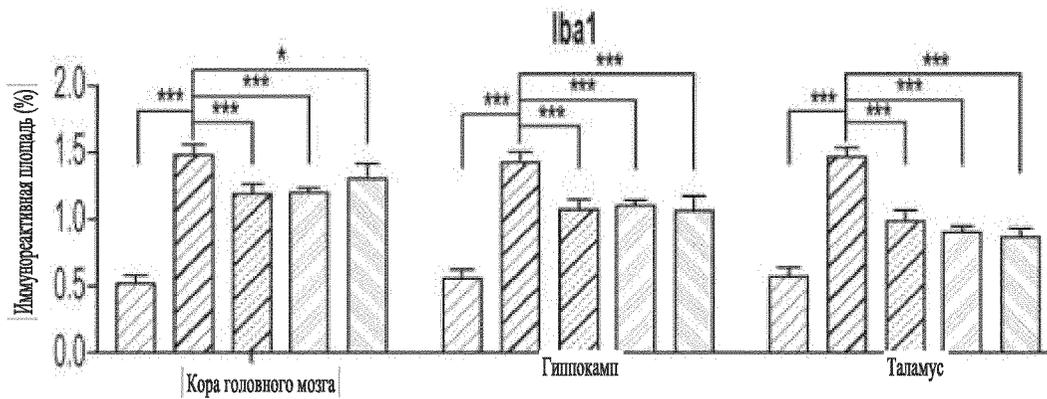


Фиг. 53H

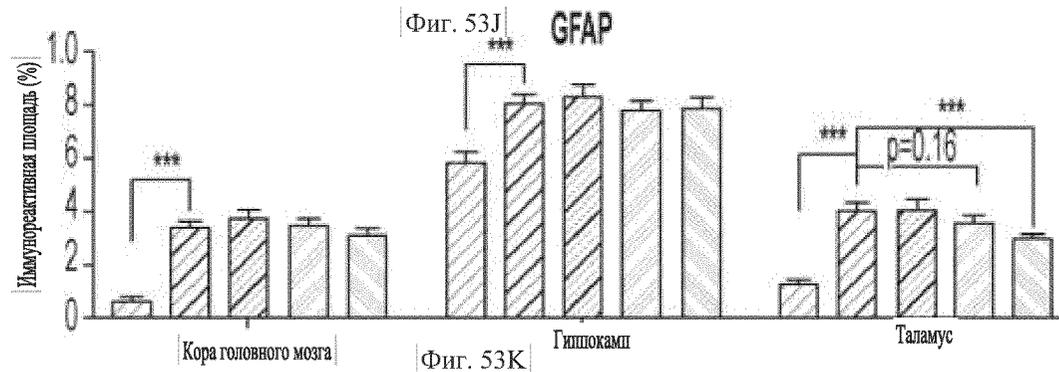




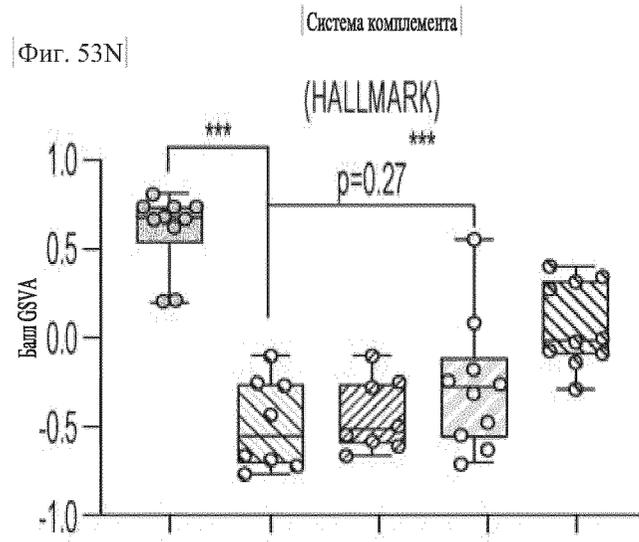
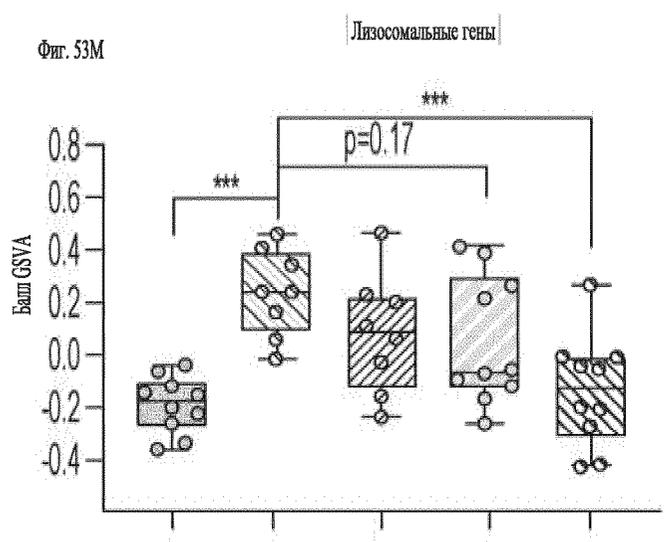
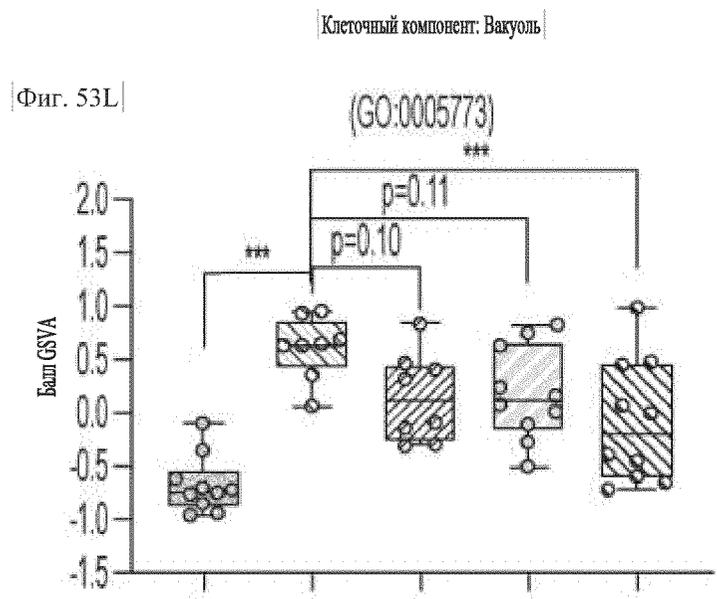
Фиг. 53I

