

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192791** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.05

(22) Дата подачи заявки
2020.04.10

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 62/831,856; 62/831,840; 62/831,846;
62/832,223; 62/934,450; 62/954,089;
62/960,471; 62/988,665; 62/990,246
(32) 2019.04.10; 2019.04.10; 2019.04.10;
2019.04.10; 2019.11.12; 2019.12.27;
2020.01.13; 2020.03.12; 2020.03.16
(33) US
(86) PCT/US2020/027658
(87) WO 2020/210615 2020.10.15
(71) Заявитель:
ПРЕВЕЙЛ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Абелиович Аса, Хекман Лора, Ринн
Эрв (US)

(74) Представитель:
Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Парамонова К.В., Прищепный
С.В., Джермакян Р.В. (RU)

(57) В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к композициям и способам лечения заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), например, болезни Паркинсона (PD) и болезни Гоше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем раскрытии предусмотрены конструкции экспрессии, содержащие трансген, кодирующий один или несколько генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, и/или одну или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот, нацеленных на гены или генные продукты, ассоциированные с заболеванием ЦНС. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем описании предусмотрены способы лечения заболеваний ЦНС путем введения таких конструкций экспрессии субъекту, нуждающемуся в этом.

A1

202192791

202192791

A1

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ОПИСАНИЕ

Родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно 119 (e) 35 U.S.C. даты подачи предварительной заявки США с серийными номерами 62/832223, поданной 10 апреля 2019 г., под названием «ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ AAV, КОДИРУЮЩИЕ TREM2, И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ», 62/831840, поданной 10 апреля 2019 г., под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ», 62/831846, поданной 10 апреля 2019 г., под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ», 62/831856, поданной 10 апреля 2019 г., по названию «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ», 62/934450, поданной 12 ноября 2019 г., под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ», 62/954089, поданной 27 декабря 2019 г., под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ», 62/960471, поданной 13 января 2020 г., под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ», 62/998,665, поданной 12 марта 2020 г., под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ», и 62/990246, поданной 16 марта 2020 г., под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ», полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Болезнь Гоше представляет собой редкую врожденную ошибку метаболизма гликофинголипидов вследствие дефицита β -глюкоцереброзидазы лизосомальной кислоты (Gcase, «GBA»). Пациенты страдают от симптомов, не связанных с ЦНС, включая гепатоспленомеглию, недостаточность костного мозга, приводящую к панцитопении, заболевания легких и фиброз, а также дефекты костей. Кроме того, значительное количество пациентов страдает неврологическими проявлениями, включая нарушенные 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 кроветворения костного мозга и внутренних органов, включая заместительную ферментативную терапию, как описано ниже, шапероноподобные низкомолекулярные лекарственные

средства, которые связываются с дефектной Gcase и повышают стабильность, и субстрат-редуцирующую терапию, которая блокирует продуцирование субстрата, который накапливается при болезни Гоше, что приводит к появлению симптомов и проявлений. Однако другие аспекты болезни Гоше (особенно те, которые влияют на скелет и головной мозг), по-видимому, являются рефрактерными к лечению.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее раскрытие частично относится к композициям и способам лечения определенных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), например нейродегенеративных заболеваний (например, нейродегенеративных заболеваний, представленных в Табл. 2), синуклеинопатий (например, синуклеинопатий, представленных в Табл. 3), таупатий (таупатий, представленных в Табл. 4) или лизосомных болезней накопления (например, лизосомных болезней накопления, представленных в Табл. 5).

Помимо пациентов с болезнью Гоше (которые обладают мутациями в обоих хромосомных аллелях гена *GBA1*), пациенты с мутациями только в одном аллеле *GBA1* имеют повышенный риск болезни Паркинсона (PD). Тяжесть симптомов болезни Паркинсона, которые включают затруднение походки, тремор в покое, ригидность и часто депрессию, трудности со сном 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 легкой мутацией в *GBA1* обычно имеют более доброкачественное течение. Носители мутаций также подвержены высокому риску других расстройств, связанных с PD, включая деменцию с тельцами Леви, характеризующуюся исполнительной дисфункцией, психозом и PD-подобным расстройством движений, а также мультисистемную атрофию с характерными двигательными и когнитивными нарушениями. Способы лечения, которые изменяли бы неизбежное течение этих расстройств, отсутствуют.

Дефицит ферментов, таких как Gcase (например, генный продукт гена *GBA1*), а также общие варианты многих генов, участвующих в функции лизосом или перенос макромолекул в лизосомы (например, лизосомный мембранный белок 1 (LIMP), также обозначаемый как SCARB2), были ассоциированы с повышенным риском PD и/или риском болезни Гоше (например, нейронопатической болезни Гоше, такой как болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа). Раскрытие частично основано на конструкциях экспрессии (например, векторах), кодирующих один или несколько генов, например,

Gcase, GBA2, просапозин, програнулин, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2, TMEM106B или комбинацию любых из вышеперечисленных (или их частей), ассоциированных с заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС), например, болезнью Гоше, болезнью Паркинсона и т.д. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комбинации генных продуктов, описанные в данном документе, действуют совместно (например, синергетически) для уменьшения одного или нескольких признаков и симптомов заболевания ЦНС при экспрессии у субъекта.

Соответственно, в соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, генный продукт гена *GBA1*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую Gcase, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Gcase, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_000148.2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 15. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Gcase.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую просапозин (например, генный продукт гена *PSAP*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую просапозин, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая просапозин, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_002769.1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 17. В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок просапозин.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую LIMP2/SCARB2 (например, генный продукт гена *SCARB2*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SCARB2, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая LIMP2/SCARB2, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_005497.1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 19. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SCARB2.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок GBA2 (например, генный продукт гена *GBA2*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GBA2, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая GBA2, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_065995.1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 31. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV),

например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок GBA2.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок GALC (например, генный продукт гена *GALC*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GALC, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая GALC, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_000144.2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 34. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок GALC.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок CTSB (например, генный продукт гена *CTSB*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую CTSB, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CTSB, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_001899.1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 36. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок CTSB.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена

выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок SMPD1 (например, генный продукт гена *SMPD1*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SMPD1, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SMPD1, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_000534.3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 38. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SMPD1.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок GCH1 (например, генный продукт гена *GCH1*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GCH1, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая GCH1, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_000534.3). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 46. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок GCH1.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок RAB7L (например, генный продукт гена *RAB7L*). В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую RAB7L, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RAB7L, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_003920.1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 48. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок RAB7L.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок VPS35 (например, генный продукт гена *VPS35*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую VPS35, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая VPS35, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_060676.2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 50. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок VPS35.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок IL-34 (например, генный продукт гена *IL-34*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую IL-34, которая была кодон-оптимизирована (например,

кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-34, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_689669.2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 56. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок IL-34.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок TREM2 (например, генный продукт гена *TREM*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TREM2, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TREM2, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_061838.1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 58. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок TREM2.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую белок TMEM106B (например, генный продукт гена *TMEM106B*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TMEM106B, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TMEM106B, кодирует белок,

содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_060844.2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 64. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок TMEM106B.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую програнулин (например, генный продукт гена PGRN, также обозначаемого как ген GRN). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую просапозин, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая програнулин (PGRN, также обозначаемый как GRN), кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67 (например, как изложено в референтной последовательности NCBI NP_002078.1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 68. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок просапозин.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенным нуклеиновым кислотам и конструкциям экспрессии (например, векторам на основе гAAV), кодирующим одну или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот нацелены на ген, ассоциированный с некоторыми заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС) (например, *SNCA*, *TMEM106B*, *RPS2* или *MAPT*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующие нуклеиновые кислоты экспрессируются по отдельности или в комбинации с одним или несколькими генными продуктами, описанными в данном документе (например, GBA1, PSAP, PRGN и т.д.). В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *SNCA*, и 2) белок GBA1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *SNCA*, и 2) белок PSAP. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *SNCA*, и 2) белок PGRN (например, белок GRN). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *MAPT*, и 2) белок GBA1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *MAPT*, и 2) белок PSAP. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *MAPT*, и 2) белок PGRN (например, белок GRN). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *TMEM106B*, и 2) белок GBA1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *TMEM106B*, и 2) белок PSAP. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *TMEM106B*, и 2) белок PGRN (например, белок GRN). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *RPS25*, и 2) белок GBA1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *RPS25*, и 2) белок PSAP. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует 1) ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *RPS25*, и 2) белок PGRN (например, белок GRN).

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность α -Syn, фланкированную инвертированными концевыми повторами AAV (ITR). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота комплементарна по меньшей мере шести смежным нуклеотидам

последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 90. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в любой из SEQ ID NO: 20-25. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 94-99.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность TМЕМ106В, фланкированную инвертированными концевыми повторами AAV (ITR). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота комплементарна по меньшей мере шести смежным нуклеотидам последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 91. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO: 92 или 93. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 65 или 66.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность MАРТ, фланкированную инвертированными концевыми повторами AAV (ITR). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота комплементарна по меньшей мере шести смежным нуклеотидам последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 114. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой ингибирующую РНК, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO: 123, 124, 127, 128, 131, 132, 135 или 136. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 125, 126, 129, 130, 133, 134, 137 или 138.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую первый генный продукт и второй генный продукт, при этом каждый генный продукт независимо выбран из генных продуктов или их частей, указанных в Табл. 1, или

ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на ген или генный продукт, изложенный в Табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый генный продукт представляет собой белок и второй генный продукт представляет собой белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый генный продукт представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту, а второй генный продукт представляет собой белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый генный продукт представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту и второй генный продукт представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый генный продукт представляет собой белок Gcase или его часть. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй генный продукт представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *SNCA*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота представляет собой siRNA, shRNA, miRNA или dsRNA, необязательно при этом интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию белка α -Syn. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит один или несколько промоторов, необязательно при этом каждый из одного или нескольких промоторов независимо представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA), промотор CAG, промотор CD68 или промотор JeT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES), необязательно при этом IRES расположен между первым генным продуктом и вторым генным продуктом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит кодирующую последовательность саморасщепляющегося пептида, необязательно при этом саморасщепляющийся пептид представляет собой T2A. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит две последовательности инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), фланкирующие первый генный продукт и второй генный продукт.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую первый генный продукт и второй генный продукт, при этом каждый генный продукт независимо выбран из генных продуктов или их частей, указанных в Табл. 1, или ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на ген или генный продукт, изложенный

в Табл. 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый генный продукт или второй генный продукт представляет собой белок Gcase или его часть. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый генный продукт представляет собой белок Gcase, а второй генный продукт выбран из GBA2, просапозина, програнулина, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2 и TMEM106B.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии кодирует (например, отдельно или в дополнение к другому генному продукту) интерферирующую нуклеиновую кислоту (например, shRNA, miRNA, dsRNA и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию α -синуклеина (α -синуклеина). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии кодирует ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на SNCA, и кодирует один или несколько генных продуктов, выбранных из GBA1, GBA2, PSAP, PRGN, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2 и TMEM106B. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на α -синуклеин, содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 20-25. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на α -синуклеин, связывается (например, гибридизуется) с последовательностью, изложенной в любой из SEQ ID NO: 20-25.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию TMEM106B. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии кодирует ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *TMEM106B*, и кодирует один или несколько генных продуктов, выбранных из GBA1, GBA2, PSAP, PRGN, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34 и TREM2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на TMEM106B, содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 65 или 66. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на TMEM106B, связывается (например, гибридизуется) с последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 65 или 66.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию MAPT. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления конструкция экспрессии конструкция кодирует ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на *MART*, и кодирует один или несколько генных продуктов, выбранных из GBA1, GBA2, PSAP, PRGN, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2 и TMEM106B. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на *MART*, содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 123-138. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на *MART*, связывается (например, гибридизуется) с последовательностью, изложенной в любой из SEQ ID NO: 123-138.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию RPS25. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии конструкция кодирует ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на RPS25, и кодирует один или несколько генных продуктов, выбранных из GBA1, GBA2, PSAP, PRGN, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2 и TMEM106B. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на RPS25, содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 115-122. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на RPS25, связывается (например, гибридизуется) с последовательностью, изложенной в любой из SEQ ID NO: 115-122. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии дополнительно содержит один или несколько промоторов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA), промотор CAG, промотор CD68 или промотор JeT. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор представляет собой промотор РНК pol II (например, или промотор РНК pol III (например, U6 и т.д.).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления IRES располагается между первым генным продуктом и вторым генным продуктом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии дополнительно содержит последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид T2A.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии содержит две последовательности инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). В соответствии с некоторыми вариантами 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 соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна из последовательностей ITR выделенной нуклеиновой кислоты не имеет функционального сайта концевой разрешения (trs). Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления одним из ITR является Δ ITR.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к векторам на основе гAAV, содержащим ITR, имеющий модифицированную область «D» (например, последовательность D, которая модифицирована относительно ITR AAV2 дикого типа, SEQ ID NO: 29). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ITR, имеющий модифицированную область D, представляет собой 5' ITR вектора на основе гAAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированная область «D» содержит последовательность «S», например, как изложено в SEQ ID NO: 26. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ITR, имеющий модифицированную область «D», представляет собой 3' ITR вектора на основе гAAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированная область «D» содержит 3' ITR, в которой область «D» расположена на 3' конце ITR (например, на внешнем или терминальном конце ITR относительно вставки трансгена в вектор). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированная область «D» содержит последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 26 или 27.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота (например, вектор на основе гAAV) содержит область TRY. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления область TRY содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 28.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота, описанная в настоящем раскрытии, содержит пептид, имеющий последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 1-149, состоит из него или кодирует его.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрен вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем раскрытии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор представляет

собой плазмиду или вирусный вектор. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного AAV (rAAV) или вектор на основе бакуловируса. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе rAAV является однокитевым (например, однокитевая ДНК).

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем раскрытии, или вектор, как описано в настоящем раскрытии.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий капсидный белок и выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, как описано в настоящем раскрытии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления капсидный белок способен проникать через гематоэнцефалический барьер, например, капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAVrh.10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления rAAV трансдуцирует нейроны и отличные от нейронов клетки центральной нервной системы (ЦНС).

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения субъекта, имеющего или с подозрением на наличие заболевания центральной нервной системы (ЦНС), при этом способ включает введение субъекту композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор или rAAV), как описано в настоящем раскрытии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание ЦНС представляет собой нейродегенеративное заболевание, такое как нейродегенеративное заболевание, представленное в Табл. 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание ЦНС представляет собой синуклеинопатию, такую как синуклеинопатия, представленная в Табл. 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание ЦНС представляет собой таупатию, такую как таупатия, представленная в Табл. 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание ЦНС представляет собой лизосомную болезнь накопления, такую как лизосомная болезнь накопления, представленная в Табл. 5. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лизосомная болезнь накопления представляет собой нейронопатическую болезнь Гоше, такую как болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения заболевания, выбранного из болезни Паркинсона

(например, болезни Паркинсона с мутацией GBA1 (PD-GBA), спорадической болезни Паркинсона (sPD), болезни Гоше (например, нейронопатической болезни Гоше (nGD), болезни Гоше I типа (T1GD), болезни Гоше II типа (T2GD) и болезни Гоше III типа (T3GD)), деменции с тельцами Леви (DLB), бокового амиотрофического склероза (ALS) и болезни Ниманна-Пика типа C (NPC) с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует GBA1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения лобно-височной деменции (например, лобно-височной деменции с мутацией GRN (FTD-GRN), лобно-височной деменции с мутацией *MAPT* (FTD-tau) и лобно-височной деменции с мутацией C9ORF72 (FTD-C9orf72)), болезни Паркинсона (PD), болезни Альцгеймера (AD), нейронального цероидного липофусциноза (NCL), кортикобазальной дегенерации (CBD), болезни моторных нейронов (MND) или болезни Гоше (GD) с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует PGRN (например, GRN).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения синуклеинопатий (например, множественной системной атрофии (MSA), болезни Паркинсона (PD), болезни Паркинсона с мутацией GBA1 (PD-GBA), слабоумия с тельцами Леви (DLB), деменции с тельцами Леви с мутацией *GBA1* и болезнью телец Леви) с помощью введения субъекту, нуждающегося в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует генный продукт GBA1, и ингибирующей нуклеиновой кислоты, нацеленной на SNCA.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения заболевания, выбранного из болезни Паркинсона (PD), лобно-височной деменции (например, лобно-височной деменции с мутацией GRN (FTD-GRN)), лизосомных болезней накопления (LSD) или болезни Гоше (GD) с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует PSAP.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения болезни Альцгеймера (AD), болезни Насу-Хакола (NHD) или болезни Паркинсона (PD) с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом,

выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует TREM2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения болезни Альцгеймера (AD) или лобно-височной деменции (лобно-височной деменции с мутацией MAPT (FTD-Tau), прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), нейродегенеративного заболевания, болезни телец Леви (LBD) или болезни Паркинсона с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует ингибирующие нуклеиновые кислоты, нацеленные на *MAPT*.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения субъекта, имеющего или с подозрением на наличие болезни Паркинсона, при этом способ включает введение субъекту композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор или гAAV), как описано в настоящем раскрытии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция содержит нуклеиновую кислоту (например, геном гAAV, например, инкапсидированный капсидными белками AAV), которая кодирует два или более генных продукта (например, генные продукты, ассоциированные с заболеванием ЦНС), например 2, 3, 4, 5 или более генных продуктов, описанных в настоящей заявке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция содержит две или более (например, 2, 3, 4, 5 или более) различных нуклеиновых кислот (например, два или более генома гAAV, например, отдельно инкапсидированных капсидными белками AAV), каждая из которых кодирует один или несколько различных генных продуктов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту вводят две или несколько разных композиций, каждая из которых содержит одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих разные генные продукты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления разные генные продукты функционально связаны с одним и тем же типом промотора (например, с одним и тем же промотором). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления разные генные продукты функционально связаны с разными промоторами.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение включает прямую инъекцию в ЦНС субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления прямая инъекция представляет собой интрацеребральную инъекцию, интрапаренхимальную инъекцию,

интратекальную инъекцию, инъекцию в большую цистерну или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта включает конвекционную усовершенствованную доставку (CED).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение включает периферическую инъекцию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления периферическая инъекция представляет собой внутривенную инъекцию.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения субъекта, имеющего заболевание центральной нервной системы (ЦНС) или с подозрением на него, при этом способ включает введение субъекту выделенной нуклеиновой кислоты, содержащей: (i) конструкцию экспрессии, содержащую трансген, кодирующий один или несколько генных продуктов, представленных в Табл. 1, или ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на ген или генный продукт, изложенные в Табл. 1; и (ii) два инвертированных концевых повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), фланкирующие конструкцию экспрессии. В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения субъекта, имеющего заболевание центральной нервной системы (ЦНС) или с подозрением на него, при этом способ включает введение субъекту двух или более типов выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих различные генные продукты, причем каждый тип выделенной нуклеиновой кислоты содержит: (i) конструкцию экспрессии, содержащую трансген, кодирующий один или несколько генных продуктов, представленных в Табл. 1, или ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на ген или генный продукт, изложенные в Табл. 1; и (ii) два инвертированных концевых повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), фланкирующие конструкцию экспрессии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген кодирует один или несколько белков, выбранных из: GBA1, GBA2, PGRN (например, GRN), TREM2, PSAP, SCARB2, GALC, SMPD1, CTSB, RAB7L, VPS35, GCH1 и IL34. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген, кодирующий один или несколько генных продуктов, содержит кодирующую кодон-оптимизированную последовательность белка. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген кодирует одну или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот, нацеленных на SNCA, MAPT, RPS25 и/или TMEM106B.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ITR AAV представляют собой ITR AAV2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая

кислота упакована в рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления rAAV содержит капсидный белок AAV9.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является млекопитающее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является человек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание ЦНС представляет собой нейродегенеративное заболевание, синуклеинопатию, таупатию и/или лизосомную болезнь накопления (LSD). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание ЦНС представлено в Табл. 2, Табл. 3, Табл. 4 или Табл. 5.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение включает прямую инъекцию в ЦНС субъекта, необязательно при этом прямая инъекция представляет собой интрацеребральную инъекцию, интрапаренхимальную инъекцию, интратекальную инъекцию, инъекцию в большую цистерну или любую их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления инъекция в большую цистерну представляет собой субокципитальную инъекцию в большую цистерну. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта включает конвекционную усовершенствованную доставку (CED). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение включает периферическую инъекцию, необязательно при этом периферическая инъекция представляет собой внутривенную инъекцию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту вводят от приблизительно 1×10^{10} vg до приблизительно 1×10^{16} vg rAAV.