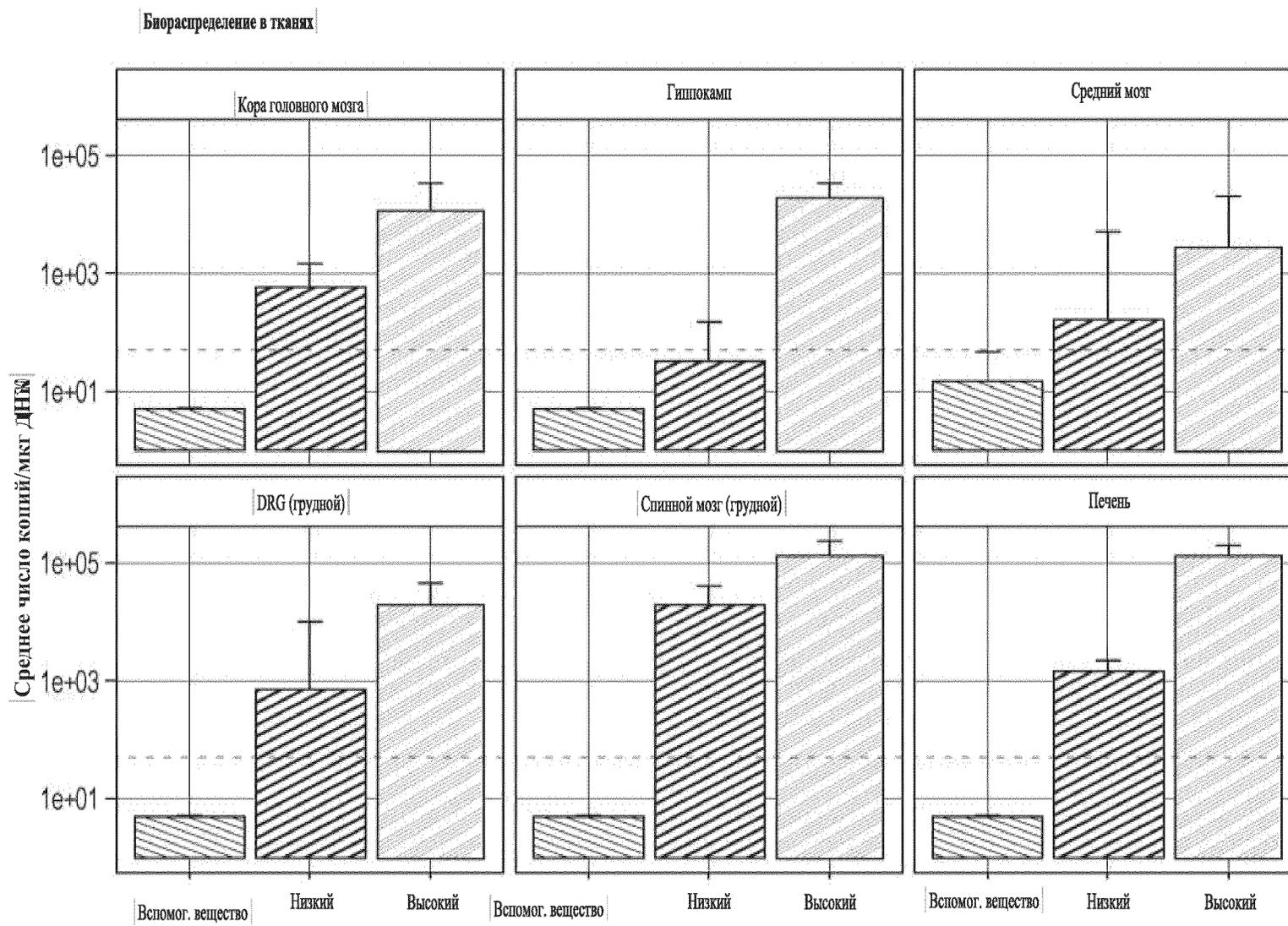


Фиг. 53J

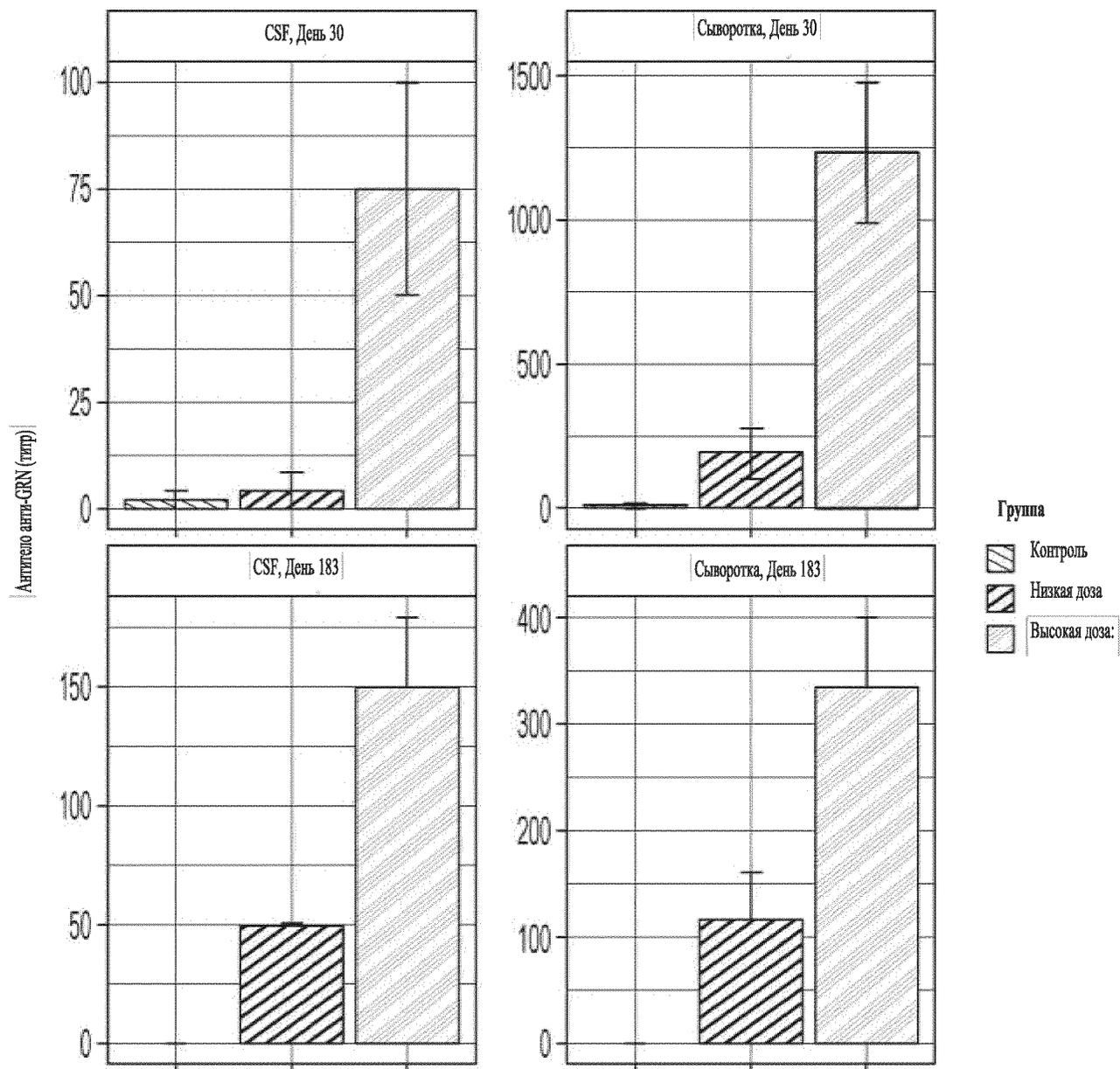


Фиг. 53K

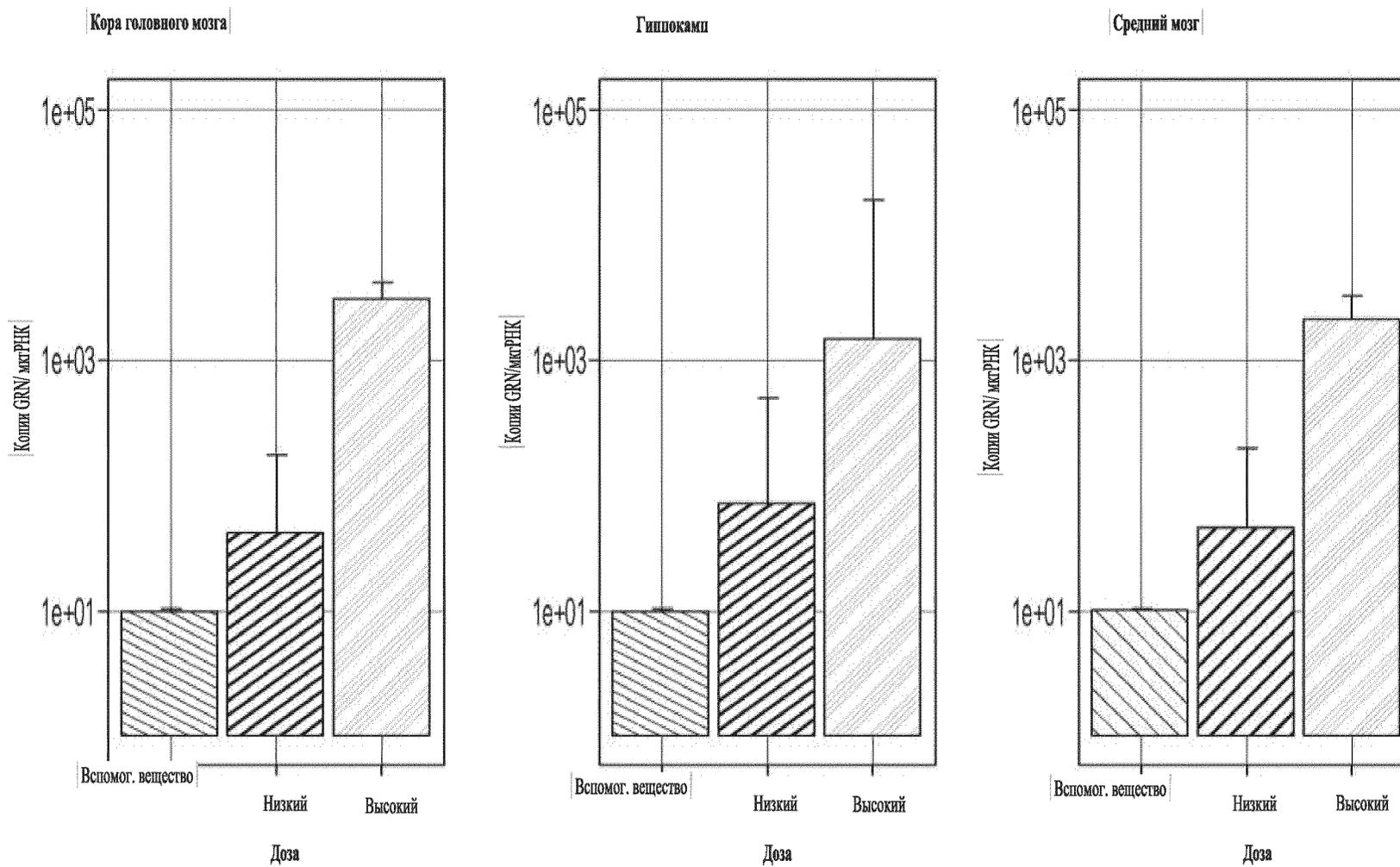




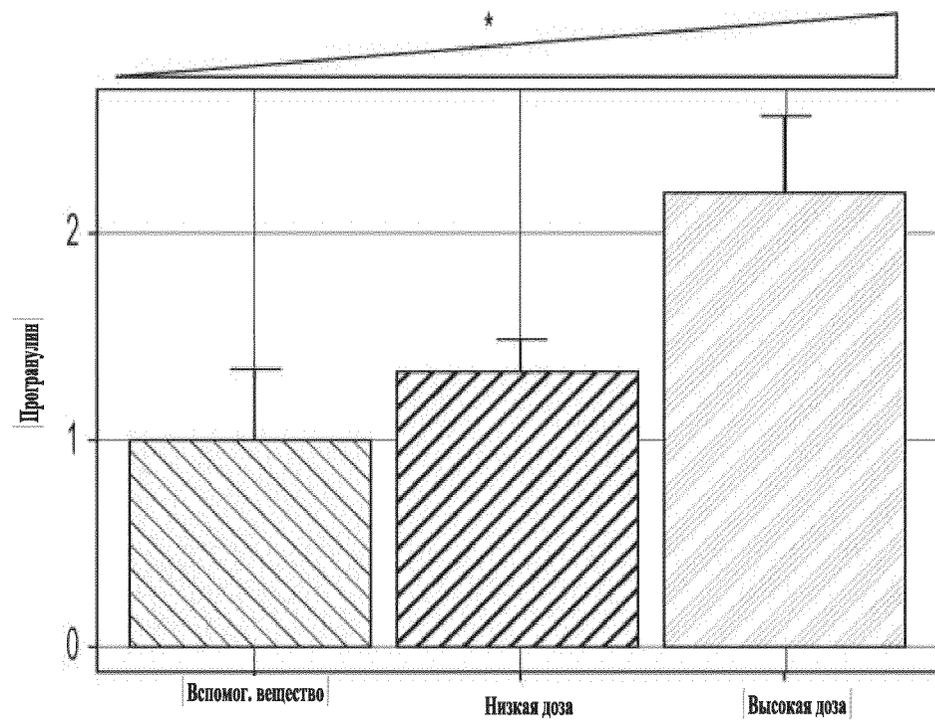
Доза
Фиг. 54А



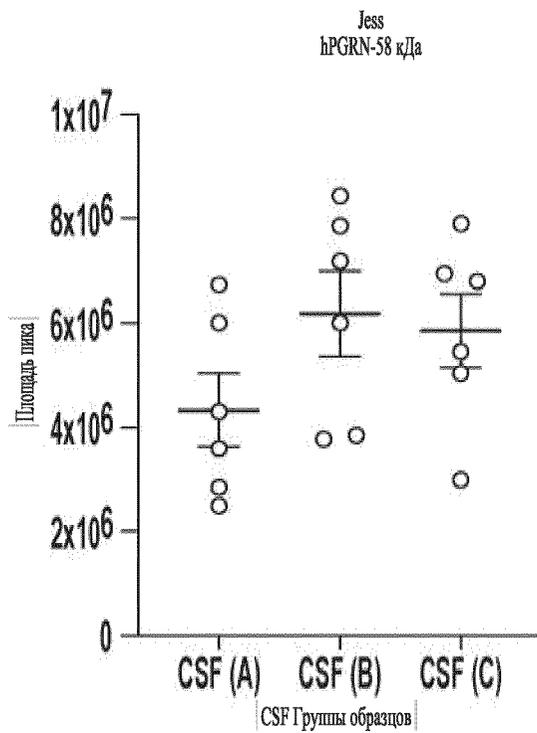
Фиг. 54В



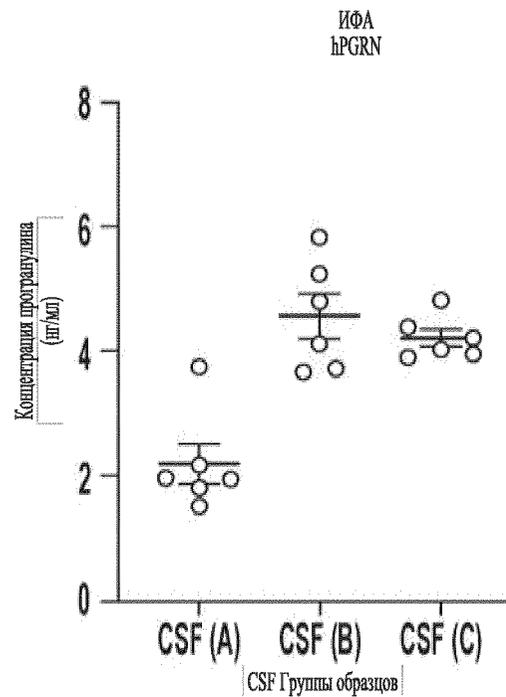
Фиг. 54С