Краткое описание графических чертежей

На Фиг. 1 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть).

На Фиг. 2 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и LIMP2 (*SCARB2* или его часть). Кодированные последовательности Gcase и LIMP2 разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

На Фиг. 3 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и LIMP2 (*SCARB2* или его часть). Экспрессия каждой из

кодирующих последовательностей Gcase и LIMP2 управляется отдельным промотором.

На Фиг. 4 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть), LIMP2 (*SCARB2* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

На Фиг. 5 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть), просапозин (например, *PSAP* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

На Фиг. 6 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и просапозин (например, *PSAP* или его часть). Кодированные последовательности Gcase и просапозин разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

На Фиг. 7 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть). В соответствии с этим вариантом осуществления вектор содержит промоторный элемент СВА (CBA), состоящий из четырех частей: энхансера CMV (CMVe), промотора СВА (CBAp), экзона 1 и интрона (int) для конститутивной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности *GBA1* человека. 3' область также содержит регуляторный элемент WPRE, за которым следует bGH поли(A)-хвост. На 5' конце промоторной области включены три сайта транскрипционной регуляции активации: TATA, RBS и YY1. Фланкирующие ITR позволяют надлежащим образом упаковывать промежуточные последовательности. Оценивали два варианта 5' последовательности ITR (вкладка); они имеют несколько нуклеотидных различий в 20-нуклеотидной области «D» ITR AAV2 дикого типа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор гAAV содержит нуклеотидную последовательность домена «D», показанную в верхней строке. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор гAAV содержит мутантный домен «D» (например, домен «S», нуклеотидные изменения которого показаны в нижней строке).

На Фиг. 8 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, показанного на Фиг. 6.

На Фиг. 9 показаны типичные данные для доставки гAAV, содержащего трансген, кодирующий Gcase (например, *GBA1* или его часть), в мышинной модели болезни

Паркинсона с применением СВЕ. Ежедневная IP доставка носителя PBS, 25 мг/кг СВЕ, 37,5 мг/кг СВЕ или 50 мг/кг СВЕ (слева направо), инициированная 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 тесте открытого поля (внизу слева) в P23 и в тесте задержки падения на вращающемся барабане (внизу в центре) в P24. Уровни субстратов GCase анализировали в коре головного мозга мышей в группах обработки PBS и 25 мг/кг СВЕ как с отменой (день 3), так и без отмены (день 1) СВЕ. Совокупные уровни GluSph и GalSph (внизу справа) показаны в пмоль на мг сырой массы ткани. Представлены средние значения. Планки погрешностей обозначены SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, номинальные p -значения для групп обработки на основе линейной регрессии.

На Фиг. 10 представлено схематическое изображение одного из вариантов схемы исследования максимальной дозы гAAV в мышинной модели с применением СВЕ. Вкратце, гAAV вводили путем ICV инъекции в P3, а ежедневную обработку СВЕ начинали в P8. Поведение оценивали в тестах открытого поля и вращающегося барабана в P24-25, а уровни субстрата измеряли в P36 и P38.

На Фиг. 11 показаны типичные данные для оценки максимальной дозы гAAV для прижизненной оценки в мышинной модели с применением СВЕ. В P3 мышей обрабатывали либо наполнителем, либо 8,8e9 vg гAAV-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 последней дозы СВЕ в P36 (день 1), в то время как оставшаяся половина прожила еще 3 дня после отмены СВЕ перед умерщвлением в P38 (день 3). Все группы обработки (наполнитель + PBS $n = 8$, гAAV-GBA1 + PBS $n = 7$, наполнитель + СВЕ $n = 8$ и вариант + СВЕ $n = 9$) взвешивали ежедневно (вверху слева) и анализировали вес в P36 (в правом верхнем углу). Поведение оценивали по общему пройденному расстоянию в тесте открытого поля в P23 (внизу слева) и тесте задержки падения на вращающемся барабане в P24 (внизу справа), оцениваемых для каждого животного в виде медианного значения по 3 испытаниям. Вследствие летальности $n = 7$ для группы наполнитель + СВЕ для поведенческих тестов, в то время как $n = 8$ для всех остальных групп. Представлены средние значения по животным. Планки погрешностей обозначены SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, номинальные p -значения для групп обработки на основе линейной регрессии у животных, обработанных СВЕ.

На Фиг. 12 показаны типичные данные для оценки максимальной дозы гAAV для

биохимической оценки в мышинной модели с применением СВЕ. Кору головного мозга всех групп обработки (наполнитель + PBS $n = 8$, вариант + PBS $n = 7$, наполнитель + СВЕ $n = 7$ и вариант + СВЕ $n = 9$) использовали для измерения активности GCase (вверху слева), уровней GluSph (вверху справа), уровней GluCer (внизу слева) и векторных геномов (внизу справа) в группах до (день 1) или после (день 3) отмены СВЕ. Биораспределение показано в виде векторных геномов на 1 мкг геномной ДНК. Представлены средние значения. Планки погрешностей обозначены SEM. (*) $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, номинальные p -значения для групп обработки на основе линейной регрессии у животных, обработанных СВЕ, с поправками на дни сбора и пол в качестве ковариат.

На Фиг. 13 показаны типичные данные для поведенческих и биохимических корреляций в мышинной модели с применением СВЕ после введения группам обработки наполнителя + PBS, наполнителя + СВЕ и варианта + СВЕ. Во всех группах обработки эффективность теста на вращающемся барабане отрицательно коррелировала с накоплением GluCer (A, $p = 0,0012$ на основе линейной регрессии), а накопление GluSph отрицательно коррелировало с увеличением активности GCase (B, $p = 0,0086$ на основе линейной регрессии).

На Фиг. 14 показаны типичные данные для биораспределения варианта в мышинной модели с применением СВЕ. Присутствие векторных геномов оценивали в печени, селезенке, почках и гонадах для всех групп обработки (наполнитель + PBS $n = 8$, вариант + PBS $n = 7$, наполнитель + СВЕ $n = 7$ и вариант + СВЕ $n = 9$). Биораспределение показано в виде векторных геномов на 1 мкг геномной ДНК. Наличие векторного генома количественно оценивали с помощью количественной ПЦР с использованием стандартной кривой референтного вектора; концентрацию геномной ДНК оценивали с помощью измерения оптической плотности при A260. Представлены средние значения. Планки погрешностей обозначены SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, номинальные p -значения для групп обработки на основе линейной регрессии у животных, обработанных СВЕ, с поправками на дни сбора и пол в качестве ковариат.

На Фиг. 15 показаны типичные данные для оценки диапазона доз гAAV для прижизненной оценки в мышинной модели с применением СВЕ. Мыши получали наполнитель или одну из трех различных доз гAAV-GBA1 с помощью ICV доставки в P3: $3,2 \times 10^9$ vg, $1,0 \times 10^{10}$ vg или $3,2 \times 10^{10}$ vg. В P8 начинали ежедневную IP обработку в дозе 25 мг/кг СВЕ. Мыши, которым вводили наполнитель и СВЕ или наполнитель и PBS, выступали в качестве контроля. Все группы обработки начинали с $n = 10$ (5 самцов/5 самок) на группу.

Всех мышей умерщвляли через день после введения последней дозы CBE (P38-P40). Во всех группах обработки проводили ежедневное взвешивание, а их вес анализировали в P36. Двигательные характеристики оценивали по задержке падения на вращающемся барабане в P24 и по задержке при движении в сужающемся пучке света в P30. Вследствие ранней летальности количество мышей, участвовавших в поведенческих тестах, составляло: наполнитель + PBS $n = 10$, наполнитель + CBE $n = 9$ и $3,2 \times 10^9$ vg rAAV-GBA1 + CBE $n = 6$, $1,0 \times 10^{10}$ vg rAAV-GBA1 + CBE $n = 10$, $3,2 \times 10^{10}$ vg rAAV-GBA1 + CBE $n = 7$. Представлены средние значения. Планки погрешностей обозначены SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ для номинальных p -значений на основе линейной регрессии в группах, получавших CBE, с поправкой на пол в качестве ковариаты.

На Фиг. 16 показаны типичные данные для оценки диапазона доз rAAV для биохимической оценки в мышинной модели с применением CBE. Кору головного мозга всех групп обработки (наполнитель + PBS $n = 10$, наполнитель + CBE $n = 9$ и $3,2 \times 10^9$ vg rAAV-GBA1 + CBE $n = 6$, $1,0 \times 10^{10}$ vg rAAV-GBA1 + CBE $n = 10$, $3,2 \times 10^{10}$ vg rAAV-GBA1 + CBE $n = 7$) использовали для измерения активности GCase, уровней GluSph, уровней GluCer и векторных геномов. Активность GCase показана в виде нг GCase на мг общего белка. Уровни GluSph и GluCer показаны в пмоль на мг сырой массы ткани. Биораспределение показано в виде векторных геномов на 1 мкг геномной ДНК. Наличие векторного генома количественно оценивали с помощью количественной ПЦР с использованием стандартной кривой референтного вектора; концентрацию геномной ДНК оценивали с помощью измерения оптической плотности при A260. Наличие векторных геномов также измеряли в печени (E). Представлены средние значения. Планки погрешностей обозначены SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ для номинальных p -значений на основе линейной регрессии в группах, получавших CBE, с поправкой на пол в качестве ковариаты.

На Фиг. 17 показаны типичные данные для теста в сужающемся пучке света при максимальной дозе rAAV-GBA1 в генетической мышинной модели. Двигательные характеристики групп лечения (WT + наполнитель, $n = 5$), 4/PS-NA + наполнитель ($n = 6$) и 4L/PS-NA + rAAV-GBA1 ($n = 5$)) оценивали с помощью теста движения в пучке света через 4 недели после введения rAAV-GBA1. Суммарные ошибки и активное время показаны в виде общего количества за 5 испытаний при разных пучках света. Скорость и ошибки согласно определенной скорости показаны в виде среднего значения по 5 испытаниям при разных пучках света. Представлены средние значения. Планки погрешностей обозначены SEM.

На Фиг. 18 показаны типичные данные для экспрессии *in vitro* конструкций гAAV, кодирующих белок програнулин (PGRN) (также обозначаемый как белок GRN). На левой панели показана стандартная кривая анализа програнулина (PGRN) с помощью ELISA. На нижней панели показана кривая доза-ответ для экспрессии PGRN, измеренной с помощью анализа ELISA в клеточных лизатах клеток HEK293T, трансдуцированных гAAV. MOI = множественность заражения (векторных геномов на клетку).

На Фиг. 19 показаны типичные данные для экспрессии *in vitro* конструкций гAAV, кодирующих *GBA1* в комбинации с просапозинном (*PSAP*), *SCARB2* и/или одной или несколькими ингибирующими нуклеиновыми кислотами. Данные указывают на то, что трансфекция клеток HEK293 каждой конструкцией приводила к сверхэкспрессии трансгенов, представляющих интерес, по сравнению с клетками, трансфицированными имитационным контролем.

На Фиг. 20 представлена схема, изображающая векторы гAAV, содержащие область «D», расположенную «снаружи» ITR (например, проксимальнее конца ITR относительно вставки трансгена или конструкции экспрессии) (вверху) и векторы на основе гAAV дикого типа, имеющие ITR «внутри» вектора (например, проксимальнее трансгенной вставки вектора).

На Фиг. 21 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую *GBA2* или его часть и интерферирующую РНК для α -Syn.

На Фиг. 22 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и галактозилцерамидазу (например, *GALC* или его часть). Экспрессия кодирующих последовательностей Gcase и галактозилцерамидазы разделена последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

На Фиг. 23 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и галактозилцерамидазу (например, *GALC* или его часть). Экспрессия кодирующих последовательностей Gcase и галактозилцерамидазы разделена последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

На Фиг. 24 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть), катепсин В (например, *CTSB* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Экспрессия кодирующих последовательностей Gcase

и катепсина В разделена последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

На Фиг. 25 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть), сфингомиелинфосфодиэстеразы 1 (например, *SMPD1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

На Фиг. 26 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и галактозилцерамидазу (например, *GALC* или его часть). Кодированные последовательности Gcase и галактозилцерамидазы разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

На Фиг. 27 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и катепсин В (например, *CTSB* или его часть). Экспрессия каждой из кодируемых последовательностей Gcase и катепсин В управляется отдельным промотором.

На Фиг. 28 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть), GCH1 (например, *GCH1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Кодированные последовательности Gcase и GCH1 разделены последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

На Фиг. 29 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть), RAB7L1 (например, *RAB7L1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Кодированные последовательности Gcase и RAB7L1 разделены последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

На Фиг. 30 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть), GCH1 (например, *GCH1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Экспрессия кодируемых последовательностей Gcase и GCH1 разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

На Фиг. 31 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую VPS35 (например, *VPS35* или его часть) и интерферирующие РНК для α -Syn и TMEM106B.

На Фиг. 32 представлено схематическое изображение одного варианта

осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть), IL-34 (например, *IL-34* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Кодирующие последовательности Gcase и IL-34 разделены последовательностью саморасщепляющегося пептида T2A.

На Фиг. 33 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и IL-34 (например, *IL-34* или его часть). Кодирующие последовательности Gcase и IL-34 разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

На Фиг. 34 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и TREM2 (например, *TREM2* или его часть). Экспрессия каждой из кодирующих последовательностей Gcase и TREM2 управляется отдельным промотором.

На Фиг. 35 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и IL-34 (например, *IL-34* или его часть). Экспрессия каждой из кодирующих последовательностей Gcase и IL-34 управляется отдельным промотором.

На Фиг. 36А-36В показаны типичные данные для сверхэкспрессии TREM2 и GBA1 в клетках HEK293 по сравнению с контрольными трансдуцированными клетками, измеренной с помощью qPCR и ELISA. На Фиг. 36А показаны данные для сверхэкспрессии TREM2. На Фиг. 36В показаны данные для сверхэкспрессии GBA1 из той же конструкции.

На Фиг. 37 показаны типичные данные, указывающие на успешный сайленсинг *SNCA in vitro* с помощью репортерного анализа с применением GFP (вверху) и анализа α -Syn (внизу).

На Фиг. 38 показаны типичные данные, указывающие на успешный сайленсинг *TMEM106B in vitro* с помощью репортерного анализа с применением GFP (вверху) и анализа α -Syn (внизу).

На Фиг. 39 представлено схематическое изображение одного из вариантов осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую PGRN (также обозначаемый как GRN).

На Фиг. 40 показаны данные для трансдукции клеток HEK293 с использованием

гAAV, имеющих ITR с размещением дикого типа (кружки) или альтернативным (например, «снаружи»; квадраты) размещением последовательности «D». гAAV, имеющие ITR, размещенные «снаружи», были способны трансдуктировать клетки так же эффективно, как и гAAV, имеющие ITR дикого типа.

На Фиг. 41 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть).

На Фиг. 42 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть).

На Фиг. 43 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

На Фиг. 44 представлено схематическое изображение одного из вариантов осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую PGRN (также обозначаемый как GRN).

На Фиг. 45 представлено схематическое изображение одного из вариантов осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую PGRN (также обозначаемый как GRN).

На Фиг. 46 представлено схематическое изображение одного из вариантов осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую PGRN (также обозначаемый как GRN) и интерферирующую РНК для тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (МАРТ). Последовательность нуклеиновой кислоты этого вектора изложена в SEQ ID NO: 142.

ФИГ. 47 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

На Фиг. 48 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую PSAP.

На Фиг. 49 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть).

На Фиг. 50 представлено схематическое изображение одного варианта

осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и галактозилцерамидазу (например, *GALC* или его часть).

На Фиг. 51 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть), просапозин (например, *PSAP* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

На Фиг. 52 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*.

На Фиг. 53 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую *SNCA*.

На Фиг. 54 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей Gcase.

На Фиг. 55 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую програнулин (PGRN, также обозначаемый как GRN) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей Gcase.

На Фиг. 56 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (*GBA1*) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей Gcase.