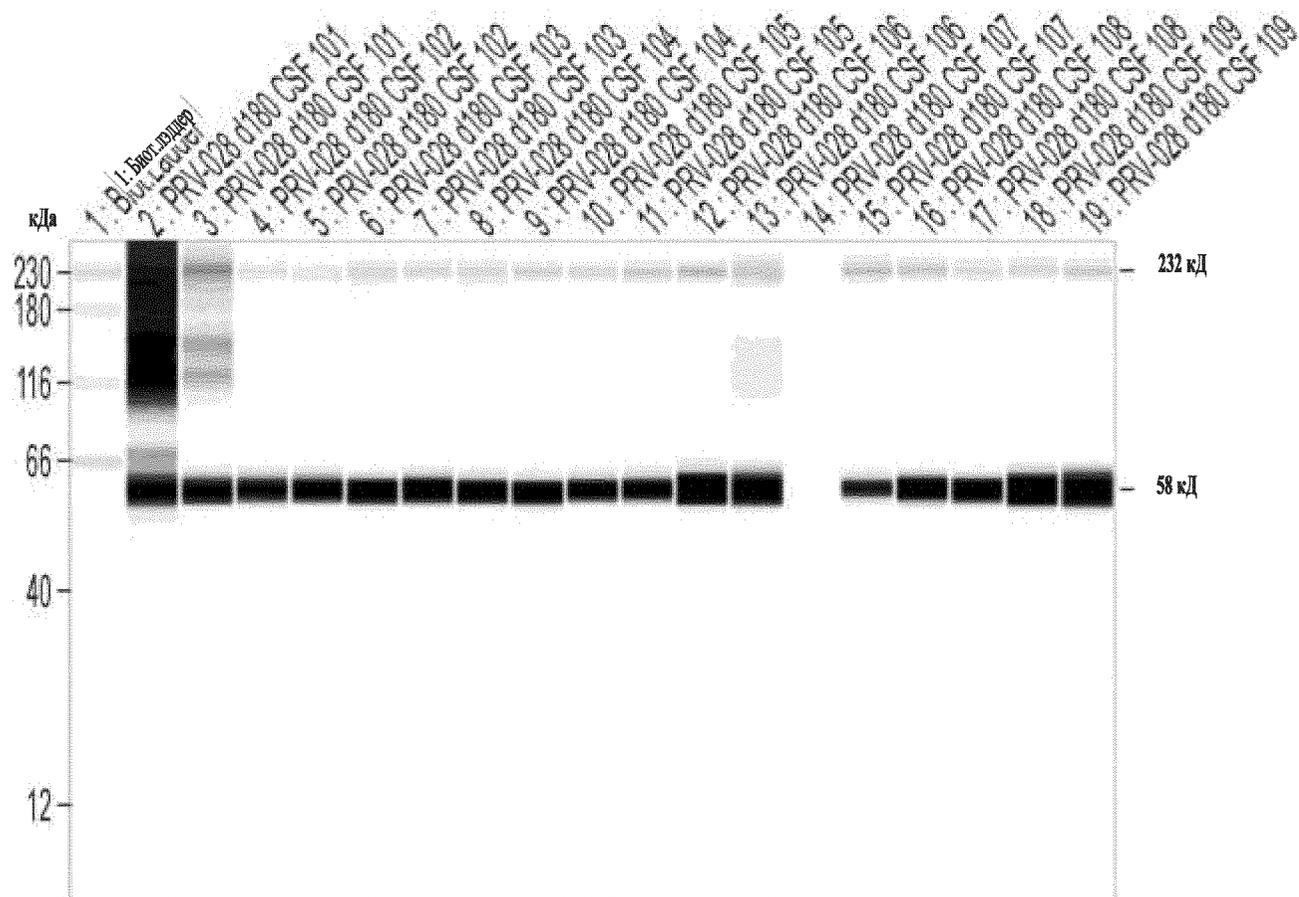
Фиг. 54D



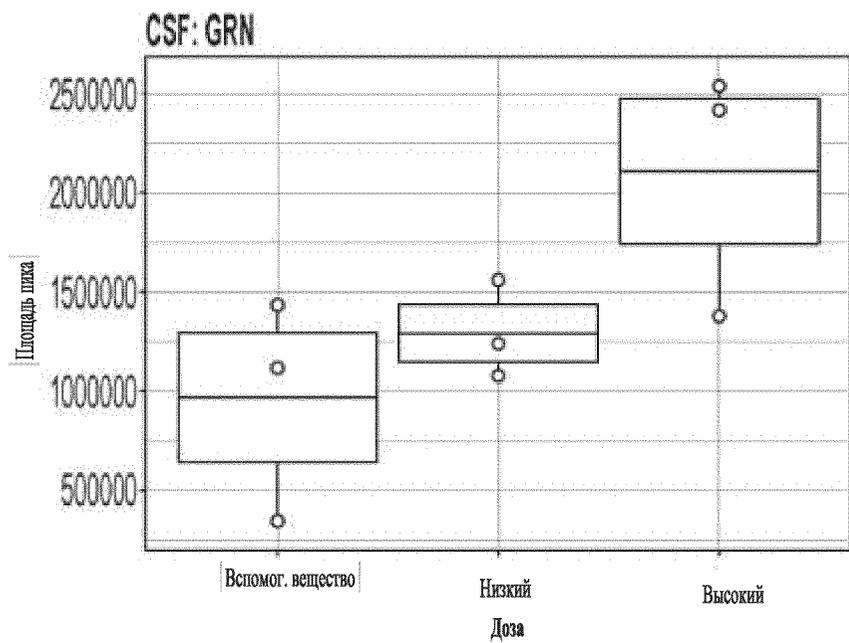
Фиг. 55



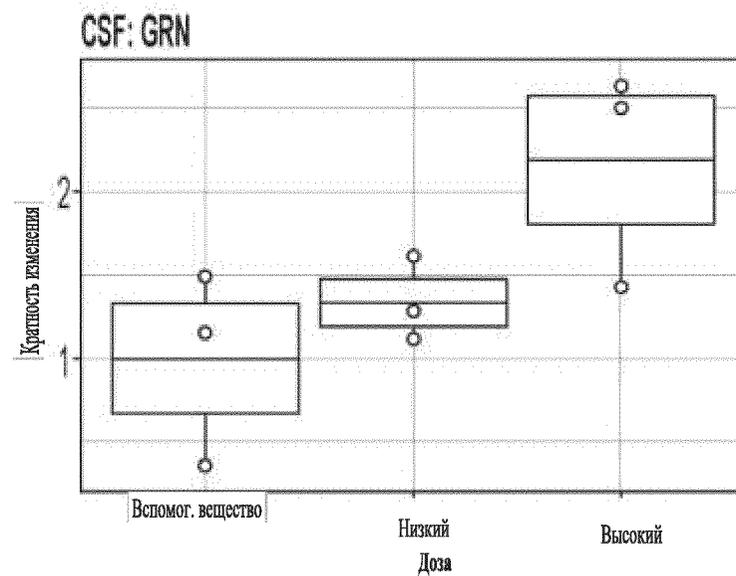
Фиг. 56



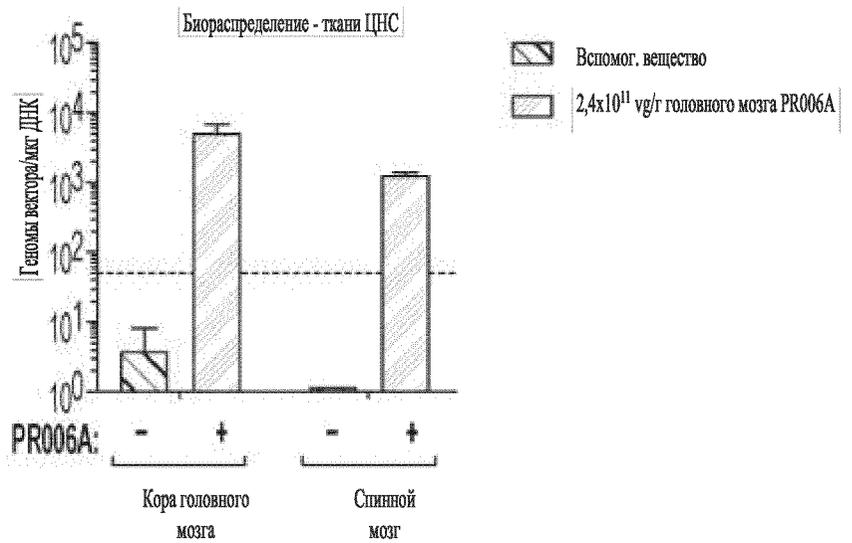
Фиг. 57



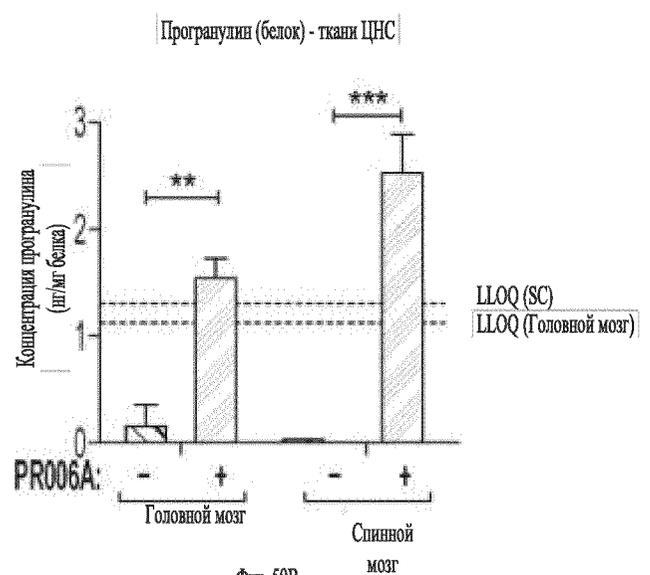
Фиг. 58А



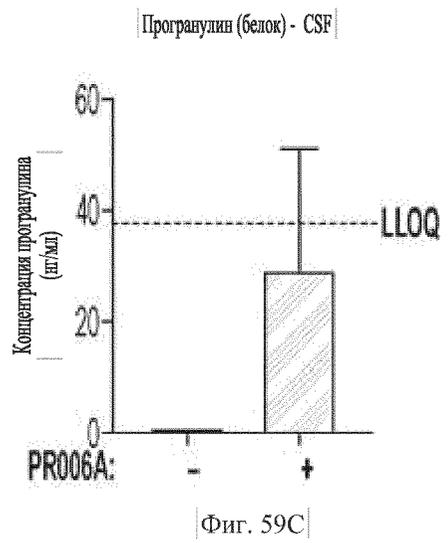
Фиг. 58В



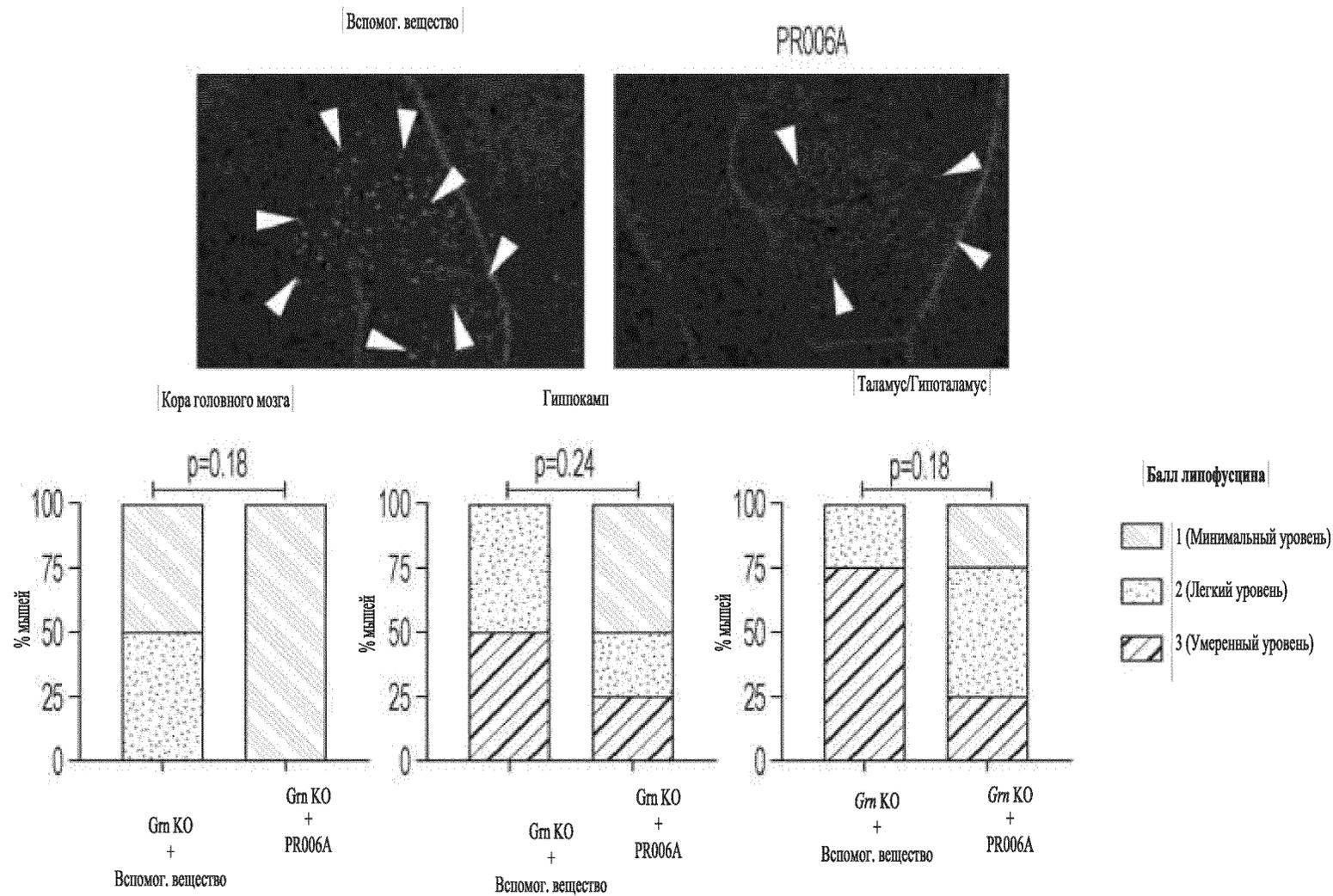