На Фиг. 57 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (*GBA1*) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей Gcase.

На Фиг. 58 представлено схематическое изображение одного варианта

осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (GBA1) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Последовательность «D» 3' ITR расположена «снаружи» вектора.

На Фиг. 59 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (GBA1), и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей Gcase.

На Фиг. 60 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (GBA1) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей Gcase.

На Фиг. 61 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (GBA1) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*.

На Фиг. 62 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (GBA1) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей Gcase.

На Фиг. 63 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (GBA1) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей Gcase.

На Фиг. 64 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (GBA1) и програнулин (PGRN, также обозначаемый как GRN) и ингибирующую РНК, нацеленную на TMEM106B. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей Gcase.

На Фиг. 65 представлено схематическое изображение одного варианта

осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую ингибирующую РНК, нацеленную на RPS25.

На Фиг. 66 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую ингибирующую РНК, нацеленную на RPS25.

На Фиг. 67 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую ингибирующую РНК, нацеленную на *MAPT*.

На Фиг. 68 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую ингибирующую РНК, нацеленную на *MAPT*.

На Фиг. 69 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую програнулин (PGRN, также обозначаемый как GRN) и ингибирующую РНК, нацеленную на *MAPT*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей PGRN (также обозначаемый как GRN).

На Фиг. 70 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую ингибирующую РНК, нацеленную на *MAPT*.

На Фиг. 71 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую програнулин (PGRN, также обозначаемый как GRN) и ингибирующую РНК, нацеленную на *MAPT*. Ингибирующая РНК расположена внутри интрона между последовательностью промотора и последовательностью, кодирующей PGRN (также обозначаемый как GRN).

На Фиг. 72 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Последовательность нуклеиновой кислоты этого вектора изложена в SEQ ID NO: 141.

На Фиг. 73 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, *GBA1* или его часть) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Последовательность нуклеиновой кислоты этого вектора изложена в SEQ ID NO: 143.

На Фиг. 74 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор на основе гAAV, который содержит конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (GBA1), просапозин (PSAP) и ингибирующую РНК, нацеленную на *SNCA*. Последовательность нуклеиновой кислоты этого вектора изложена в SEQ ID NO: 144.

На Фиг. 75A-75C представлены диаграммы, показывающие нокдаун MAPP в клетках SY5Y в результате РНК-интерференции. На Фиг. 75A показано иммунофлуоресцентное размещение векторов AAV с использованием зонда, направленного на BGNpA. На Фиг. 75B показаны результаты экспрессии MAPP с помощью RT-PCR через 3 и 7 дней после трансдукции. На Фиг. 75C показана общая информация о запасах вируса гAAV, используемого для трансдукции.

Подробное раскрытие изобретения

Настоящее раскрытие 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 соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт представляет собой белок или фрагмент белка, кодируемый геном, ассоциированным с заболеванием ЦНС. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт представляет собой интерферирующую нуклеиновую кислоту (например, shRNA, siRNA, miRNA, amiRNA и т.д.), которая ингибирует ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС.

Ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС, относится к гену, кодирующему генный продукт, который генетически, биохимически или функционально ассоциирован с заболеванием ЦНС, таким как PD. Например, было отмечено, что индивидуумы, имеющие мутации в гене *GBA1* (который кодирует белок Gcase), имели повышенный риск развития PD по сравнению с индивидуумами, которые не имеют мутации в *GBA1*. В другом примере синуклеинопатии (например, PD и т.д.) ассоциированы с накоплением белковых агрегатов, содержащих белок α -синуклеин (α -Syn); соответственно *SNCA* (который кодирует α -Syn) представляет собой ген, ассоциированный с PD. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кассета экспрессии, описанная в данном документе, кодирует форму дикого типа или немутантную форму гена, ассоциированного с заболеванием ЦНС, например гена, ассоциированного с PD (или его кодирующей

последовательности). Примеры генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС (например, генов, ассоциированных с PD, генов, ассоциированных с AD, генов, ассоциированных с FTD, и т.д.) представлены в Табл. 1.

Таблица 1: Примеры генов и генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС

Название	Ген	Функция	Номер доступа в NCBI
Белок лизосомной мембраны 2	<i>SCARB2/LIMP2</i>	лизосомный рецептор глюкозилцерамидазы (нацеливание на GBA)	NP_005497.1 (изоформа 1), NP_001191184.1 (изоформа 2)
Просапозин	<i>PSAP</i>	предшественник сапозинов A, B, C и D, которые локализуются в лизосомном компартменте 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 церамида	EAW81359.1 (изоформа CRA_a), EAW81360.1 (изоформа CRA_b), EAW81362.1 (изоформа CRA_c)
Сфингомиелинфосфодиэстер	<i>SMPD1</i>	превращает	EAW68726.1

аза 1		сфингомиелин в керамид	(изоформа CRA_a), EAW68727.1 (изоформа CRA_b), EAW68728.1 (изоформа CRA_c), EAW68729.1 (изоформа CRA_d)
Катепсин В	<i>CTSB</i>	предположительно тиолпротеаза участвует во внутриклеточном расщеплении и обмене белков; также участвует в инвазии и метастазировании опухолей	AAC37547.1, AAN95408.1, AAN10240.1
RAB7, представитель семейства белков 1, подобных онкогенам RAS	<i>RAB7L1</i>	регулирует везикулярный транспорт	AAN02585.1
Белок 35, связанный с вакуолярной сортировкой белков	<i>VPS35</i>	компонент ретромерного селективного в отношении полезной нагрузки комплекса	NP_060676.2
GTP-циклогидролаза 1	<i>GCH1</i>	отвечает за гидролиз гуанозинтрифосфата с образованием 7,8-дигидроноптеринтрифосфата	AAN25415.1
Интерлейкин 34	<i>IL-34</i>	увеличивает рост или выживаемость моноцитов; вызывает активность путем связывания рецептора колониестимулирующего фактора 1	AAN29804.1
Триггерный рецептор 2, экспрессируемый на миелоидных клетках	<i>TREM2</i>	образует рецепторный сигнальный комплекс с белком, связывающим протеинтирозинкиназу TYRO; принимает участие в иммунном ответе и может участвовать в хроническом воспалении	AAF69824.1
Програнулин	<i>PGRN</i> (также обозначаемый как <i>GRN</i>)	играет роль в развитии, воспалении, пролиферации клеток и гомеостазе белков	NP_002087.1

Альфа-синуклеин	<i>SNCA</i>	играет роль в поддержании снабжения синаптическими пузырьками в пресинаптических окончаниях путем кластеризации синаптических пузырьков и может облегчать регуляцию высвобождение дофамина	NP_001139527.1
Трансмембранный белок 106B	<i>TMEM106B</i>	играет роль в морфогенезе дендритов и регуляции лизосомального транспорта	NP_060844.2
Тау-белок, ассоциированный с микротрубочками	<i>MAPT</i>	играет роль в поддержании стабильности микротрубочек в аксонах	NP_005901.2

Выделенные нуклеиновые кислоты и векторы

Выделенная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. Используемый в данном документе термин «выделенный» означает искусственно полученный. Используемый в данном документе термин «выделенная нуклеиновая кислота» относится к нуклеиновым кислотам (i), амплифицированным *in vitro*, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР); (ii) полученным рекомбинантно путем клонирования; (iii) очищенным, например, путем расщепления и разделения с помощью геля; или (iv) синтезированным, например, путем химического синтеза. Выделенная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая легко доступна для манипуляций в результате методик рекомбинантной ДНК, хорошо известных в данной области техники.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты (например, векторы на основе gAAV), содержащие конструкцию экспрессии, кодирующую один или несколько генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС (например, гены, ассоциированные с PD), например, Gcase, просапозина, LIMP2/SCARB2, белка GBA2, GALC, белка CTSB, SMPD1, белка GCH1, белка RAB7L, белка VPS35, белка IL-34, белка TREM2 или белка TMEM106B. В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии также предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты (например, векторы на основе gAAV), кодирующие одну или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот, которые нацелены на один или

несколько генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, например, *SNCA*, *TMEM106B*, *RPS25* и *MART*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая гены, ассоциированные с заболеванием ЦНС, может дополнительно содержать кодирующие последовательности для ингибирующих нуклеиновых кислот, нацеленных на один или несколько генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гены, ассоциированные с заболеванием ЦНС, и ингибирующие нуклеиновые кислоты, нацеленные на гены, ассоциированные с заболеванием ЦНС, кодируются различными нуклеиновыми кислотами.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую Gcase (например, генный продукт гена *GBA1*). Gcase, также обозначаемая как β -глюкоцереброзидаза или GBA, относится к лизосомальному белку, который расщепляет бета-глюкозидную связь химического соединения глюкоцереброзида, посредника в метаболизме гликолипидов. У человека Gcase кодируется геном *GBA1*, расположенным в хромосоме 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления *GBA1* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_000148.2 в NCBI (SEQ ID NO: 14). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую Gcase, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека), такую как последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 15.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую просапозин (например, генный продукт гена *PSAP*). Просапозин представляет собой гликопротеин-предшественник для белков-активаторов сфинголипидов (сапозин) A, B, C и D, которые облегчают катаболизм гликосфинголипидов с короткими олигосахаридными группами. У человека ген *PSAP* расположен в хромосоме 10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления *PSAP* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_002769.1 в NCBI (например, SEQ ID NO: 16). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую просапозин, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека), такую как последовательность,

изложенную в SEQ ID NO: 17.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую LIMP2/SCARB2 (например, генный продукт гена *SCARB2*). *SCARB2* относится к мембранному белку, который регулирует лизосомный и эндосомный транспорт в клетке. У человека ген *SCARB2* расположен в хромосоме 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *SCARB2* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_005497.1 в NCBI (SEQ ID NO: 18). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 19. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *SCARB2*, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок GBA2 (например, генный продукт гена *GBA2*). Белок GBA2 относится к нелизосомальной глюкозилцерамидазе. У человека ген *GBA2* расположен в хромосоме 9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *GBA2* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_065995.1 в NCBI (SEQ ID NO: 30). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 31. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GBA2, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок GALC (например, генный продукт гена *GALC*). Белок GALC относится к галактозилцерамидазе (или галактоцереброзидазе), которая представляет собой фермент, который гидролизует связи сложных эфиров галактозы галактоцереброзида, галактозилсфингозина, лактозилцерамида и моногалактозилдиглицерида. У человека ген *GALC* расположен в хромосоме 14. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *GALC* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_000144.2 в NCBI (SEQ ID NO: 33). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 34. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GALC, которая была

кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок CTSB (например, генный продукт гена *CTSB*). Белок CTSB относится к катепсину В, который представляет собой лизосомальную цистеиновую протеазу, которая играет важную роль во внутриклеточном протеолизе. У человека ген *CTSB* расположен в хромосоме 8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *CTSB* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_001899.1 в NCBI (SEQ ID NO: 35). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 36. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую CTSB, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок SMPD1 (например, генный продукт гена *SMPD1*). Белок SMPD1 относится к сфингомиелинфосфодиэстеразе 1, которая представляет собой фермент гидролазу, участвующий в метаболизме сфинголипидов. У человека ген *SMPD1* расположен в хромосоме 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *SMPD1* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_000534.3 в NCBI (SEQ ID NO: 37). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 38. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SMPD1, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок GCH1 (например, генный продукт гена *GCH1*). Белок GCH1 относится к GTP-циклогидролазе I, которая представляет собой фермент-гидролазу, который участвует в путях биосинтеза фолата и биоптерина. У человека ген *GCH1* расположен в хромосоме 14. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *GCH1* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_000152.1 в NCBI (SEQ ID NO: 45). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 46. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GCH1, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок RAB7L (например, генный продукт гена *RAB7L*). Белок RAB7L относится к RAB7, представителю семейства белков 1, подобных онкогенам RAS, который представляет собой GTP-связывающий белок. У человека ген *RAB7L* расположен в хромосоме 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *RAB7L* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_003920.1 в NCBI (SEQ ID NO: 47). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 48. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую RAB7L, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, 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 человека ген *VPS35* расположен в хромосоме 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *VPS35* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_060676.2 в NCBI (SEQ ID NO: 49). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 50. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую VPS35, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок IL-34 (например, генный продукт гена *IL34*). Белок IL-34 относится к интерлейкину 34, который представляет собой цитокин, который повышает рост и выживаемость моноцитов. У человека ген *IL34* расположен в хромосоме 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *IL34* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_689669.2 в NCBI (SEQ ID NO: 55). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 56. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую IL-34, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок TREM2 (например, генный продукт гена *TREM2*). Белок TREM2 относится к триггерному рецептору 2, экспрессируемому на миелоидных клетках, который представляет собой рецептор суперсемейства иммуноглобулинов, обнаруженным на миелоидных клетках. У человека ген *TREM2* расположен в хромосоме 6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *TREM2* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_061838.1 в NCBI (SEQ ID NO: 57). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 58. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TREM2, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок TMEM106B (например, генный продукт гена *TMEM106B*).

Белок TMEM106B относится к трансмембранному белку 106B, который представляет собой белок, участвующий в морфогенезе дендритов и регуляции лизосомного транспорта. У человека ген *TMEM106B* расположен в хромосоме 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *TMEM106B* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_060844.2 в NCBI (SEQ ID NO: 63). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 64. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TMEM106B, которая была кодон-оптимизирована.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую белок програнулин (например, генный продукт гена *GRN*). Белок PGRN относится к програнулину, который представляет собой белок, участвующий в развитии, воспалении, пролиферации клеток и гомеостазе белка. У человека ген *PGRN* (также обозначаемый как *GRN*) расположен в хромосоме 17. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *GRN* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_002078.1 в NCBI (SEQ ID NO: 67). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 68. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую PGRN (последовательность, кодирующую GRN), которая была кодон-оптимизирована.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую первый генный продукт и второй генный продукт, при этом каждый генный продукт независимо выбран из генных продуктов или их частей, указанных в Табл. 1, или ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на ген или генный продукт, изложенный в Табл. 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт кодируется кодирующей частью (например, cDNA) встречающегося в природе гена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый геном *GBA1*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый другим геном, представленным в Табл. 1, например, геном *SCARB2/LIMP2* или геном *PSAP*. Однако квалифицированный специалист признает, что порядок экспрессии первого генного продукта (например, Gcase) и второго генного продукта (например, LIMP2 и т.д.), как правило, может быть обращен (например, LIMP2 представляет собой первый генный продукт, а Gcase представляет собой второй генный продукт). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт представляет собой фрагмент (например, часть) гена, представленного в Табл. 1. Фрагмент белка может содержать приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или приблизительно 99% белка, кодируемого генами, представленными в Табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белковый фрагмент содержит от 50% до 99,9% (например, любое значение от 50% до 99,9%) белка, кодируемого геном, указанным в Табл. 1.

Патологически такие расстройства, как болезнь Паркинсона и болезнь Гоше, ассоциированы с накоплением белковых агрегатов, состоящих в основном из белка α -синуклеина (α -Syn). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, содержат ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая снижает или предупреждает экспрессию белка α -Syn.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена

выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую одну или несколько интерферирующих нуклеиновых кислот (например, dsRNA, siRNA, miRNA, amiRNA и т.д.), которые нацелены на тау-белок, ассоциированный с микротрубочками, MAPT (например, генный продукт гена *MAPT*), который участвует в болезни Альцгеймера, и FTD-тау.

Как правило, выделенная нуклеиновая кислота, как описано в данном документе, может кодировать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более ингибирующих нуклеиновых кислот (например, dsRNA, siRNA, shRNA, miRNA, amiRNA и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует более 10 ингибирующих нуклеиновых кислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждая из одной или нескольких ингибирующих нуклеиновых кислот нацелена на отличный ген или часть гена (например, первая miRNA нацелена на первую целевую последовательность гена, а вторая miRNA нацелена на вторую целевую последовательность гена, которая отличается от первой целевой последовательности). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждая из одной или нескольких ингибирующих нуклеиновых кислот нацелена на одну и ту же целевую последовательность одного и того же гена (например, выделенная нуклеиновая кислота кодирует несколько копий одной и той же miRNA).

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей конструкцию экспрессии, кодирующую одну или несколько интерферирующих нуклеиновых кислот (например, dsRNA, siRNA, miRNA, amiRNA и т.д.), которые нацелены на белок α -синуклеин (например, генный продукт гена *SNCA*). Белок α -синуклеин относится к белку, встречающемуся в ткани головного мозга, который играет роль в поддержании снабжения синаптических везикул в пресинаптических окончаниях посредством кластеризации синаптических везикул и регуляции высвобождения дофамина. У человека ген *SNCA* расположен в хромосоме 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *SNCA* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_001139527.1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *SNCA* содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 90.

Ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на *SNCA*, может содержать область комплементарности (например, область ингибирующей нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с целевым геном, таким как *SNCA*), длина которой составляет от 6 до 50 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления

ингибирующая нуклеиновая кислота содержит область, комплементарную *SNCA*, длина которой составляет от приблизительно 6 до 30, от приблизительно 8 до 20 или от приблизительно 10 до 19 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота комплементарна по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21. , 22, 23, 24 или 25 смежным нуклеотидам последовательности *SNCA*.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую одну или несколько мешающих нуклеиновых кислот (например, dsRNA, siRNA, miRNA, amiRNA и т.д.), которые нацелены на белок TMEM106B (например, генный продукт гена *TMEM106B*). Белок TMEM106B относится к трансмембранному белку 106B, который представляет собой белок, участвующий в морфогенезе дендритов и регуляции лизосомного транспорта. У человека ген TMEM106B расположен в хромосоме 7. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *TMEM106B* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_060844.2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *TMEM106B* содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 91.

Ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на *TMEM106B*, может содержать область комплементарности (например, область ингибирующей нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с целевым геном, таким как *TMEM106B*), длина которой составляет от 6 до 50 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота содержит область, комплементарную *TMEM106B*, длина которой составляет от приблизительно 6 до 30, от приблизительно 8 до 20 или от приблизительно 10 до 19 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота комплементарна по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21. , 22, 23, 24 или 25 смежным нуклеотидам последовательности *TMEM106B*.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую одну или несколько мешающих нуклеиновых кислот (например, dsRNA, siRNA, miRNA, amiRNA и т.д.), которые нацелены на рибосомный белок s25 (RPS25) (например, генный продукт гена *RPS25*). Белок RPS25 относится к рибосомному белку, который представляет собой субъединицу рибосомы s40, белкового комплекса, участвующего в синтезе белка. У человека ген *RPS25* расположен в хромосоме 11. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления ген *RPS25* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_001019.1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *RPS25* содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 113.

Ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на *RPS25*, может содержать область комплементарности (например, область ингибирующей нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с целевым геном, таким как *RPS25*), длина которой составляет от 6 до 50 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота содержит область, комплементарную *RPS25*, длина которой составляет от приблизительно 6 до 30, от приблизительно 8 до 20 или от приблизительно 10 до 19 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота комплементарна по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 смежным нуклеотидам последовательности *RPS25*.

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую одну или несколько мешающих нуклеиновых кислот (например, dsRNA, siRNA, miRNA, amiRNA и т.д.), которые нацелены на тау-белок, ассоциированный с микротрубочками, MAPT (например, генный продукт гена *MAPT*). Белок MAPT относится к тау-белку, ассоциированному с микротрубочками, который представляет собой белок, участвующий в стабилизации микротрубочек. У человека ген *MAPT* расположен в хромосоме 17. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *MAPT* кодирует пептид, который представлен референтной последовательностью NP_005901.2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ген *MAPT* содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 114.

Ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на *MAPT*, может содержать область комплементарности (например, область ингибирующей нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с целевым геном, таким как *MAPT*), длина которой составляет от 6 до 50 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота содержит область, комплементарную *MAPT*, длина которой составляет от приблизительно 6 до 30, от приблизительно 8 до 20 или от приблизительно 10 до 19 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота комплементарна по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 смежным

нуклеотидам последовательности *MAPT*.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим один или несколько генных продуктов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более генных продуктов). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько генных продуктов представляют собой два или несколько белков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько генных продуктов представляют собой две или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько генных продуктов представляют собой один или несколько белков и одну или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот. В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая конструкцию экспрессии, кодирующую первый генный продукт и второй генный продукт, при этом каждый генный продукт независимо выбран из генных продуктов или их частей, указанных в Табл. 1, или ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на ген или генный продукт, изложенный в Табл. 1. Последовательность, кодирующая ингибирующую нуклеиновую кислоту, может быть помещена в нетранслируемую область (например, интрон, 5'UTR, 3'UTR и т.д.) вектора экспрессии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт кодируется кодирующей частью (например, cDNA) встречающегося в природе гена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый геном *GBA1*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая нацелена на ассоциированный с PD ген (например, *SNCA*) (например, гибридизуется с ним или содержит область комплементарности с ним). Квалифицированный специалист признает, что порядок экспрессии первого генного продукта (например, Gcase) и второго генного продукта (например, ингибирующей РНК, нацеленной на *SNCA*), как правило, может быть обратным (например, ингибирующая РНК представляет собой первый генный продукт, а Gcase представляет собой второй генный продукт). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт представляет собой фрагмент (например, часть) гена, представленного в Табл. 1. Фрагмент белка может содержать приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или приблизительно 99% белка, кодируемого генами, представленными в Табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белковый фрагмент содержит от

50% до 99,9% (например, любое значение от 50% до 99,9%) белка, кодируемого геном, указанным в Табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт (например, ингибирующая РНК) гибридизуется с частью целевого гена (например, комплементарен 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более смежным нуклеотидам целевого гена, например *SNCA*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии является моноцистронной (например, конструкция экспрессии кодирует один слитый белок, содержащий первого генный продукт и второй генный продукт). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция экспрессии является полицистронной (например, конструкция экспрессии кодирует два разных генных продукта, например два разных белка или фрагмента белка).

Вектор полицистронной экспрессии может содержать один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более) промоторов. Можно применять любой подходящий промотор, например, конститутивный промотор, индуцибельный промотор, эндогенный промотор, тканеспецифический промотор (например, промотор, специфичный для ЦНС) и т.д. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина кур (промотор CBA), промотор CAG (например, как описано Alexopoulou et al. (2008) *BMC Cell Biol.* 9:2; doi: 10.1186/1471-2121-9-2), промотор CD68 или промотор JeT (например, как описано Tornøe et al. (2002) *Gene* 297(1-2):21-32). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первый генный продукт, второй генный продукт или первый генный продукт и второй генный продукт. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кассета экспрессии содержит одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, включая, но не ограничиваясь ими, последовательности связывания факторов транскрипции, сайты сплайсинга интронов, сайты присоединения поли (A), энхансерные последовательности, сайты связывания репрессоров или любую комбинацию вышеперечисленного.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый генный продукт, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй генный продукт, разделены последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей внутренний сайт связывания рибосомы (IRES). Примеры сайтов IRES описаны, например, Mokrejs et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34(Database issue):D125-30. В соответствии с некоторыми вариантами 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 без ограничения T2A, P2A, E2A, F2A, BmCPV 2A и BmIFV 2A, а также пептиды, описанные Liu et al. (2017) *Sci Rep.* 7:2193. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид T2A.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота расположена в интроне конструкции экспрессии, например, в интроне выше последовательности, кодирующей первый генный продукт. Ингибирующая нуклеиновая кислота может представлять собой двухцепочечную РНК (dsRNA), siRNA, микроРНК (miRNA), искусственную miRNA (amiRNA) или аптамер РНК. Как правило, ингибирующая нуклеиновая кислота связывается (например, гибридизуется) с от приблизительно 6 до приблизительно 30 (например, любое целое число от 6 до 30 включительно) смежных нуклеотидов целевой РНК (например, mRNA). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой miRNA или amiRNA, например, miRNA, которая нацелена на *SNCA* (ген, кодирующий белок α -Syn) или *TMEM106B* (например, ген, кодирующий белок TMEM106B). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления miRNA не содержит каких-либо несовпадений с областью mRNA *SNCA*, с которой она гибридизуется (например, miRNA является «усовершенствованной»). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой shRNA (например, shRNA, нацеленную на *SNCA* или *TMEM106B*). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой искусственную miRNA (amiRNA), которая содержит каркас miR-155 и последовательность, нацеленную на *SNCA* или *TMEM106B*.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой искусственную микроРНК (amiRNA). МикроРНК (miRNA) обычно относится к небольшой некодирующей РНК, встречающейся у растений и животных и участвующей в транскрипционной и посттрансляционной регуляции экспрессии генов. MiRNA транскрибируются с помощью РНК-полимеразы с образованием структуры шпильки-петли, называемой pri-miRNA, которая впоследствии обрабатывается ферментами (например, Drosha, Pasha, сплайсосомой и т.д.) в структуру шпильки pre-miRNA, которая затем обрабатывается с помощью Dicer с образованием дуплекса miRNA/miRNA* (где * обозначает сопровождающую нить дуплекса miRNA),

одна цепь которого затем включается в РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс (RISC). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая РНК, описанная в данном документе, представляет собой miRNA, нацеленную на *SNCA* или *TMEM106B*.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на *SNCA*, содержит дуплекс miRNA/miRNA*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нить miRNA дуплекса miRNA/miRNA* содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 20-25, или состоит из нее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нить miRNA* дуплекса miRNA/miRNA* содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 20-25, или состоит из нее.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на *TMEM106B*, содержит дуплекс miRNA/miRNA*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нить miRNA* дуплекса miRNA/miRNA* содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 92 или 93. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нить miRNA* дуплекса miRNA/miRNA* содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 92 или 93.

Искусственная микроРНК (amiRNA) получается путем модификации нативной miRNA с заменой естественных нацеливающих областей pre-mRNA на нацеливающую область, представляющую интерес. Например, встречающаяся в природе экспрессируемая miRNA может использоваться в качестве каркаса или основы (например, каркаса pri-miRNA), при этом створчатая последовательность заменяется последовательностью miRNA, нацеленной на ген, представляющий интерес. Искусственный предшественник микроРНК (pre-amiRNA) обычно подвергается процессингу таким образом, что предпочтительно генерируется одна стабильная малая РНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы scAAV и scAAV, описанные в данном документе, содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую amiRNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каркас pri-miRNA amiRNA происходит из pri-miRNA, выбранной из группы, состоящей из pri-MIR-21, pri-MIR-22, pri-MIR-26a, pri-MIR-30a, pri-MIR-33, pri-MIR-122, pri-MIR-375, pri-MIR-199, pri-MIR-99, pri-MIR-194, pri-MIR-155 и pri-MIR-451. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления amiRNA содержит последовательность нуклеиновой кислоты, нацеленную на *SNCA* или *TMEM106B*, и каркас amiRNA eSIBR, например, как описано в Fowler et al. *Nucleic Acids Res.* 2016 Mar 18; 44(5): e48.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления *amiRNA*, нацеливающая на *SNCA*, содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 94-99, или состоит из нее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления *amiRNA*, нацеливающая на *TMEM106B*, содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 65-66, или состоит из нее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления *amiRNA*, нацеливающая на *RPS25*, содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: от 115 до 122. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления *amiRNA*, нацеливающая на *MART*, содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 123-138, или состоит из нее.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор на основе *gAAV*), описанные в настоящем раскрытии, содержат последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 1-13, 15, 17, 19-29, 31, 32, 34, 36, 38-44, 46, 48, 50-54, 56, 58-62, 64-66 и 68-145, или состоят из нее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор на основе *gAAV*), описанные в настоящем раскрытии, содержат последовательность, которая является комплементарной (например, комплементарной) последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO: 1-13, 15, 17, 19-29, 31, 32, 34, 36, 38-44, 46, 48, 50-54, 56, 58-62, 64-66 и 68-145, или состоят из нее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор на основе *gAAV*), описанные в настоящем раскрытии, содержат последовательность, которая представляет собой обратный комплемент последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO: 1-13, 15, 17, 19-29, 31, 32, 34, 36, 38-44, 46, 48, 50-54, 56, 58-62, 64-66 и 68-145, или состоят из нее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор на основе *gAAV*), описанные в настоящем раскрытии, содержат часть последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO: 1-13, 15, 17, 19-29, 31, 32, 34, 36, 38-44, 46, 48, 50-54, 56, 58-62, 64-66 и 68-145, или состоят из нее. Часть может содержать по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% последовательности, изложенной в любой из SEQ ID NO: 1-13, 15, 17, 19-29, 31, 32, 34, 36, 38-44, 46, 48, 50-54, 56, 58-62, 64-66 и 68-145, или состоят из нее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем раскрытии, представляет собой смысловую нить нуклеиновой кислоты (например, нить в направлении от 5' к 3') или в контексте вирусных последовательностей плюс (+) нить. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность нуклеиновой

кислоты, описанная в настоящем раскрытии, представляет собой антисмысловую нить нуклеиновой кислоты (например, нить в направлении от 3' к 5') или в контексте вирусных последовательностей минус (-) нить.

Квалифицированному специалисту будет понятно, что когда речь идет о последовательностях нуклеиновых кислот, содержащих или кодирующих ингибирующие нуклеиновые кислоты (например, dsRNA, siRNA, miRNA, amiRNA и т.д.), любой один или несколько нуклеотидов тимидина (T) или нуклеотидов уридина (U) в представленной последовательности в данном документе может быть заменен любым другим нуклеотидом, подходящим для спаривания оснований (например, посредством спаривания оснований согласно принципу Уотсона-Крика) с аденозиновым нуклеотидом. Например, T можно заменить на U, а U можно заменить на T.

Выделенная нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, может существовать сама по себе или как часть вектора. Как правило, вектор может представлять собой плазмиду, космиду, фагмиду, бактериальную искусственную хромосому (BAC) или вирусный вектор (например, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор, бакуловирусный вектор и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор представляет собой плазмиду (например, плазмиду, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV является одонитевым (например, одонитевая ДНК). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного AAV (rAAV). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор представляет собой бакуловирусный вектор (например, вектор ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV)).

Обычно вектор на основе гAAV (например, геном гAAV) содержит трансген (например, конструкцию экспрессии, содержащую одно или несколько из следующего: промотор, интрон, энхансерную последовательность, последовательность, кодирующую белок, последовательность, кодирующую ингибирующую РНК, последовательность поли-(A)-хвоста и т.д.), фланкированную двумя последовательностями инвертированного концевого повтора (ITR) AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген вектора на основе гAAV содержит выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем раскрытии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждая из двух последовательностей ITR вектора на основе гAAV представляет собой полноразмерный ITR (например, длиной примерно 145 п.о. и

содержащий функциональный сайт связывания *Rep* (RBS) и сайт концевое разрешения (trs)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна из ITR вектора на основе гAAV является усеченной (например, укороченной или неполноразмерной). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в усеченном ITR отсутствует функциональный сайт концевое разрешения (trs), и он используется для получения самокомплементарных векторов на основе AAV (векторы scAAV). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления усеченный ITR представляет собой Δ ITR, например, как описано McCarty et al. (2003) *Gene Ther.* 10(26):2112-8.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенным нуклеиновым кислотам (например, векторам на основе гAAV), содержащим ITR, имеющий одну или несколько 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 показана на Фиг. 20. Как правило, ITR дикого типа содержит область из 125 нуклеотидов, 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 длинную стеблевую область (образованную последовательностями А/А') и одноцепочечную концевую область, называемую областью «D» (Фиг. 20). Как правило, область «D» ITR расположена между стеблевой областью, образованной последовательностями А/А', и вставкой, содержащей трансген вектора на основе гAAV (например, расположенной «внутри» ITR относительно конца ITR или проксимальнее трансгенной вставки или конструкции экспрессии вектора на основе гAAV). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления область «D» содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 27. Было обнаружено, что область «D» играет важную роль в инкапсидации векторов на основе гAAV капсидными белками, например, как описано Ling et al. (2015) *J Mol Genet Med* 9(3).

Настоящее раскрытие частично основано на том, что векторы на основе гAAV, содержащие область «D», расположенную «вне» ITR (например, проксимальнее конца ITR относительно вставки трансгена или конструкции экспрессии), эффективно инкапсидируются посредством капсидных белков AAV по сравнению с векторами на основе гAAV, имеющими ITR с немодифицированными ITR (например, дикого типа). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы на основе гAAV, имеющие модифицированную последовательность «D» (например, последовательность «D» во «внешнем» положении), обладают сниженной токсичностью по сравнению с

векторами на основе гAAV, имеющими последовательности ITR дикого типа.

В соответствии с некоторыми вариантами 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 соответствии с некоторыми вариантами 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 соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированная последовательность «D» составляет от приблизительно 10% до приблизительно 99% (например, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%), идентичных последовательности «D» дикого типа (например, SEQ ID NO: 27). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления модифицированная последовательность «D» содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 26, также называемую последовательностью «S», как описано в Wang et al. (1995) *J Mol Biol* 250(5):573-80.

Выделенная нуклеиновая кислота или вектор на основе гAAV, как описано в настоящем раскрытии, может дополнительно содержать последовательность «TRY», например, как изложено в SEQ ID NO: 28, или как описано Francois, et al. 2005. Клеточный связывающий белок TATA необходим для Rep-зависимой репликации минимального аденоассоциированного вирусного элемента р5 типа 2. *J Virol*. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность TRY расположена между ITR (например, 5' ITR) и конструкцией экспрессии (например, вставкой, кодирующей трансген) выделенной нуклеиновой кислоты или вектора на основе гAAV.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к конструкциям, которые выполнены с возможностью экспрессии одного или нескольких трансгенов в миелоидных клетках (например, миелоидных клетках ЦНС, таких как микроглия) субъекта. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления конструкция (например, вектор экспрессии гена) содержит последовательность, кодирующую белок, которая функционально связана с промотором, специфичным для миелоидных клеток. Примеры промоторов, специфичных для миелоидных клеток, включают промотор CD68, промотор lysM, промотор csf1r, промотор CD11c, промотор c-fes и промотор F4/80, например, как

описано в Lin et al. *Adv Exp Med Biol.* 2010;706:149-56. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор, специфичный для миелоидных клеток, представляет собой промотор CD68 или промотор F4/80.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к бакуловирусным векторам, содержащим выделенную нуклеиновую кислоту или вектор на основе гAAV, как описано в настоящем раскрытии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бакуловирусный вектор представляет собой вектор ядерного полиэдроса *Autographa californica* (AcNPV), например, как описано Urabe et al. (2002) *Hum Gene Ther* 13(16):1935-43, и Smith et al. (2009) *Mol Ther* 17(11):1888-1896.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в данном документе. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. Например, клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего, бактериальную клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомого и т.д. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, например, клетку HEK293T. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, например, клетку *E. coli*.

rAAV

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV (гAAV), содержащим трансген, который кодирует одну или несколько выделенных нуклеиновых кислот, как описано в данном документе (например, вектор на основе гAAV, кодирующий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более генных продуктов, описанных в данном документе, и/или ингибирующих нуклеиновых кислот, нацеленных на генные продукты, описанные в данном документе). Термин «гAAV» обычно относится к вирусным частицам, содержащим вектор на основе гAAV, инкапсидированный одним или несколькими капсидными белками AAV. гAAV, описанный в настоящем раскрытии, может содержать капсидный белок, имеющий серотип, выбранный из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAV10 или их вариант. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления капсидный белок представляет собой капсидный белок AAV9 или его вариант. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариант капсидного белка AAV9 содержит мутацию в одном или нескольких положениях, соответствующих T492, Y705 и

Y731 SEQ ID NO: 147 (например, соответствует этим положениям AAV6). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько мутаций выбраны из T492V, Y705F, Y731F или их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариант капсидного белка AAV9 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 149.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV содержит капсидный белок из отличного от человека хозяина, например, капсидный белок AAV макака-резус, такой как AAVrh.10, AAVrh.39 и т.д. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, описанный в настоящем раскрытии, содержит капсидный белок, т.е. вариант капсидного белка дикого типа, такой как вариант капсидного белка, который содержит 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 происходит. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариант капсидного белка AAV представляет собой капсидный белок AAV1RX, например, как описано Albright et al. *Mol Ther.* 2018 Feb 7;26(2):510-523. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления капсидный белок представляет собой AAV1RX и содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 146 (или кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 145). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариант капсидного белка представляет собой капсидный белок TM6 AAV, например, как описано Rosario et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016; 3: 16026. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариант капсидного белка AAV6 представляет собой капсидный белок TM6 AAV и содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 148.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, описанные в настоящем раскрытии, легко распространяются через ЦНС, особенно при введении в пространство CSF или непосредственно в паренхиму головного мозга. Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, описанные в настоящем раскрытии, содержат капсидный белок, который способен проникать через гематоэнцефалический барьер (BBB). Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9 или AAVrh.10.