Фиг. 59А



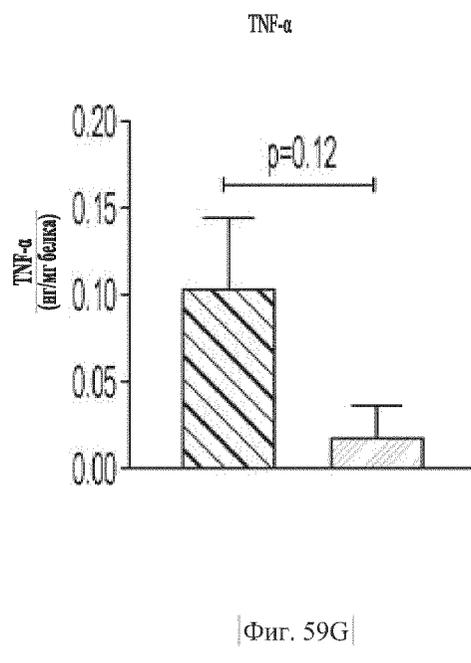
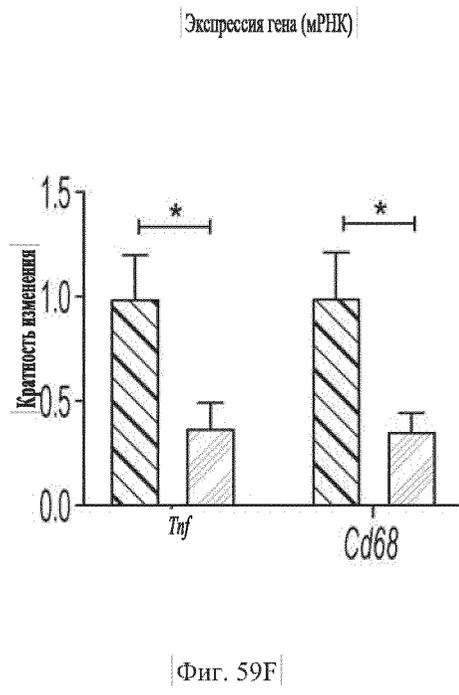
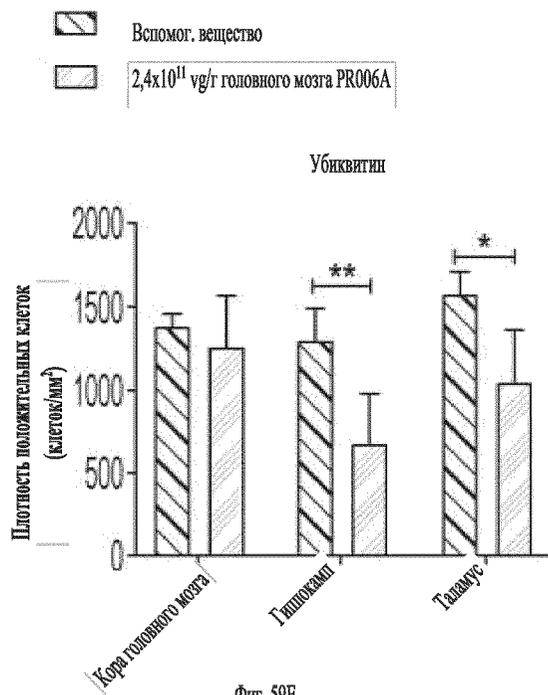
Фиг. 59В