Процучирование гAAV описано, например, Samulski et al. (1989) *J Virol.* 63(9):3822-

8, и Wright (2009) *Hum Gene Ther.* 20(7): 698-706. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV содержит капсидный белок, который специфически или предпочтительно нацелен на миелоидные клетки, например, клетки микроглии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV трансдуцирует клетки микроглии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, как описано в настоящем раскрытии (например, содержащий рекомбинантный геном гAAV, инкапсидированный капсидными белками AAV с образованием капсидной частицы гAAV), продуцируется в системе экспрессии вектора бакуловируса (BEVS). Продуцирование гAAV с использованием BEVS описано, например, в 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 посредством любого подходящего способа (например, с применением рекомбинантных генов гер и сар). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, как раскрыто в данном документе, продуцируется в клетках HEK293 (эмбриональной почки человека).

Фармацевтические композиции

В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие выделенную нуклеиновую кислоту или гAAV, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» относится к материалу, такому как носитель или разбавитель, который не устраняет биологическую активность или свойства соединения и является относительно нетоксичным, например, материал можно вводить индивидууму, не вызывая нежелательных биологических эффектов или не взаимодействуя вредным образом с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, стабилизатор, диспергирующее средство, суспендирующее средство, разбавитель, наполнитель, загуститель, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке соединения, примененного в рамках настоящего изобретения, в организме пациента или по отношению к пациенту таким образом, что он может выполнять предполагаемую функцию.

Дополнительные ингредиенты, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, используемые в практике настоящего изобретения, известны в данной области техники и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA), которая включена в данный документ посредством ссылки.

Композиции (например, фармацевтические композиции), предусмотренные в данном документе, можно вводить любым путем, включая энтеральный (например, пероральный), парентеральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, подкожный, внутрижелудочковый, трансдермальный, интрадермальный, ректальный, интравагинальный, внутрибрюшинно, местный (в виде порошков, мазей, кремов и/или капель), слизистый, назальный, букальный, сублингвальный; путем интратрахеальной инстилляции, бронхиальной инстилляции и/или ингаляции; и/или в виде спрея для полости рта, назального спрея и/или аэрозоля. В частности, 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 средства (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или состояние субъекта (например, способен ли субъект переносить пероральное введение). В соответствии с определенными вариантами осуществления соединение или фармацевтическая композиция, описанные в данном документе, являются подходящими для местного введения в глаз субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция содержит один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) различных гAAV, каждый из которых содержит выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую отличный генный продукт (например, отличный белок или ингибирующую нуклеиновую кислоту). Различные гAAV могут содержать капсидный белок одного и того же серотипа или разных серотипов.

Способы

Аспекты настоящего раскрытия относятся к композициям для экспрессии одного или нескольких генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта, для лечения заболеваний, ассоциированных с ЦНС. Один или несколько генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, могут кодироваться одной или

несколькими выделенными нуклеиновыми кислотами или векторами на основе гAAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту вводят один вектор (например, выделенную нуклеиновую кислоту, гAAV и т.д.), кодирующий один или несколько (1, 2, 3, 4, 5 или более) генных продуктов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту вводят множество (например, 2, 3, 4, 5 или более) векторов (например, выделенные нуклеиновые кислоты, гAAV и т.д.), где каждый вектор кодирует отличный генный продукт, ассоциированный с заболеванием ЦНС.

Заболевание, ассоциированное с ЦНС, может представлять собой нейродегенеративное заболевание, синуклеинопатию, таупатию или лизосомную болезнь накопления. Примеры нейродегенеративных заболеваний и ассоциированных с ними генов представлены в Табл. 2.

«Синуклеинопатия» относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся накоплением, сверхэкспрессией или активностью альфа-синуклеина (продукта гена *SNCA*) у субъекта (например, по отношению к здоровому субъекту, например, субъекту, не страдающему синуклеинопатией). Примеры синуклеинопатий и ассоциированных с ними генов представлены в Табл. 3.

«Таупатия» относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся накоплением, сверхэкспрессией или активностью тау-белка у субъекта (например, здорового субъекта, не страдающего таупатией). Примеры таупатий и ассоциированных с ними генов представлены в Табл. 4.

«Лизосомная болезнь накопления» относится к заболеванию, характеризующемуся патологическим накоплением токсичных клеточных продуктов в лизосомах субъекта. Примеры лизосомных болезней накопления и ассоциированных с ними генов представлены в Табл. 5.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения заболевания, выбранного из болезни Паркинсона (например, болезни Паркинсона с мутацией *GBA1* (PD-*GBA*), спорадической болезни Паркинсона (sPD), болезни Гоше (например, нейронопатической болезни Гоше (nGD), болезни Гоше I типа (T1GD), болезни Гоше II типа (T2GD) и болезни Гоше III типа (T3GD)), деменции с тельцами Леви (DLB), бокового амиотрофического склероза (ALS) и болезни Ниманна-Пика типа C (NPC) с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует *GBA1*.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие

относится к способам лечения лобно-височной деменции (например, лобно-височной деменции с мутацией GRN (FTD-GRN), лобно-височной деменции с мутацией *MAPT* (FTD-tau) и лобно-височной деменции с мутацией C9ORF72 (FTD-C9orf72)), болезни Паркинсона (PD), болезни Альцгеймера (AD), нейронального цероидного липофусциноза (NCL), кортикобазальной дегенерации (CBD), болезни моторных нейронов (MND) или болезни Гоше (GD) с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует PGRN (также обозначаемый как GRN).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения синуклеинопатий (например, множественной системной атрофии (MSA), болезни Паркинсона (PD), болезни Паркинсона с мутацией GBA1 (PD-GBA), слабоумия с тельцами Леви (DLB), деменции с тельцами Леви с мутацией *GBA1* и болезнью телец Леви) с помощью введения субъекту, нуждающегося в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует генный продукт GBA1, и ингибирующей нуклеиновой кислоты, нацеленной на SNCA.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения заболевания, выбранного из болезни Паркинсона (PD), лобно-височной деменции (например, лобно-височной деменции с мутацией GRN (FTD-GRN)), лизосомных болезней накопления (LSD) или болезни Гоше (GD) с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует PSAP.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения болезни Альцгеймера (AD), болезни Насу-Хаккола (NHD), лобно-височной деменции с мутацией *MAPT* (FTD-tau) или болезни Паркинсона (PD) с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует TREM2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения болезни Альцгеймера (AD) или лобно-височной деменции (лобно-височной деменции с мутацией *MAPT* (FTD-Tau), таупатии, прогрессирующего надъядерного паралича (PSP), нейродегенеративного заболевания, болезни телец Леви

(LBD) или болезни Паркинсона с помощью введения субъекту, нуждающемуся в этом, выделенной нуклеиновой кислоты (например, вектора на основе гAAV или гAAV, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту), которая кодирует ингибирующие нуклеиновые кислоты, нацеленные на *MAPT*.

Используемые в данном документе термины «лечить» или «осуществление лечения» относятся к (a) предупреждению или отсрочке начала заболевания ЦНС; (b) снижению тяжести заболевания ЦНС; (c) уменьшению или предупреждению развития симптомов, характерных для заболевания ЦНС; (d) и/или предупреждению 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.

Настоящее раскрытие частично основано на композициях для экспрессии комбинаций генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС (например, продуктов генов, ассоциированных с PD), у субъекта, которые действуют совместно (например, синергетически) для лечения заболевания.

Соответственно, в соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения субъекта, имеющего или с подозрением на наличие заболеваний, ассоциированных с ЦНС (например, болезни Паркинсона, AD, FTD и т.д.), при этом способ включает введение субъекту композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор или гAAV), как описано в настоящем раскрытии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет один или несколько признаков или симптомов или имеет генетическую предрасположенность (например, мутацию в гене, представленную в Табл. 1) к нейродегенеративному заболеванию, представленному в Табл. 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет один или несколько признаков или симптомов или имеет генетическую предрасположенность (например, мутацию в гене, представленную в Табл. 1) к синуклеинопатии, представленной в Табл. 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет один или несколько признаков или симптомов или имеет генетическую предрасположенность (например, мутацию в гене, представленную в Табл. 1) к таупатии, представленной в Табл. 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет один или несколько признаков или

симптомов или имеет генетическую предрасположенность (например, мутацию в гене, представленную в Табл. 1) к лизосомной болезни накопления, представленной в Табл. 5.

Настоящее раскрытие частично основано на композициях для экспрессии одного или нескольких генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта, подлежащего лечению болезни Гоше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления болезнь Гоше представляет собой нейронопатическую болезнь Гоше, например болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект не имеет PD или симптомов PD.

Соответственно, в соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения субъекта, имеющего или с подозрением на наличие нейронопатической болезни Гоше, при этом способ включает введение субъекту композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор или гAAV), как описано в настоящем раскрытии.

Настоящее раскрытие частично основано на композициях для экспрессии одного или нескольких генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта, подлежащего лечению лобно-височной деменции Альцгеймера (FTD). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект не имеет болезни Альцгеймера.

Соответственно, в соответствии с некоторыми аспектами в настоящем раскрытии предусмотрен способ лечения субъекта, имеющего или с подозрением на наличие FTD, при этом способ включает введение субъекту композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор или гAAV), как описано в настоящем раскрытии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту, страдающему болезнью Альцгеймера или лобно-височной деменцией (FTD), вводят гAAV, кодирующий програнулин (PGRN, также обозначаемый GRN), или его часть.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие обеспечивает способ доставки трансгена к клеткам микроглии, при этом способ включает введение субъекту гAAV, как описано в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, кодирующий белок Gcase, для лечения болезни Гоше 2 или 3 типа или болезни Паркинсона с мутацией GBA1 вводят субъекту в виде однократной дозы, а впоследствии субъекту не вводят гAAV.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, кодирующий белок Gcase, вводят путем однократной субокципитальной инъекции в большую

цистерну. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления инъекция в большую цистерну выполняется под рентгенологическим контролем.

Субъектом обычно является млекопитающее, предпочтительно человек. В соответствии с некоторыми вариантами 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 месяца, 22 месяцев, 23 месяцев, 24 месяцев, 3 года, 4 года, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет или любой возраст между ними). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления возраст субъекта составляет от 2 до 20 лет. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления возраст субъекта составляет от 30 до 100 лет. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления возраст субъекта составляет более 55 лет.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят непосредственно в ЦНС субъекта, например, путем прямой инъекции в головной и/или спинной мозг субъекта. Примеры способов прямого введения в ЦНС включают без ограничения внутримозговую инъекцию, внутрижелудочковую инъекцию, внутрицистермальную инъекцию, интрапаренхимальную инъекцию, интратекальную инъекцию и любую комбинацию вышеперечисленного. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят субъекту путем инъекции внутрь большой цистерны (ICM). В соответствии с некоторыми вариантами 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 соответствии с некоторыми вариантами 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 CSF субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами 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 головного мозга с последующей инфузией терапевтического средства (например, композиции или gAAV, как описано в данном документе) непосредственно в головной мозг субъекта. CED

описана, например, Debinski et al. (2009) *Expert Rev Neurother.* 9(10):1519-27.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят субъекту периферически, например, путем периферической инъекции. Примеры периферической инъекции включают подкожную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутриартериальную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию или любую комбинацию вышеперечисленного. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления периферическая инъекция представляет собой внутриартериальную инъекцию, например, инъекцию в сонную артерию субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию (например, композицию, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, вектор или гAAV), как описано в настоящем раскрытии, вводят как периферически, так и непосредственно в ЦНС субъекта. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту вводят композицию путем внутриартериальной инъекции (например, инъекции в сонную артерию) и путем внутримышечной инъекции (например, внутримышечной инъекции путем CED). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления прямая инъекция в ЦНС и периферическая инъекция являются одновременными (например, происходят одновременно). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления прямая инъекция происходит до (например, от 1 минуты до 1 недели или более до) периферической инъекции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления прямая инъекция происходит после (например, от 1 минуты до 1 недели или более после) периферической инъекции.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту вводят иммунодепрессант до (например, от 1 месяца до 1 минуты до) или одновременно с композицией, как описано в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммунодепрессант представляет собой кортикостероид (например, преднизон, будесонид и т.д.), ингибитор mTOR (например, сиролимус, эверолимус и т.д.), антитело (например, адалимумаб, этанерцепт, натализумаб и т.д.) или метотрексат.

Количество композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор или гAAV), как описано в настоящем раскрытии, вводимой субъекту, будет варьироваться в зависимости от способа введения. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, как описано в данном документе, вводят субъекту с титром от приблизительно 10^9 геномных копий (GC)/кг до приблизительно 10^{14} GC/кг (например, приблизительно 10^9 GC/кг, приблизительно 10^{10} GC/кг, приблизительно 10^{11} GC/кг, приблизительно 10^{12} GC/кг, приблизительно 10^{12} GC/кг).

GC/кг или приблизительно 10^{14} GC/кг). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту вводят высокий титр (например, $> 10^{12}$ геномных копий GC/кг гAAV) путем инъекции в пространство CSF или внутримозговой инъекции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, как описано в данном документе, вводят субъекту в дозе от приблизительно 1×10^{10} векторных геномов (vg) до приблизительно 1×10^{17} vg путем внутривенной инъекции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, как описано в данном документе, вводят субъекту в дозе от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 1×10^{16} vg путем инъекции в большую цистерну.

Композиция (например, композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту или вектор или гAAV), как описано в настоящем раскрытии, может быть введена субъекту один или несколько раз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 или более) раз. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят субъекту непрерывно (например, хронически), например, с помощью инфузионного насоса.

Таблица 2: 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>
Амиотрофический боковой 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 липофунциноз)	<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, вариабельная протеаза-чувствительная прионопатия)	<i>PRNP</i>

Таблица 3: 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 4: Примеры таупатий

Заболевание	Ассоциированные гены
Болезнь Альцгеймера	<i>APP, PSEN1, PSEN2, APOE</i>
Первичная возрастная таупатия	<i>MAPT</i>
Прогрессирующий надъядерный паралич	<i>MAPT</i>
Кортикобазальная дегенерация	<i>MAPT, GRN, C9orf72, VCP, CHMP2B, TARDBP, FUS</i>
Лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17	<i>MAPT</i>
Подострый склерозирующий панэнцефалит	<i>SCN1A</i>
Болезнь Литико-Бодига	
Гангиоглиома, ганглиоцитомы	
Менингиоангиоматоз	
Постэнцефалитный паркинсонизм	
Хроническая травматическая энцефалопатия	

Таблица 5: Примеры лизосомных 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 Тэя-Сакса	<i>HEXA</i>
Метахроматическая лейкодистрофия	<i>ARSA, PSAP</i>
Болезнь Фарбера	<i>ASAHI</i>

Галактосиалидоз	<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>
Множественный дефицит сульфатазы	<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, TPP1, 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>

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Векторы на основе rAAV

Векторы AAV генерировали с применением клеток, таких как клетки HEK293, для тройной плазмидной трансфекции. Последовательности ITR фланкировали конструкцию экспрессии, содержащую промоторный/энхансерный элемент для каждого трансгена, представляющего интерес, 3' поли(А)-сигнальную последовательность и посттрансляционные сигнальные последовательности, такие как элемент WPRE.

Множественные генные продукты могли экспрессироваться одновременно, такие как *GBA1*, *LIMP2* и/или просапозин, путем слияния белковых последовательностей; или с применением пептидного линкера 2A, такого как T2A или P2A, который приводил к образованию 2 пептидных фрагментов с добавленными аминокислотами вследствие предупреждения образования пептидной связи; или с применением элемента IRES; или путем экспрессии с 2 отдельными кассетами экспрессии. Присутствие короткой интронной последовательности, которая эффективно сплайсируется перед экспрессируемым геном, могло улучшать уровни экспрессии. shRNA и другие регуляторные РНК потенциально могли быть включены в эти последовательности. Примеры конструкций экспрессии, описанных в настоящем раскрытии, изображены на Фиг. 1-8, 21-35, 39 и 41-51, и в Табл. 6 ниже.