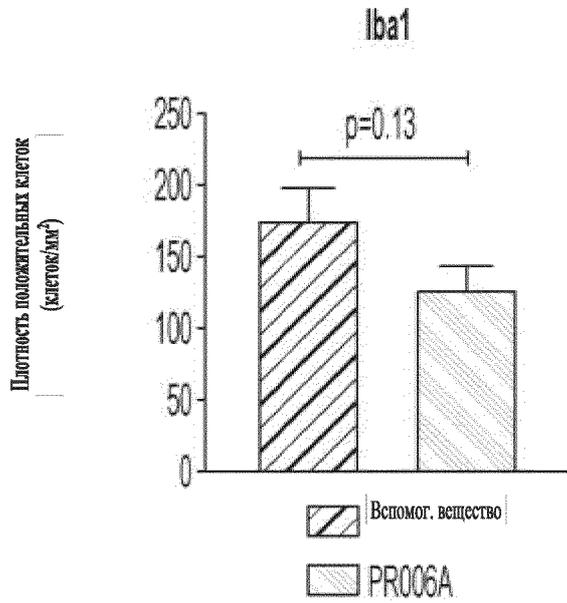


Фиг. 59С

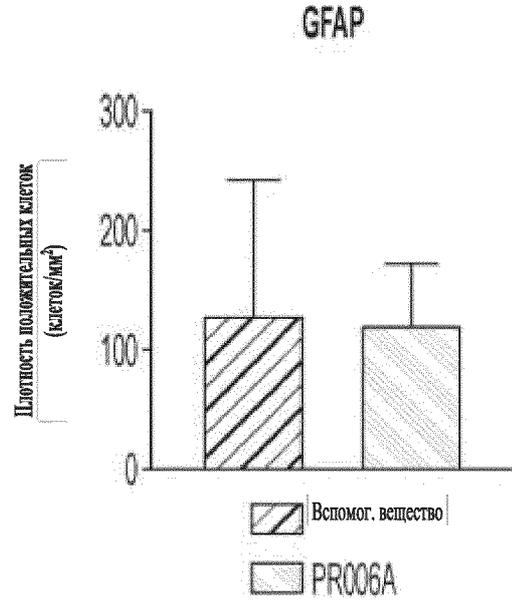


Фиг. 59D

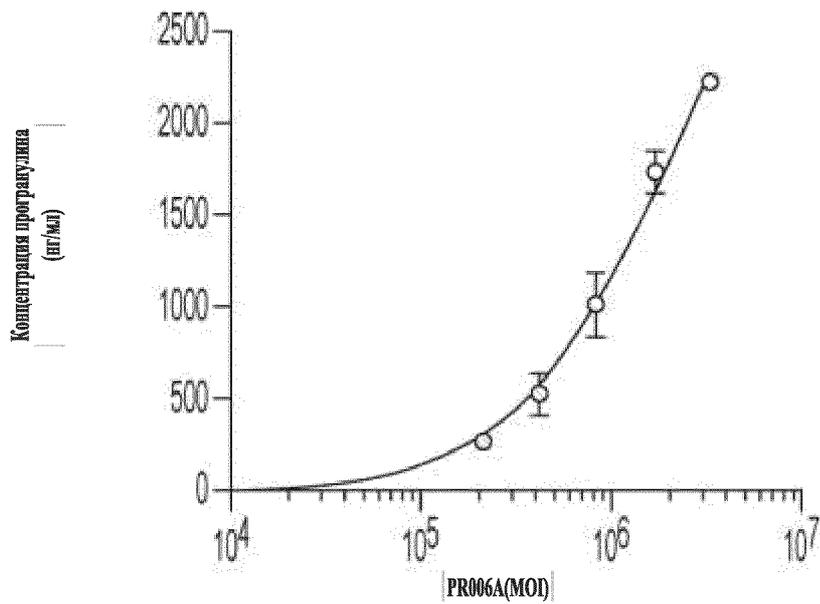




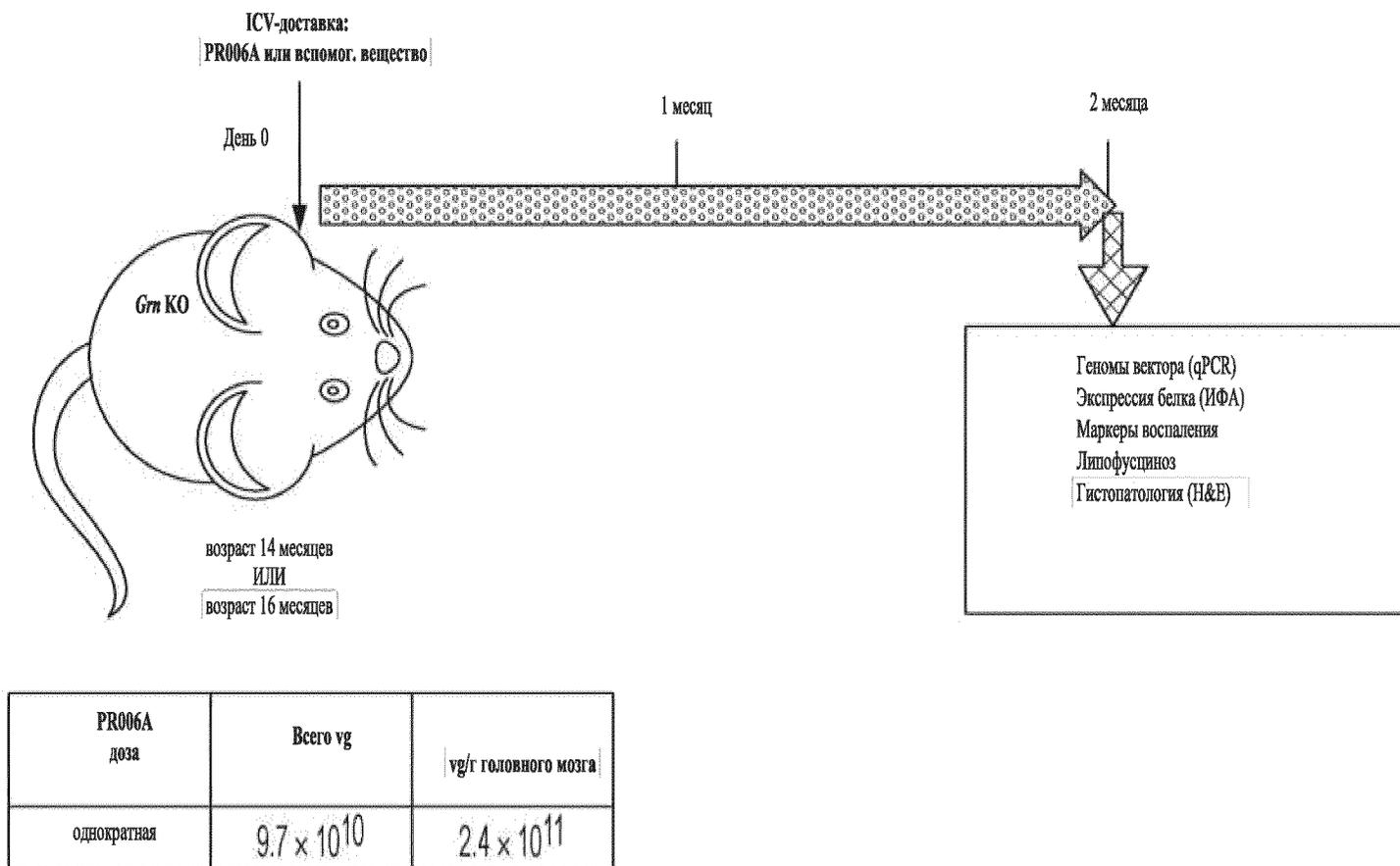
Фиг. 59H