Таблица 6

Название	Промотор 1	shRNA	CDS 1	Поли(A)-хвост 1	Бицистронный элемент	Промотор 2	CDS 2	Поли(A)-хвост 2	Длина между ITR
CMVe_CBAP_GBAl_WPRE_bGH	CBA		GBA1	WPRE-bGH					3741
LT1s_JetLong_mRNAi_aSYn_SCARB2-T2A-GBA1_bGH	JetLong	aSyn	SCARB2	bGH	T2A		GBA1		4215
LI1_JetLong_SCARB2-IRES-GBA1_bGH	JetLong		SCARB2	bGH	IRES		GBA1		4399
FP1_JetLong_GBAl_bGH_JetLong_SCARB2_SV40L	JetLong		GBA1	bGH		JetLong	SCARB2	SV40L	4464
PrevailVector_LT2s_JetLong_mRNAi_aSYn_P SAP-T2A-GBA1_bGH_4353nt	JetLong	aSyn	PSAP	bGH	T2A	-	GBA1	-	4353
PrevailVector_	JetLong	-	PSAP	Синтетич	IRES	-	GBA	-	433

LI2_JetL ong_PSAP_IR ES_GBA 1_Symtheticpo lyA_433 7nt	g			еский поли(А)- хвост			1		7
PrevailVector_ 10s_JetL ong_mRNAiaS y_GBA 2_WPRE_bG H_4308nt	JetLon g	aSy n	GBA 2	WPRE _bGH	-	-	-	-	430 8
PrevailVector_ FT4_Jet Long_GBA1_ T2A_GA LC_Syntheticp olyA_43 73nt	JetLon g	-	GBA 1	Синтетич еский поли(А)- хвост	T2A	-	GAL C	-	437 3
PrevailVector_ LT4_Jet Long_GALC_ T2A_GB A1_Syntheticp olyA_43 73nt	JetLon g	-	GAL C	Синтетич еский поли(А)- хвост	T2A	-	GBA 1	-	437 3
PrevailVector_ LT5s_Je tLong_mRNAi aSyn_C TSB- T2A- GBA1_WPRE _bGH_4 392nt	JetLon g	aSy n	CTS B	WPRE _bGH	T2A	-	GBA 1	-	439 2
PrevailVector_ FT11t_J etLong_mRNA iaSyn_ GBA1_T2S_S MPD1_S yntheticpolyA_ 4477nt	JetLon g	aSy n	GBA 1	Синтетич еский поли(А)- хвост	T2A	-	SMP D1	-	447 7
PrevailVector_ LI4_JetL ong_GALC_IR ES_GB A1_Symthetic polyA_4 820nt	JetLon g	-	GAL C	Синтетич еский поли(А)- хвост	IRES	-	GBA 1	-	482 0
PrevailVector_ FP5_Jet Long_GBA1_ bGH_Jet Long_CTSB_S	JetLon g	-	GBA 1	bGH	-	JetLon g	CTS B	SV40 L	410 8

V40l_41_08nt									
PrevailVector_ FT6s_Je tLong_mRNAia Syn_GBA1- T2A- GCH1_WPRE_ bGH_4 125nt	JetLon g	aSyn n	GBA 1	WP PRE _bGH	T2A	-	GCH 1	-	412 5
PrevailVector_ LT7s_Je tLong_mRNAi aSyn_R AB7L1-T2A- GBA1_WPRE_ _bGH_3 984nt	JetLon g	aSyn n	RAB 7L1	WP PRE _bGH	T2A	-	GBA 1	-	398 4
PrevailVector_ FI6s_Jet Long_mRNAia SYn_GBA1- IRES- GCH1_bGH_3 978nt	JetLon g	aSyn n	GBA 1	bGH	IRES	-	GCH 1	-	397 8
PrevailVector_ 9st_JetL ong_mRNAiaS yn_mR NAiTMEM10 6B_VPS 35_WPRE_bG H_4182 nt	JetLon g	aSyn n & TM EM 106 B	VPS3 5	WP PRE _bGH	-	-	-	-	418 2
PrevailVector_ FT12s_J etLong_mRN AiaSyn_ GBA1-T2A- IL34_WPRE_ bGH_410 4nt	JetLon g	aSyn n	GBA 1	WP PRE _bGH	T2A	-	IL-34	-	410 4
PrevailVector_ FI12s_Je tLong_mRNAi aSYn_GBA1- IRES- IL34_bGH_39 57nt	JetLon g	aSyn n	GBA 1	bGH	IRES	-	IL-34	-	395 7
PrevailVector_ FP8_Jet	JetLon g	-	GBA 1	bGH	-	CD68	TRE M2	SV40 L	425 3

Long_GBA1_ bGH_CD 68_TREM2_S V40l_42 53nt									
PrevailVector_ FP12_C MVe_CBA_G BA1_bG H_JetLong_IL 34_SV40 l_4503nt	CBA		GBA 1	bGH		JetLon g	IL-34	SV40 L	450 3
PrevailVector_ 0_CMV e_CBAp_mRN AiaSyn_ GBA1_WPRE _bGH_4 004nt	CBA	aSyn	GBA 1	WPRE _bGH	-	-	-	-	400 4
PrevailVector_ X1_SN CA	CMVe + CBA	-	SNC A	WPRE _bGH	-	-	-	-	-

Пример 2: Клеточные анализы вирусной трансдукции в клетки с недостаточностью GBA

Клетки с недостаточностью GBA1 получают, например, в виде фибробластов от пациентов с GD, моноцитов или клеток hES, или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, происходящих 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 Gcase, такими как CBE, также может использоваться для получения клеток с недостаточностью GBA.

С применением таких клеточных моделей, лизосомные 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 применением флуоресцентной микроскопии. Также выполняется визуализация лизосомных аномалий с помощью ICC для белковых маркеров, таких как LAMP1, LAMP2, LIMP1, LIMP2, или с применением красителей, таких как Lysotracker, или путем поглощения через эндоцитарный компартмент флуоресцентного декстрана или других маркеров. Также можно выполнять визуализацию накопления маркеров аутофагии вследствие дефектного слияния с лизосомами, например, для LC3. Вестерн-блоттинг и/или ELISA используют для количественной оценки патологического накопления этих маркеров. Кроме того,

накопление гликолипидных субстратов и продуктов GBA1 измеряют с применением стандартных подходов.

Терапевтические конечные точки (например, уменьшение патологии, ассоциированной с PD) измеряют в контексте экспрессии трансдукции векторов на основе AAV для подтверждения и количественной оценки активности и функции. Gcase можно также количественно определять с применением анализа белков в ELISA или стандартных анализов активности Gcase.

Пример 3: Анализы in vivo с использованием мутантных мышей

В данном примере описывают анализы векторов на основе AAV *in vivo* с применением мутантных мышей. Исследования *in vivo* векторов на основе AAV, как указано выше, у мутантных мышей проводили с применением анализов, описанных, например, 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.

Инtrateкальную или внутрижелудочковую доставку контроля-носителя и векторов на основе AAV (например, в дозе 2×10^{11} vg/мышь) выполняли с применением концентрированных запасов AAV, например, в объеме инъекции 5-10 мкл. Осуществляли интрапаренхиматозную конвекционную усовершенствованную доставку.

Обработку начинали либо до появления симптомов, либо после их появления. Измеряемыми конечными точками являются накопление субстрата в ЦНС и CSF, накопление фермента Gcase, определяемое посредством ELISA и активности фермента, двигательные и когнитивные конечные точки, лизосомная дисфункция и накопление мономеров α -синуклеина, протофибрилл или фибрилл.

Пример 4: Химические модели заболевания

В данном примере описывают анализы *in vivo* векторов на основе AAV с применением химически индуцированной мышинной модели болезни Гоше (например, мышинной модели CBE). Исследования этих векторов на основе AAV *in vivo* проводят на мышинной модели болезни Гоше, индуцированной химическим путем, например, как описано Vardi *et al.* (2016) *J Pathol.* 239(4):496-509.

Инtrateкальную или внутрижелудочковую доставку контроля-носителя и векторов на основе AAV (например, в дозе 2×10^{11} vg/мышь) выполняли с применением концентрированных запасов AAV, например, в объеме инъекции 5-10 мкл. Осуществляли интрапаренхиматозную конвекционную усовершенствованную доставку.

Периферическую доставку достигали путем инъекции в хвостовую вену.

Обработку начинали либо до появления симптомов, либо после их появления. Измеряемыми конечными точками являются накопление субстрата в ЦНС и CSF, накопление фермента Gcase, определяемое посредством ELISA и активности фермента, двигательные и когнитивные конечные точки, лизосомная дисфункция и накопление мономеров α -синуклеина, протофибрилл или фибрилл.

Пример 5: Клинические исследования у пациентов с PD, LBD, болезнью Гоше

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациенты, страдающие определенными формами болезни Гоше (например, GD1), имеют повышенный риск развития болезни Паркинсона (PD) или деменции с тельцами Леви (LBD). В данном примере описаны клинические исследования для оценки безопасности и эффективности rAAV, как описано в настоящем раскрытии, у пациентов, страдающих болезнью Гоше, PD и/или LBD.

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

Пример 6: Лечение периферического заболевания

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациенты, страдающие определенными формами болезни Гоше, проявляют симптомы периферической невропатии, например, как описано в Biegstraaten et al. (2010) *Brain* 133(10):2909–2919.

В данном примере описывают анализы *in vivo* векторов на основе AAV, как описано в данном документе, для лечения периферической невропатии, ассоциированной с болезнью Гоше (например, болезнью Гоше 1 типа). Вкратце, пациентам с болезнью Гоше 1 типа, у которых выявлены признаки или симптомы периферической невропатии, вводят rAAV, как описано в настоящем раскрытии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления периферические нейропатические признаки и симптомы у субъекта отслеживаются, например, посредством способов, описанных в Biegstraaten et al., после введения rAAV.

Уровни продуктов трансдуцированных генов, как описано в настоящем раскрытии, присутствующих у пациентов (например, в сыворотке крови пациента, в периферической ткани (например, ткани печени, ткани селезенки и т.д.)) анализируют, например, посредством вестерн-блоттинга, ферментативных функциональных анализов или

визуализирующих исследований.

Пример 7: Лечение форм, характерных для ЦНС

В данном примере описывают анализы гAAV *in vivo*, как описано в данном документе, для лечения форм болезни Гоше, характерных в ЦНС. Вкратце, пациентам с болезнью Гоше, идентифицированным как имеющим форму ЦНС болезни Гоше для (например, болезнь Гоше 2-го или 3-го типа), вводили гAAV, как описано в описании. Уровни продуктов трансдуцированных генов, как описано в настоящем раскрытии, присутствующих в ЦНС пациентов (например, в сыворотке крови ЦНС пациента, в спинномозговой жидкости (CSF) пациента или в ткани ЦНС пациента) исследовали, например, посредством вестерн-блоттинга, ферментативных функциональных анализов или визуализирующих исследований.

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

В данном примере описывают введение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), кодирующего *GBA1*, субъекту, страдающему болезнью Паркинсона, характеризующейся мутацией в гене *GBA1*.

Вставка вектора гAAV-GBA1 содержит промоторный элемент СВА (СВА), состоящий из четырех частей: энхансера CMV (CMVe), промотора СВА (СВАp), экзона 1 и интрона (int) для конститутивной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности (CDS) *GBA1* человека. кодирующей последовательности, оптимизированной для кодонов (CDS) человеческого *GBA1* (каштан). 3' область также содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), за которым следует поли(А)-хвостовая сигнальная последовательность гормона роста крупного рогатого скота (поли(А)-хвост bGH). Фланкирующие ITR позволяют надлежащим образом упаковывать промежуточные последовательности. Оценивали два варианта 5' ITR последовательности (Фиг. 7, вставка, нижняя последовательность); эти варианты имеют несколько нуклеотидных различий в пределах 20-нуклеотидной области «D» ITR, что, как полагают, влияло на эффективность упаковки и экспрессии. Продукт вектора гAAV-GBA1 содержал нуклеотидную последовательность домена «D», изображенную на Фиг. 7 (вставка, верхняя последовательность). Вариант вектора содержал мутантный домен «D» (обозначаемый в данном документе доменом «S», нуклеотидные изменения изображены штриховкой), выполненный аналогично в доклинических исследованиях. Каркас содержит ген, придающий устойчивость к

канамицину, а также «лишний фрагмент» для предупреждения обратной упаковки. Схема, представляющая вектор гAAV-GBA1, изображена на Фиг. 8. Вектор гAAV-GBA1 упаковывали в гAAV с применением капсидных белков серотипа AAV9.

гAAV-GBA1 вводили субъекту в виде однократной дозы путем субокципитальной инъекции под контролем рентгеноскопии в большую цистерну (внутри большой цистерны; ICM). Один из вариантов исследования режима введения дозы гAAV-GBA1 представлял собой следующее.

Однократную дозу гAAV-GBA1 вводили пациентам (N = 12) при одном из двух уровней доз (3×10^{13} vg (низкая доза); 1×10^{14} vg (высокая доза) и т.д.), которые определяли на основании результатов доклинической фармакологии и токсикологических исследований.

Первоначальные исследования проводили на химической модели мыши, включающей ежедневную доставку кондуритол-b-эпоксида (CBE), ингибитора GCase, для оценки эффективности и безопасности вектора гAAV-GBA1 и конструкции S-варианта гAAV-GBA1 (как описано далее ниже).

Кроме того, первоначальные исследования выполняли на генетической модели мышей, несущей гомозиготную мутацию *GBA1* и частично имеющую недостаточность по сапозинам (4L/PS-NA). Дополнительные исследования диапазона доз на мышах и отличных от человека приматах (NHP) проводили для дополнительной оценки безопасности и эффективности векторов.

Две незначительно различающиеся версии 5' инвертированного концевого повтора (ITR) в основном каркасе AAV тестировали с оценкой возможности производства и экспрессии трансгена (Фиг. 7). Считается, что домен «D» из 20 п.н. в 5' ITR из 145 п.н. необходим для оптимального продуцирования вирусного вектора, но также сообщалось, что мутации в домене «D» в некоторых случаях повышают экспрессию трансгена. Таким образом, в дополнение к вирусному вектору гAAV-GBA1, который несет интактный домен «D», также оценивали вторую форму вектора с мутантным доменом D (обозначаемую в данном документе доменом «S»). Как гAAV-GBA1, так и вариант экспрессировали один и тот же трансген. Хотя оба вектора продуцировали вирус, который был эффективен *in vivo*, как подробно описано ниже, для дальнейшей разработки выбирали гAAV-GBA1, который содержит домен «D» дикого типа.

Для создания модели с применением CBE недостаточности GCase, молодым мышам вводили CBE, специфический ингибитор GCase. Мышам вводили CBE путем IP инъекции ежедневно, начиная с постнатального дня 8 (P8). Три различных дозы CBE (25 мг/кг, 37,5 мг/кг, 50 мг/кг) и PBS тестировали с созданием модели, которая проявляет

поведенческий фенотип (Фиг. 9). Более высокие дозы СВЕ приводили к летальному исходу дозозависимым образом. Все мыши, обработанные 50 мг/кг СВЕ, погибали к P23, и 5 из 8 мышей, получавших 37,5 мг/кг СВЕ, погибали к P27. У мышей, обработанных 25 мг/кг СВЕ, летальность отсутствовала. В то время как мыши, которым вводили СВЕ, не демонстрировали общих двигательных нарушений в тесте открытого поля (перемещаясь на такое же расстояние и с той же скоростью, что и мыши, получавшие PBS), мыши, которым вводили СВЕ, демонстрировали недостаточность двигательной координации и баланса, как измерено посредством теста на вращающемся барабане.

Мышей, выживших до конца исследования, умерщвляли на следующий день после их последней дозы СВЕ (P27, «День 1») или через три дня после прекращения введения СВЕ (P29, «День 3»). Анализ липидов выполняли на коре головного мозга мышей, получавших 25 мг/кг СВЕ, для оценки накопления субстратов GCase в когортах как в день 1, так и в день 3. Уровни GluSph и GalSph (измеренные в совокупности в этом примере) значительно накапливались у мышей, обработанных СВЕ, по сравнению с контролями, получавшими PBS, что согласуется с недостаточностью GCase.

На основании исследования, описанного выше, выбирали дозу 25 мг/кг СВЕ, поскольку она вызывала поведенческую недостаточность, не влияя на выживаемость. Для достижения широкого распределения GBA1 в головном мозге и экспрессии трансгена во время обработки СВЕ, rAAV-GBA1 или вспомогательное вещество вводили путем интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции в постнатальный день 3 (P3) с последующей ежедневной IP обработкой СВЕ или PBS, начатой в P8 (Фиг. 10).

Мыши, получавшие СВЕ, которые получали rAAV-GBA1, продемонстрировали статистически значимо более высокие результаты в тесте на вращающемся барабане, чем мыши, которые получали вспомогательное вещество (Фиг. 11). Мыши в группе варианта лечения не отличались от мышей, получавших вспомогательное вещество, с точки зрения других поведенческих показателей, таких как общее расстояние, пройденное во время тестирования (Фиг. 11).

По завершении прижизненного исследования половину мышей умерщвляли на следующий день после последней дозы СВЕ (P36, «День 1») или после трех дней после прекращения введения СВЕ (P38, «День 3») для биохимического анализа (Фиг. 12). Используя флуорометрический анализ ферментов, проведенный в трех биологических повторностях, активность GCase оценивали в коре головного мозга. Активность GCase была повышена у мышей, которым вводили rAAV-GBA1, тогда как обработка СВЕ снижала активность GCase. Кроме того, мыши, которые получали как СВЕ, так и rAAV-

GBA1, имели уровни активности GCase, которые были аналогичны группе, обработанной PBS, что указывает на то, что доставка rAAV-GBA1 способна преодолеть ингибирование активности GCase, вызванное обработкой CBE. Липидный анализ проводили на двигательной коре головного мозга мышей для изучения уровней субстратов GluCer и GluSph. Оба липида накапливались в головном мозге мышей, получавших CBE, и обработка rAAV-GBA1 значительно снижала накопление субстрата.

Уровни липидов отрицательно коррелировали как с активностью GCase, так и с выполнением теста на вращающемся барабане во всех группах обработки. Повышенная активность GCase после введения rAAV-GBA1 была ассоциирована с уменьшением субстрата и усилением двигательной функции (Фиг. 13). Как изображено на Фиг. 14, предварительное биораспределение оценивали по присутствию векторных геномов, как измерено посредством qPCR ($c > 100$ векторными геномами на 1 мкг геномной ДНК, определенными как положительные).

Мыши, которые получали rAAV-GBA1, как с CBE, так и без него, были положительными по векторным геномам rAAV-GBA1 в коре головного мозга, что указывает на то, что доставка ICV приводила к доставке rAAV-GBA1 в кору головного мозга. Кроме того, векторные геномы обнаруживали в печени, в незначительном количестве в селезенке и не обнаруживали в сердце, почках или гонадах. По всем показателям статистически значимая разница между группами дня 1 и дня 3 отсутствовала.

В более крупном исследовании модели с применением CBE дополнительно изучали эффективные дозы rAAV-GBA1 в модели с применением CBE. С применением модели с дозой CBE 25 мг/кг вспомогательное вещество или rAAV-GBA1 доставляли путем ICV в P3, а ежедневную IP обработку PBS или CBE начинали в P8. Учитывая сходство между группами с прекращением введения CBE и без него, наблюдаемое в предыдущих исследованиях, всех мышей умерщвляли через день после последней дозы CBE (P38-40). Оценивали эффект трех различных доз rAAV-GBA1, в результате чего получали следующие пять групп по 10 мышей (5 самцов/5 самок) в каждой:

Вспомогательное вещество ICV + PBS IP

Вспомогательное вещество ICV + 25 мг/кг CBE IP

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

1,0e10 vg (6,67e10 vg/g головного мозга) rAAV-GBA1 ICV + 25 мг/кг CBE IP

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

Самая высокая доза гAAV-GBA1 устраняла связанную с обработкой CBE неспособность набрать массу тела к P37. Кроме того, эта доза приводила к статистически значимому повышению показателей в тесте на вращающемся барабане и сужающемся пучке света по сравнению с группой, обработанной вспомогательным веществом + CBE (Фиг. 15). Летальность наблюдали в нескольких группах, включая группы, обработанные как вспомогательным веществом, так и гAAV-GBA1 (вспомогательное вещество + PBS: 0; вспомогательное вещество + 25 мг/кг CBE: 1; $3,2 \times 10^9$ vg гAAV-GBA1 + 25 мг/кг CBE: 4; $1,0 \times 10^{10}$ vg гAAV-GBA1 + 25 мг/кг CBE: 0; $3,2 \times 10^{10}$ vg гAAV-GBA1 + 25 мг/кг CBE: 3).