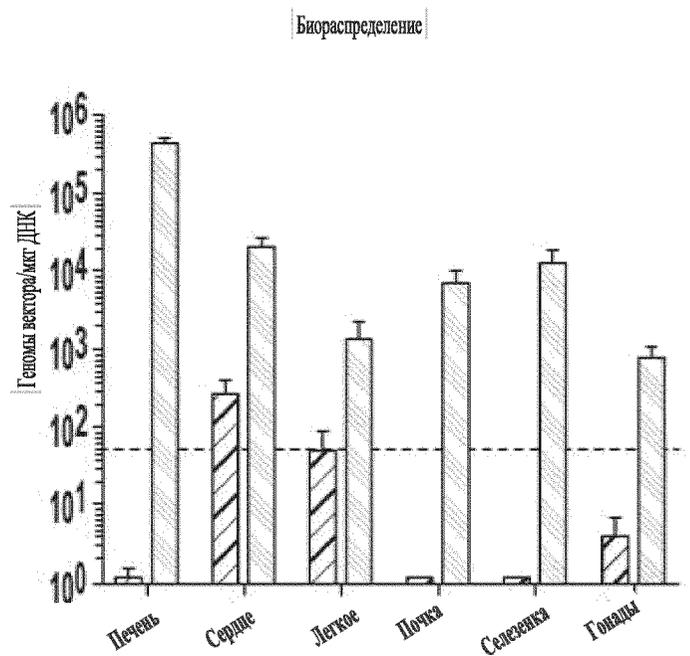
Фиг. 59I



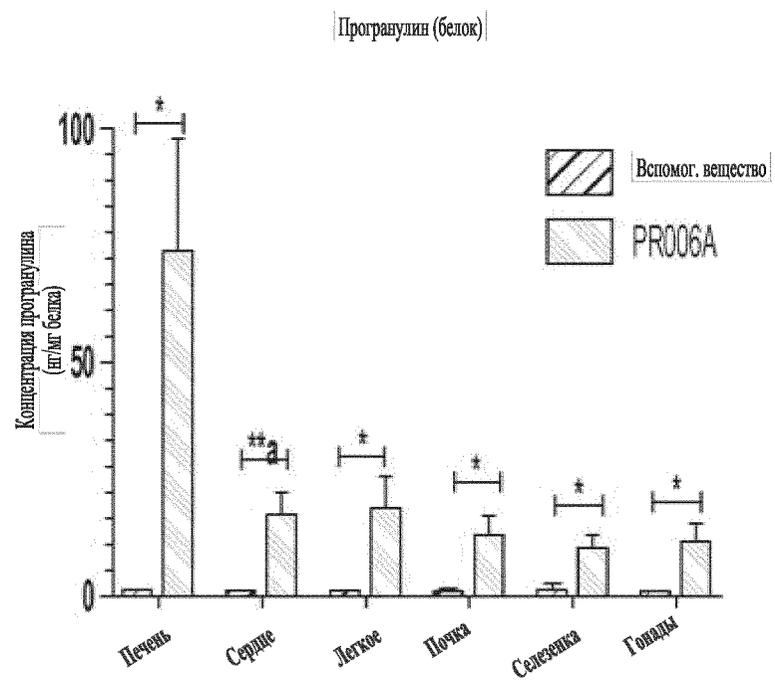
Фиг. 60



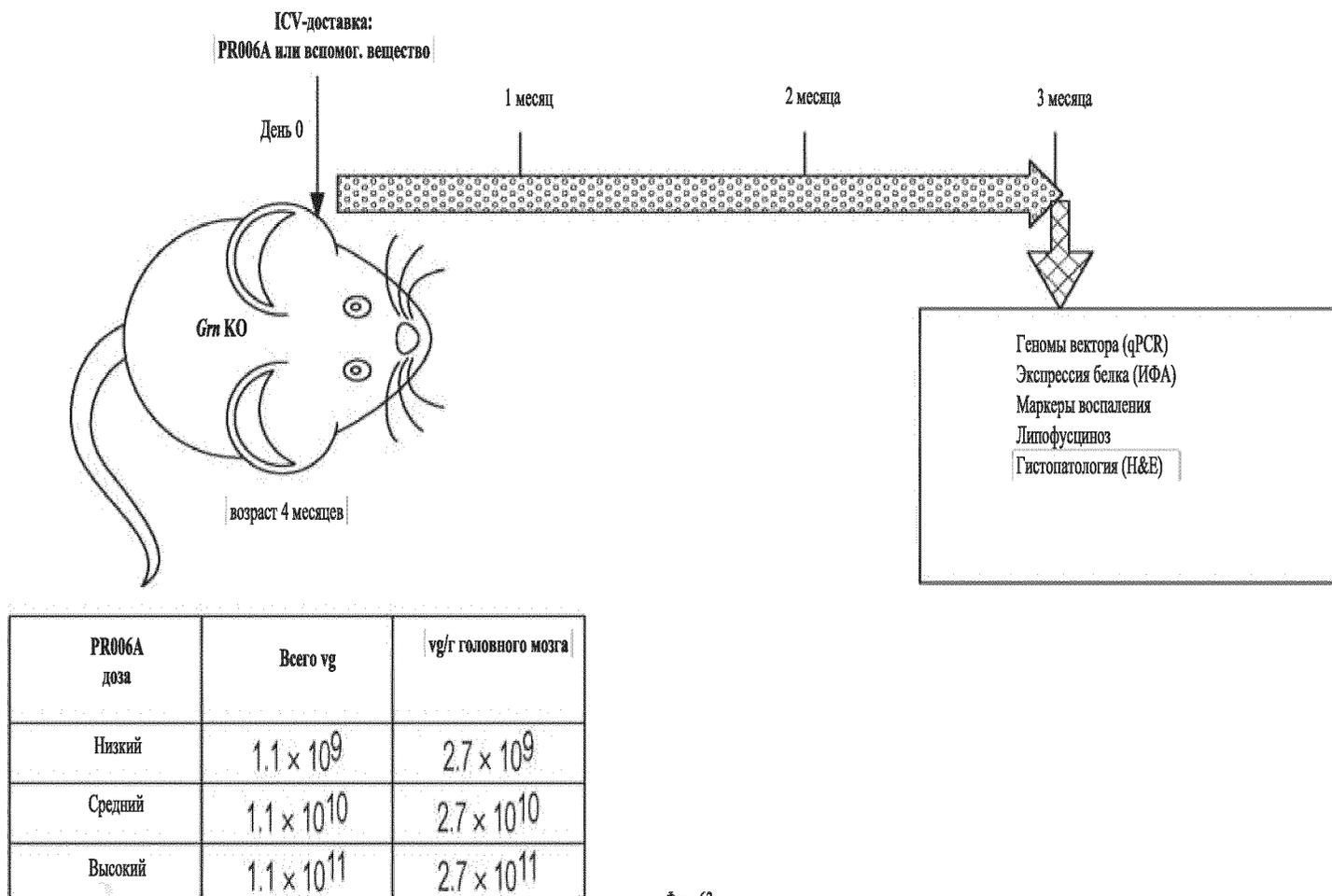
Фиг. 61



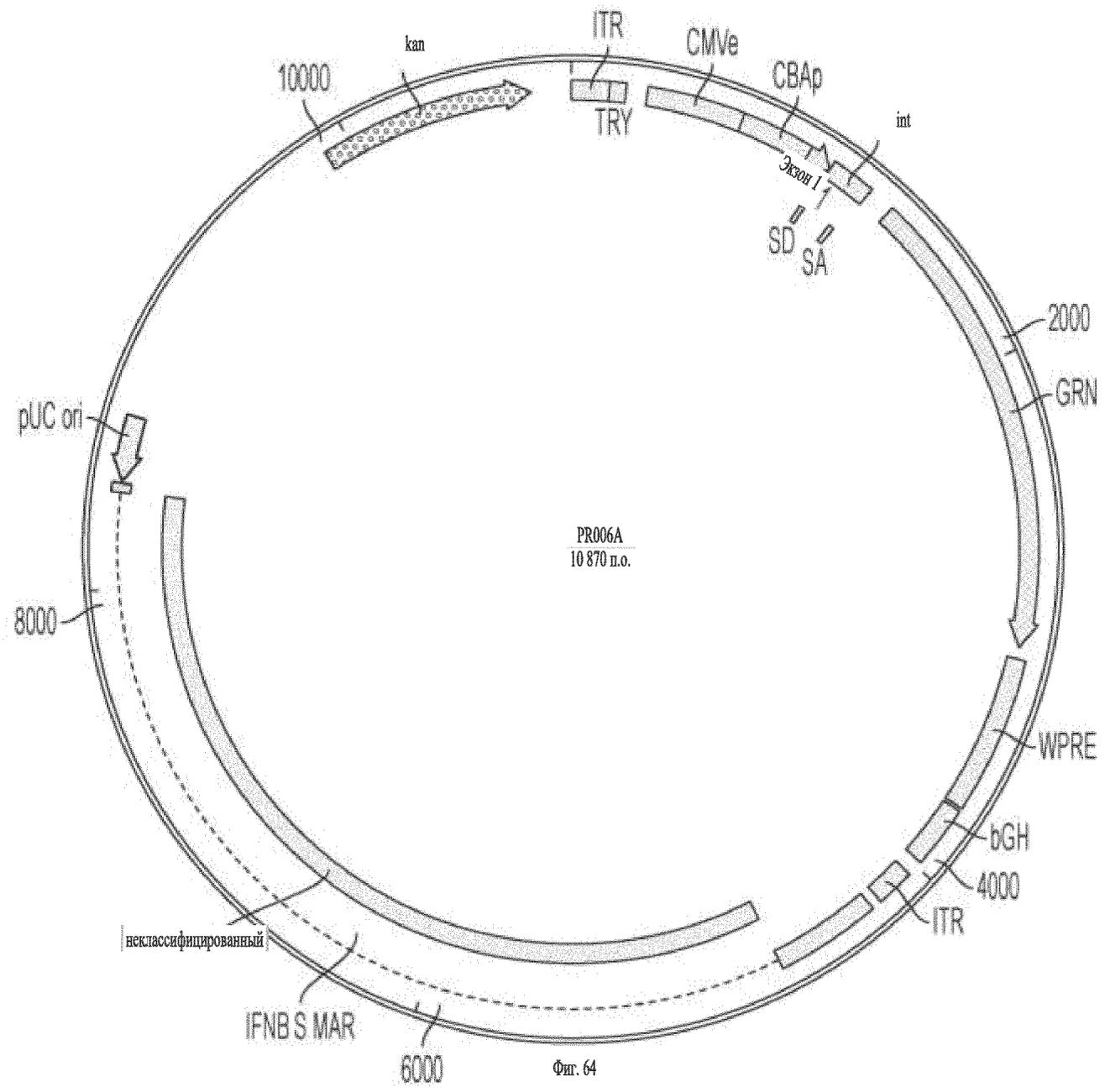
Фиг. 62А



Фиг. 62В



Фиг. 63



Фиг. 64