По завершении прижизненного исследования мышей умерщвляли для биохимического анализа (Фиг. 16). Активность GCase в коре головного мозга оценивали в трех биологических повторностях посредством флуориметрического анализа. Мыши, обработанные CBE, продемонстрировали сниженную активность GCase, тогда как мыши, которые получали высокую дозу гAAV-GBA1, продемонстрировали статистически значимое повышение активности GCase по сравнению с обработкой CBE. У мышей, обработанных CBE, также наблюдали накопление GluCer и GluSph, оба из которых устраняли с помощью введения высокой дозы гAAV-GBA1.

В дополнение к созданной химической модели с применением CBE, гAAV-GBA1 также оценивали в генетической модели 4L/PS-NA, которая является гомозиготной в отношении мутации V394L GD в Gba1, а также частично имеющей недостаточность по сапозинам, которые влияют на локализацию и активность GCase. Эти мыши демонстрируют недостаточность двигательной силы, координации и равновесия, о чем свидетельствуют их результаты в тестах на движение в пучке света, вращающемся барабане и подвешивании на проволоке. Обычно продолжительность жизни этих мышей составляла менее 22 недель. В первоначальном исследовании 3 мкл вируса с максимальным титром доставляли путем ICV в P23, с конечной дозой $2,4 \times 10^{10}$ vg ($6,0 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга). При 6 мышях на группу группы обработки представляли собой следующие:

WT + вспомогательное вещество ICV

4L/PS-NA + вспомогательное вещество ICV

4L/PS-NA + $2,4 \times 10^{10}$ vg ($6,0 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) гAAV-GBA1 ICV

Двигательные характеристики оценивали с помощью теста движения в пучке света через 4 недели после доставки гAAV-GBA1. Группа мутантных мышей, которые получали гAAV-GBA1, демонстрировала тенденцию к меньшему количеству суммарных ошибок и

меньшему количеству ошибок в зависимости от скорости по сравнению с мутантными мышами, обработанными вспомогательным веществом, восстанавливая двигательную функцию до уровней, близких к WT (Фиг. 17). Поскольку двигательные фенотипы становятся более серьезными с возрастом этих мышей, их показатели по этому и другим поведенческим тестам оценивали в более поздние временные точки. По завершении прижизненного исследования у этих мышей оценивали уровни липидов, активность GCase и биораспределение.

Дополнительные более низкие дозы гAAV-GBA1 в настоящее время тестировали с применением модели с применением CBE, что соответствует 0,03х, 0,1х и 1х от предложенной высокой клинической дозы фазы 1. Каждая группа включала 10 мышей (5 самцов/5 самок) на группу:

Вспомогательное вещество ICV

Вспомогательное вещество ICV + 25 мг/кг CBE IP

3,2e8 vg (2,13e9 vg/г головного мозга) гAAV-GBA1 ICV + 25 мг/кг CBE IP

1,0e9 vg (6,67e9 vg/г головного мозга) гAAV-GBA1 ICV + 25 мг/кг CBE IP

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

Помимо двигательных фенотипов, в коре головного мозга оценивали уровни липидов и активность GCase. Также проводили курс обработок и анализы.

Для оценки данных по эффективности и безопасности начинали более крупное исследование диапазона доз. 10 мышам 4L/PS-NA (5 самцов/5 самок на группу) вводили 10 мкл гAAV-GBA1. С применением аллометрического расчета массы головного мозга дозы коррелировали с 0,15х, 1,5х, 4,4х и 14,5х от предложенной высокой клинической дозы фазы 1. 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) гAAV-GBA1 ICV

4L/PS-NA + 4,3e10 vg (1,1e11 vg/г головного мозга) гAAV-GBA1 ICV

4L/PS-NA + 1,3e11 vg (3,2e11 vg/г головного мозга) гAAV-GBA1 ICV

4L/PS-NA + 4,3e11 vg (1,1e12 vg/г головного мозга) гAAV-GBA1 ICV.

Обобщение доклинических исследований в модели с применением CBE представлено в Табл. 7 ниже.

Таблица 7: Обобщение результатов в мышинной модели с применением CBE

Исследуемый материал	Номер исследования	Когорта дозы	Поведенческие изменения			Липиды	Ферменты	BD	
			Тест на вращающуюся	Тест движения	Тест открытого			Головной	Печень
rAAV-GBA1	PRV-2018-005, варьирование дозы rAAV-GBA1 в модели с применением CBE	3,2e9 vg (2,13e10 vg/г головного мозга)	Н/зн.	Н/зн.	Н/зн.	Н/зн.	Н/зн.	+	-
		1,10e10 vg (6,67e10 vg/г головного мозга)	Т	Н/зн.	Н/зн.	Т/Зн.	Н/зн.	+	+
		2,3e10vg (2,13e11 vg/г головного мозга)	Зн.	Зн.	Н/зн.	S	S	+	+
Вариант	PRV-2018-005, варьирование дозы Вариант в модели с применением CBE	8,8e9 vg (5,9e10 vg/г головного мозга)	Зн.	Н/п.	Н/зн.	Зн.	Зн.	+	+

Следует обратить внимание, что положительное биораспределение определяется как > 100 vg/1 мкг геномной ДНК.

Сокращения: BD = биораспределение; Н/зн. = незначимо; Т = тенденция; Зн. = значимо; Н/п = не применимо; + = положительный; - = отрицательный.

Пример 9: Анализ *in vitro* векторов на основе rAAV

Конструкции rAAV тестировали *in vitro* и *in vivo*. На Фиг. 18 представлены типичные данные для экспрессии *in vitro* конструкций rAAV, кодирующих белок програнулин (PGRN, также обозначаемый как GRN). На левой панели представлена

стандартная кривая анализа програнулина (PGRN) с помощью ELISA. На нижней панели представлена кривая доза-ответ для экспрессии PGRN, измеренной с помощью анализа ELISA в клеточных лизатах клеток HEK293T, трансдуцированных гAAV. MOI = множественность заражения (векторных геномов на клетку).

Пилотное исследование выполняли для оценки *in vitro* активности векторов на основе гAAV, кодирующих просапозин (*PSAP*) и *SCARB2*, отдельно или в комбинации с *GBA1* и/или одной или несколькими ингибирующими РНК. Также тестировали одну конструкцию, кодирующую PSAP и програнулин (PGRN, также обозначаемый GRN). Исследуемые векторы включали векторы, представленные в Табл. 4. «Opt» относится к кодону последовательности нуклеиновой кислоты, оптимизированной для экспрессии в клетках млекопитающих (например, клетках человека). На Фиг. 19 представлены типичные данные, указывающие на то, что трансфекция клеток HEK293 каждой из конструкций приводила к сверхэкспрессии соответствующего генного продукта по сравнению с клетками, трансфицированными имитационным контролем.

Пилотное исследование выполняли для оценки *in vitro* активности векторов на основе гAAV, кодирующих TREM2, отдельно или в комбинации с одной или несколькими ингибирующими РНК. Исследуемые векторы включали векторы, представленные в Табл. 8. «Opt» относится к кодону последовательности нуклеиновой кислоты, оптимизированной для экспрессии в клетках млекопитающих (например, клетках человека). На Фиг. 36А-36В представлены типичные данные, указывающие на то, что трансфекция клеток HEK293 каждой из конструкций приводила к сверхэкспрессии соответствующего генного продукта по сравнению с клетками, трансфицированными имитационным контролем.

Таблица 8

ID	Промотор	Ингибирующая РНК	Промотор	Трансген
I00015	JL_intronic	<i>SNCA</i>	JetLong	Opt-PSAP_GBA1
I00039	-	-	JetLong	Opt-PSAP-GRN
I00046	-	-	CBA	Opt-PSAP
I00014	JetLong	<i>SNCA</i>	JetLong	Opt-SCARB2_GBA1

I00040			JL, CD68	opt-GBA1, TREM2
---------------	--	--	----------	--------------------

Пример 10: Тестирование клеток HEK293 с конструкциями shRNA SNCA и TMEM106B

В этом исследовании использовали 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).

Трансфекция плазмидами

Трансфекцию плазмидами проводили с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (№ 11668019, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки HEK293 (№ 12022001, Sigma-Aldrich) высевали в культуральной среде без антибиотиков с плотностью 3×10^5 клеток/мл. На следующий день плазмиду и реагент Lipofectamine 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 визуализирующему анализу. Для визуализирующего анализа перед посевом клеток планшеты предварительно покрывали 0,01% раствором поли-L-лизина (P8920, Sigma-Aldrich).

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

Относительные уровни экспрессии генов определяли посредством количественной ПЦР 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, посеянные на 48-луночные планшеты ($7,5 \times 10^4$ клеток/лунка), с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 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 cDNA в соответствии с инструкциями производителя. Для количественного анализа ПЦР 2~5 мкл продуктов cDNA амплифицировали в двух повторах с использованием пар специфичных для генов праймеров (конечная концентрация 250 нМ)

с помощью Power SYBR Green PCR Master Mix (№ 4367659, Thermo Fisher Scientific). Последовательности праймеров для генов *SNCA*, *TMEM106B* и *GAPDH* представляли собой: 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 ПЦР проводили в системе ПЦР в реальном времени QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific). Уровни экспрессии нормализовывали с помощью гена домашнего хозяйства *GAPDH* и рассчитывали с применением сравнительного метода CT.

Анализ флуоресцентной визуализации

Репортерные плазмиды с EGFP, которые содержат 3'-UTR гена *SNCA* человека ниже кодирующей области EGFP, использовали для проверки плазмид для нокдауна *SNCA* и *TMEM106B*. Репортерные плазмиды с EGFP и кандидатные плазмиды для нокдауна одновременно трансфицировали в клетки HEK293, помещенные на покрытые поли-L-лизином 96-луночные планшеты ($3,0 \times 10^4$ клеток/луночка) с использованием реагента для трансфекции липофектамина 2000 (0,04 мкг репортерной плазмиды, 0,06 мкг плазмиды для нокдауна и 0,3 мкл реагента в 10 мкл раствора Opti-MEM). Через 72 часа интенсивности флуоресценции сигнала EGFP измеряли при длине волны возбуждения 488 нм/испускания 512 нм с использованием многорежимного 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 КТ. После промывки D-PBS интенсивность флуоресценции сигнала 7-AAD измеряли при длине волны возбуждения 546 нм/испускании 647 нм с использованием ридера Varioskan для количественного определения количества клеток. Нормализованный сигнал EGFP на уровне сигнала 7-AAD сравнивали с контрольными образцами нокдауна.

Иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA)

Репортерные плазмиды с α -синуклеином, которые содержат 3'-UTR гена человека *SNCA* или гена *TMEM106B* ниже кодирующей области *SNCA*, использовали для проверки плазмид для нокдауна на уровне белка. Уровни белка α -синуклеина определяли посредством ELISA (№ KHB0061, Thermo Fisher Scientific) с использованием лизатов,

экстрагированных из клеток HEK293. Плазмиды-кандидаты временно трансфицировали в клетки HEK293, посеянные на 48-луночные планшеты ($7,5 \times 10^4$ клеток/луночка), с использованием реагента для трансфекции липофектамина 2000 (0,1 мкг репортерной плазмиды, 0,15 мкг плазмиды для нокдауна 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°C в течение 15 мин. и собирали супернатант. Количественно определяли уровни белка. Планшеты считывали на планшет-ридере Varioskan при 450 нм, и концентрации рассчитывали с применением программного обеспечения SoftMax Pro 5. Измеренные концентрации белка нормализовали к концентрации общего белка, определенной посредством анализа с бичинхониновой кислотой (№ 23225, Thermo Fisher Scientific).

На Фиг. 37 и в Табл. 9 представлены типичные данные, указывающие на успешный сайленсинг *SNCA in vitro* с помощью репортерного анализа с применением GFP (вверху) и анализа α -Syn (внизу). На Фиг. 38 и в Табл. 10 представлены типичные данные, указывающие на успешный сайленсинг *TMEM106B in vitro* с помощью репортерного анализа с применением GFP (вверху) и анализа α -Syn (внизу).

Таблица 9

ID	Промотор	Нокдаун	Промотор	Сверхэкспрессия
I00007	CMV_intronic	SNCA_mi	CMV	opt-GBA1
I00008	H1	SNCA_sh	CMV	opt-GBA1
I00009	H1	SNCA_Pubsh4	CMV	opt-GBA1
I00014	JL_intronic	SNCA_mi	JetLong	opt-SCARB2_GBA
I00015	JL_intronic	SNCA_mi	JetLong	opt-PSAP_GBA
I00016	JL_intronic	SNCA_mi	JetLong	opt-CTSB_GBA
I00019	JL_intronic	SNCA_TMEM_mi	JetLong	opt-VPS35
I00023	JL_intronic	SNCA_mi	JetLong	opt-GBA1_IL34

I00024	JL_intronic	SNCA_mi	JetLong	opt-GBA2
I00028	intronic	SNCA_Broadsh	CMV	opt-GBA1
I00029	intronic	SNCA_Pubsh4	CMV	opt-GBA1

Таблица 10

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

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

Исследовали влияние размещения последовательности «D» ITR на клеточную трансдукцию векторов на основе гAAV. Клетки HEK293 трансдуцировали гAAV, кодирующими Gcase, 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 изображено на Фиг. 20. Данные указывают на то, что гAAV, имеющие последовательность «D», расположенную во «внешнем» положении, сохраняют способность эффективно упаковываться и трансдуцировать клетки (Фиг. 40).

Пример 12: Тестирование rAAV с програнулином in vitro

На Фиг. 39 представлено схематическое изображение одного из вариантов осуществления вектора, содержащего конструкцию экспрессии, кодирующую PGRN (также обозначаемый как GRN). Програнулин сверхэкспрессируется в ЦНС грызунов с недостаточностью GRN, либо гетерозиготных, либо гомозиготных по делеции GRN, путем инъекции вектора гAAV, кодирующего PGRN (например, кодон-оптимизированного PGRN, также обозначаемого кодон-оптимизированным GRN), либо путем интрапаренхимальной, либо путем интратекальной инъекции, например, в большую цистерну.

Мышам вводили инъекции в возрасте 2 или 6 месяцев и в возрасте до 6 или 12

месяцев и анализировали в отношении одного или нескольких из следующего: уровня экспрессии GRN на уровне РНК и белка, поведенческих анализов (например, улучшение движения), анализов выживаемости (например, улучшение выживаемости), микроглии и маркеров воспаления, глиоза, потери нейронов, липофусциноза и/или восстановления накопления маркеров лизосом, таких как LAMP1. Анализы в отношении мышей с недостаточностью GRN описаны, например, 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 rAAV с MAPT in vitro

Клетки SY5Y высевали по 4×10^4 клеток на лунку в 96-луночный планшет. На следующий день клетки трансдуцировали двумя исходными вирусами (консервативный вектор Intronic_eSIBR_MAPT_MiR615), кодирующими ингибирующую РНК, нацеленную на MAPT (J00130, продуцируемый в системе на основе клеток млекопитающих, и J00122, продуцируемый в системе на основе бакуловируса; изображено на Фиг. 75С) в трех повторах при MOI 2×10^5 в среде, содержащей 1 мкМ Hoechst. В качестве отрицательного контроля использовали только наполнитель. Клетки собирали через 72 часа и окрашивали зондом для обнаружения векторов на основе AAV, экспрессирующих ингибирующую РНК для MAPT. Зонд был нацелен на BGNpA. На Фиг. 75А представлено, что оба вируса успешно трансдуцировали клетки SY5Y.

Клетки SY5Y высевали по 4×10^4 клеток на лунку в 96-луночный планшет. На следующий день клетки трансдуцировали двумя исходными вирусами ((Intronic_eSIBR_MAPT_MiR615 консервативный вектор), кодирующими ингибирующую РНК, нацеленную на MAPT (J00130 и J00122; изображено на Фиг. 75С) в трех повторах при MOI 2×10^6 в среде, содержащей 1 мкМ Hoechst. В качестве отрицательного контроля использовали только наполнитель. Клетки SY5Y лизировали для выделения РНК через 72 часа или 7 дней после трансдукции. cDNA получали из экстрагированной РНК с использованием набора Invitrogen Power SYBR Green Cells-to-Ct. qRT-PCR проводили на образцах cDNA и проводили в трех повторах с использованием праймеров как для MAPT человека, так и для GAPDH человека. На Фиг. 75В представлены данные для нокдауна экспрессии MAPT с помощью J00130 и J00122.

Настоящая заявка заявляет включает посредством ссылки содержание следующих документов в полном объеме: международной заявки РСТ РСТ/US2018/054225, поданной 3 октября 2018 г.; международной заявки РСТ РСТ/US2018/054223, поданной 3 октября 2018 г.; предварительной заявки с серийными номерами 62/567296, поданной 3 октября 2017 г., под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ»; 62/567311, поданной 3 октября 2017 г. под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ»; 62/567319, поданной 3 октября 2017 г. под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ»; 62/567301, поданной 3 октября 2018 г. под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ»; 62/567310, поданной 3 октября 2017 г. под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ»; 62/567303, поданной 3 октября 2017 г. под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ»; и 62/567305, поданной 3 октября 2017 г. под названием «ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ».

Таким образом, при описании нескольких аспектов по меньшей мере одного варианта осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники следует понимать, что будут легко осуществляться различные изменения, модификации и усовершенствования. Предполагается, что такие изменения, модификации и усовершенствования являются частью данного раскрытия и находятся в пределах сути и объема настоящего изобретения. Соответственно, вышеизложенное описание и чертежи представлены лишь в целях примера.

Несмотря на то, что несколько вариантов осуществления настоящего изобретения были описаны и проиллюстрированы в настоящем документе, специалисты в данной области техники легко предусмотрят множество средств и/или структур для осуществления функций и/или получения результатов и/или одного или нескольких преимуществ, описываемых в данном документе, и каждое из таких вариаций и/или модификаций предусмотрено в объеме настоящего изобретения. В более общем плане специалисты в данной области техники легко примут во внимание, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описываемые в данном документе, являются иллюстративными, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или вариантов применения, для которых используются идеи настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе, или с помощью проведения обычных экспериментов они будут способны установить такие эквиваленты. Таким

образом, следует понимать, что вышеизложенные варианты осуществления представлены лишь в качестве примера и что в объеме прилагаемой формулы изобретения и эквивалентов к ней настоящее изобретение может применяться на практике иначе, чем так, как конкретным образом описано и представлено в формуле изобретения. Настоящее изобретение направлено на каждое отдельное свойство, систему, изделие, материал и/или способ, описываемые в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация из двух или более таких свойств, систем, изделий, материалов и/или способов в случае, если такие свойства, системы, изделия, материалы и/или способы не являются взаимно противоречащими, включена в объем настоящего изобретения.

Формы единственного числа, как используется в данном документе в описании и в формуле изобретения, если отчетливо не указано противоположное, необходимо понимать как означающие «по меньшей мере одно».

Фразу «и/или», используемая в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как обозначающую «любое из двух или оба вместе» из элементов таким образом сочетанных, например, элементов, которые совместно присутствуют в некоторых случаях и раздельно присутствуют в других случаях. Могут необязательно присутствовать другие элементы, отличные от элементов, специфическим образом определяемых условием «и/или», связанных или несвязанных с этими элементами, специфическим образом определяемых, если явно не указано противоположное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера отсылка на «А и/или В при использовании в связи с открытой формулировкой, такой как «содержащий», может относиться в соответствии с одним вариантом осуществления к А без В (при этом необязательно включаются элементы, отличные от В); в соответствии с другим вариантом осуществления к В без А (при этом необязательно включаются элементы, отличные от А); в соответствии с еще одним вариантом осуществления как к А, так и к В (при этом необязательно включаются другие элементы); и т.д.

Как используется в настоящем описании и в формуле изобретения термин «или» необходимо понимать как имеющий тоже самое значение, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении пунктов в перечне фраза «или» или «и/или» будет пониматься как включающая, т.е., включение по меньшей мере одного, но также включающая более одного, ряда или перечня из элементов, и необязательно дополнительных непредставленных пунктов. Только термины, явно указывающие на противоположное, такие как «только одно из» или «точно одно из» при использовании в формуле изобретения, «состоящий из» будет относиться к включению точно одного

элемента из ряда или перечня элементов. Как правило, термин «или», используемый в данном документе, будет истолковываться только как указывающий на исключающие альтернативы (т.е., «одно или другое, но не оба») в случае, если ему предшествуют термины исключительности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «точно один из». Термин «состоящий по сути из» при использовании в формуле изобретения, будет иметь свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемую в данном документе в описании и в формуле изобретения фразу «по меньшей мере» по отношению к перечню из одного или нескольких элементов необходимо понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но необязательно включающую по меньшей мере одно из каждого и всякого элемента, особым образом представленного в перечне элементов, и не исключающую любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает возможность того, что могут необязательно присутствовать элементы, отличные от элементов, особым образом определяемых в перечне элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», вне зависимости от того связаны или не связаны они с этими элементами, особым образом определяемыми. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере одно из А и В» (или, что является эквивалентным «по меньшей мере одно из А или В», или, что является эквивалентным «по меньшей мере одно из А и/или В») может относиться в соответствии с одним вариантом осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, при этом В не присутствует (и необязательно включающему элементы, отличные от В); в соответствии с другим вариантом осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В, при этом А не присутствует (и необязательно включающему элементы, отличные от А); в соответствии с еще одним вариантом осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, и по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В (и необязательно включающему другие элементы); и т.д.

В формуле изобретения, а также в описании выше, все переходные фразы, такие как «содержащий», «включающий», «несущий», «имеющий», «содержащий в себе», «включающий в себя», «удерживающий» и т.п. следует понимать как открытые, т.е., они означают включение, но не ограничение. Только переходные фразы «состоящий из» и «состоящий по сути из» будут закрытыми или полужакрытыми переходными фразами соответственно, как изложено в Руководстве по проведению патентной экспертизы

Патентного ведомства США, раздел 2111.03.

Применение порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и др. в формуле изобретения в целях модификации элемента само по себе не имеет подразумевает какой-либо приоритет, первоочередность или порядок одного элемента формулы изобретения по отношению к другому или временной порядок, в котором события способа выполняются, а используются лишь в качестве меток в целях разграничения одного элемента формулы изобретения, имеющего определенное название, от другого элемента, имеющего то же самое название (но для использования порядкового термина), с разграничением элементов формулы изобретения.

Следует также понимать, что, если отчетливо не указано иное, в любых способах, заявляемых в данном документе, которые предусматривают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничен порядком, при котором стадии или действия способа упомянуты.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кассета экспрессии, кодирующая один или несколько генных продуктов (например, первый, второй и/или третий генный продукт), содержит последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 1-149, или состоит из него (или кодирует его). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления генный продукт гена кодируется частью (например, фрагментом) любой из SEQ ID NO: 1-149.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание центральной нервной системы (ЦНС) или с подозрением на него, при этом способ включает введение субъекту выделенной нуклеиновой кислоты, содержащей:

(i) конструкцию экспрессии, содержащей трансген, кодирующий один или несколько генных продуктов, представленных в Табл. 1, и/или одну или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот, нацеленных на один или несколько генных продуктов, представленных в Табл. 1; и

(ii) два инвертированных концевых повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), фланкирующие конструкцию экспрессии.

2. Способ по п. 1, где трансген кодирует один или несколько белков, выбранных из: GBA1, GBA2, PGRN, TREM2, PSAP, SCARB2, GALC, SMPD1, CTSB, RAB7L, VPS35, GCH1 и IL34.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где трансген, кодирующий один или несколько генных продуктов, содержит кодон-оптимизированную кодирующую последовательность белка.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где трансген кодирует одну или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот, нацеленных на *SNCA*, *MAPT*, *RPS25* и/или *TMEM106B*.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где ITR AAV представляют собой ITR AAV2.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где выделенная нуклеиновая кислота упакована в рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV).

7. Способ по п. 6, где rAAV содержит капсидный белок AAV9.

8. Способ по любому из пп. 1-6, где субъектом является млекопитающее, при этом субъектом необязательно является человек.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где заболевание ЦНС представляет собой нейродегенеративное заболевание, синуклеинопатию, таупатию и/или лизосомную болезнь накопления (LSD).

10. Способ по п. 9, где заболевание ЦНС представлено в Табл. 2, Табл. 3, Табл. 4 или Табл. 5.

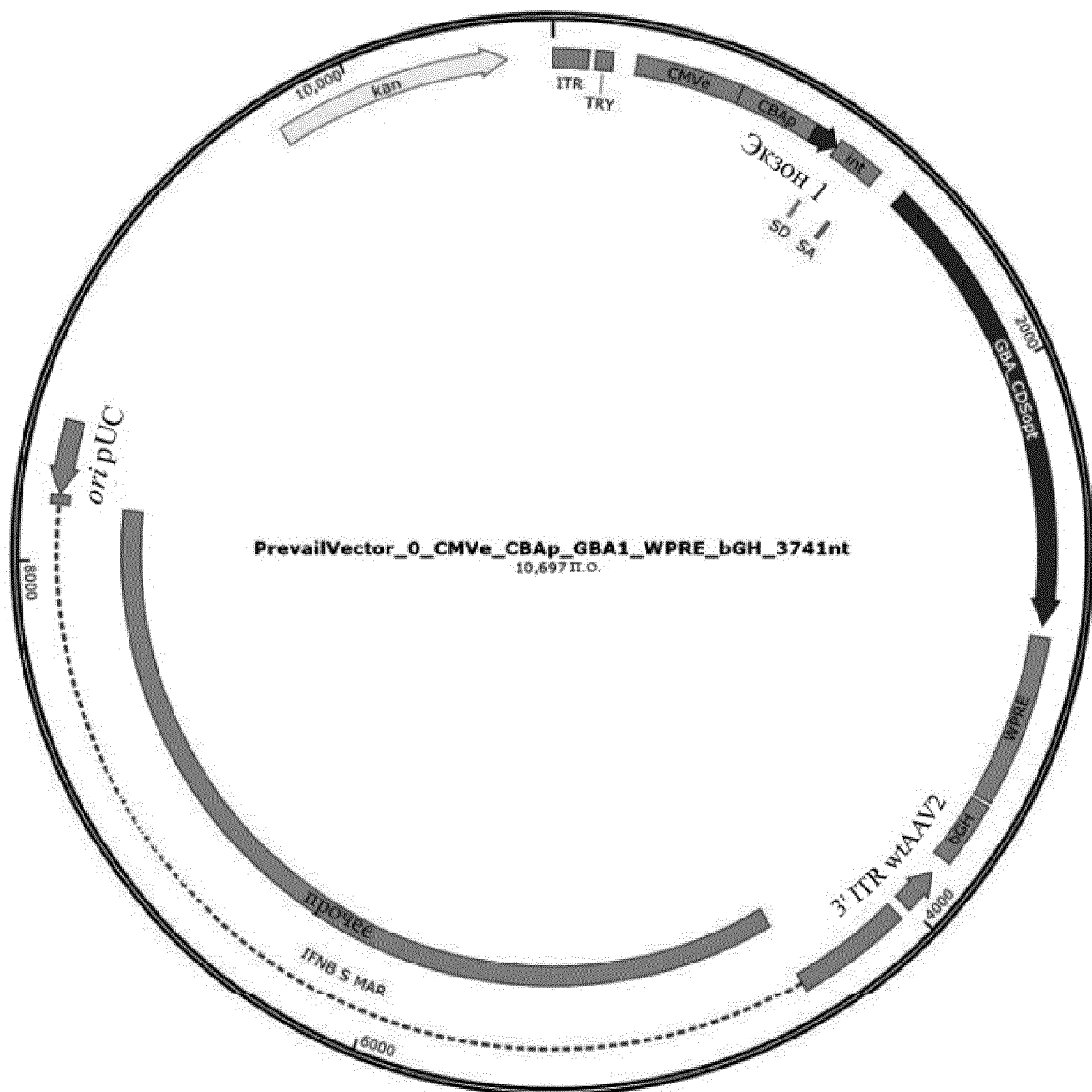
11. Способ по любому из пп. 1-10, где введение включает прямую инъекцию в ЦНС субъекта, необязательно при этом прямая инъекция представляет собой интрацеребральную инъекцию, интрапаренхимальную инъекцию, интратекальную инъекцию, инъекцию в большую цистерну или любую их комбинацию.

12. Способ по п. 11, где инъекция в большую цистерну представляет собой субокципитальную инъекцию в большую цистерну.

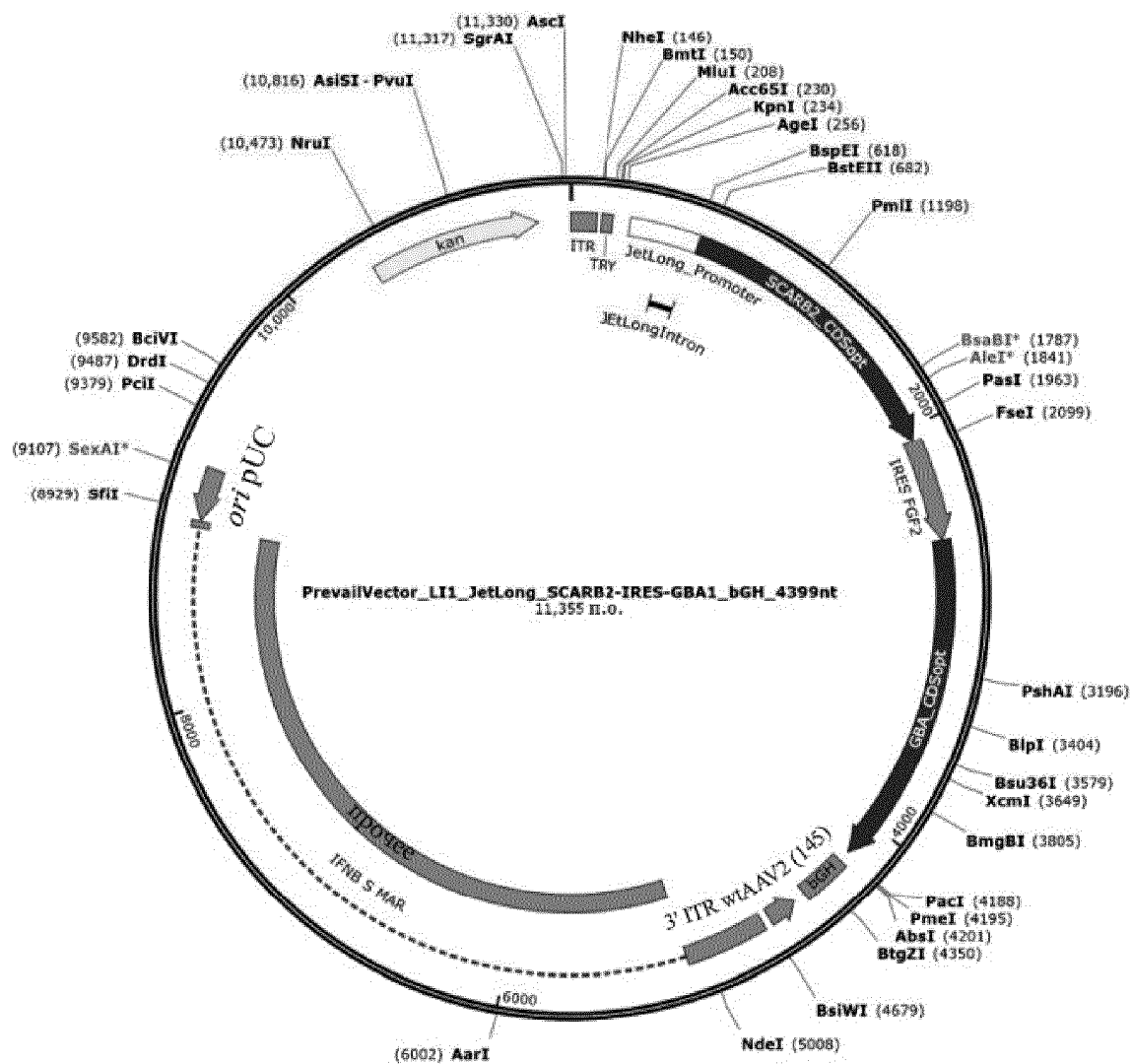
13. Способ по п. 11 или п. 12, где прямая инъекция в ЦНС субъекта включает конвекционную усовершенствованную доставку (CED).

14. Способ по любому из пп. 1-13, где введение включает периферическую инъекцию, при этом необязательно периферическая инъекция представляет собой внутривенную инъекцию.

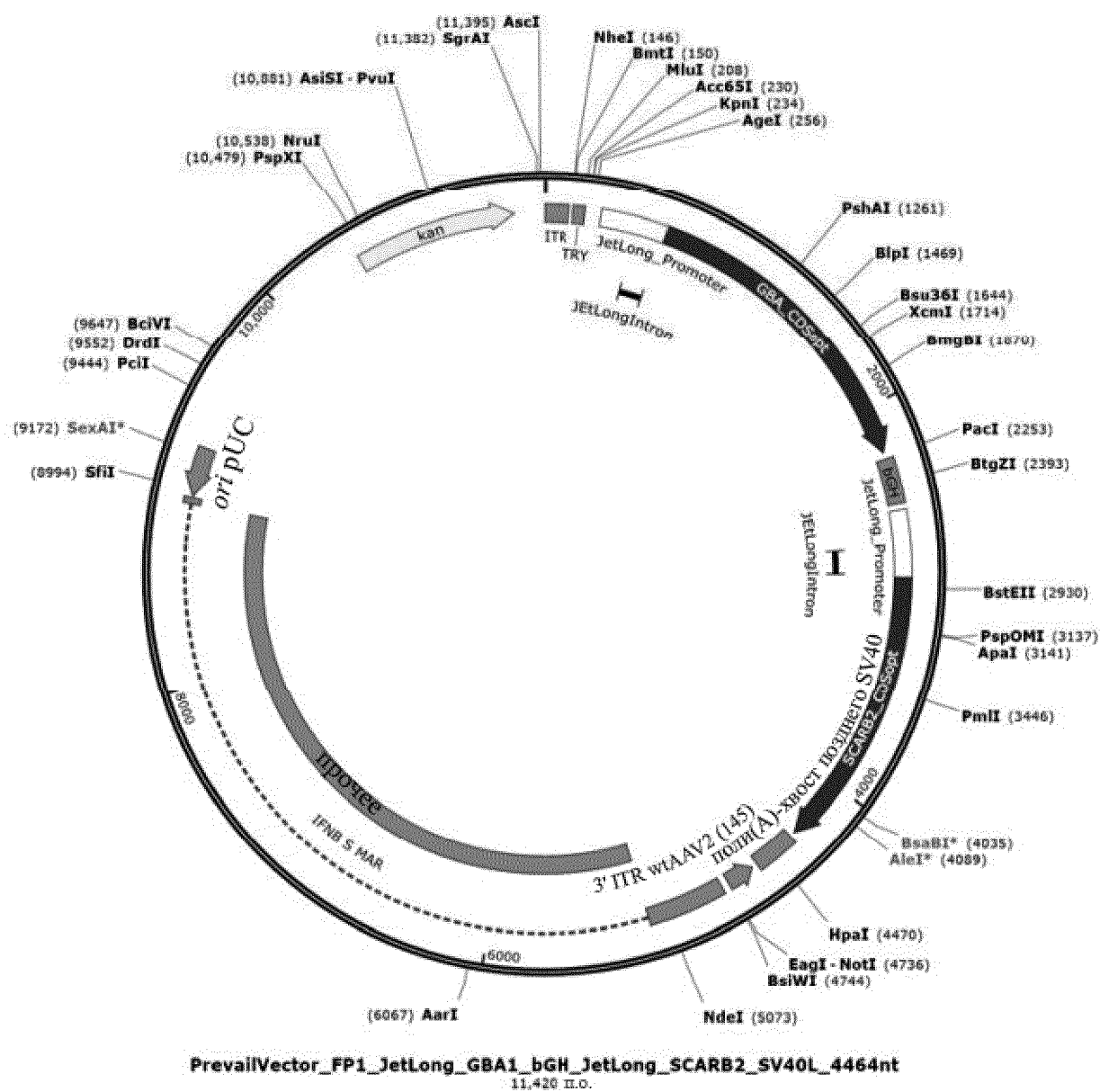
15. Способ по любому из пп. 6-14, где субъекту вводят от приблизительно 1×10^{10} vg до приблизительно 1×10^{16} vg rAAV.



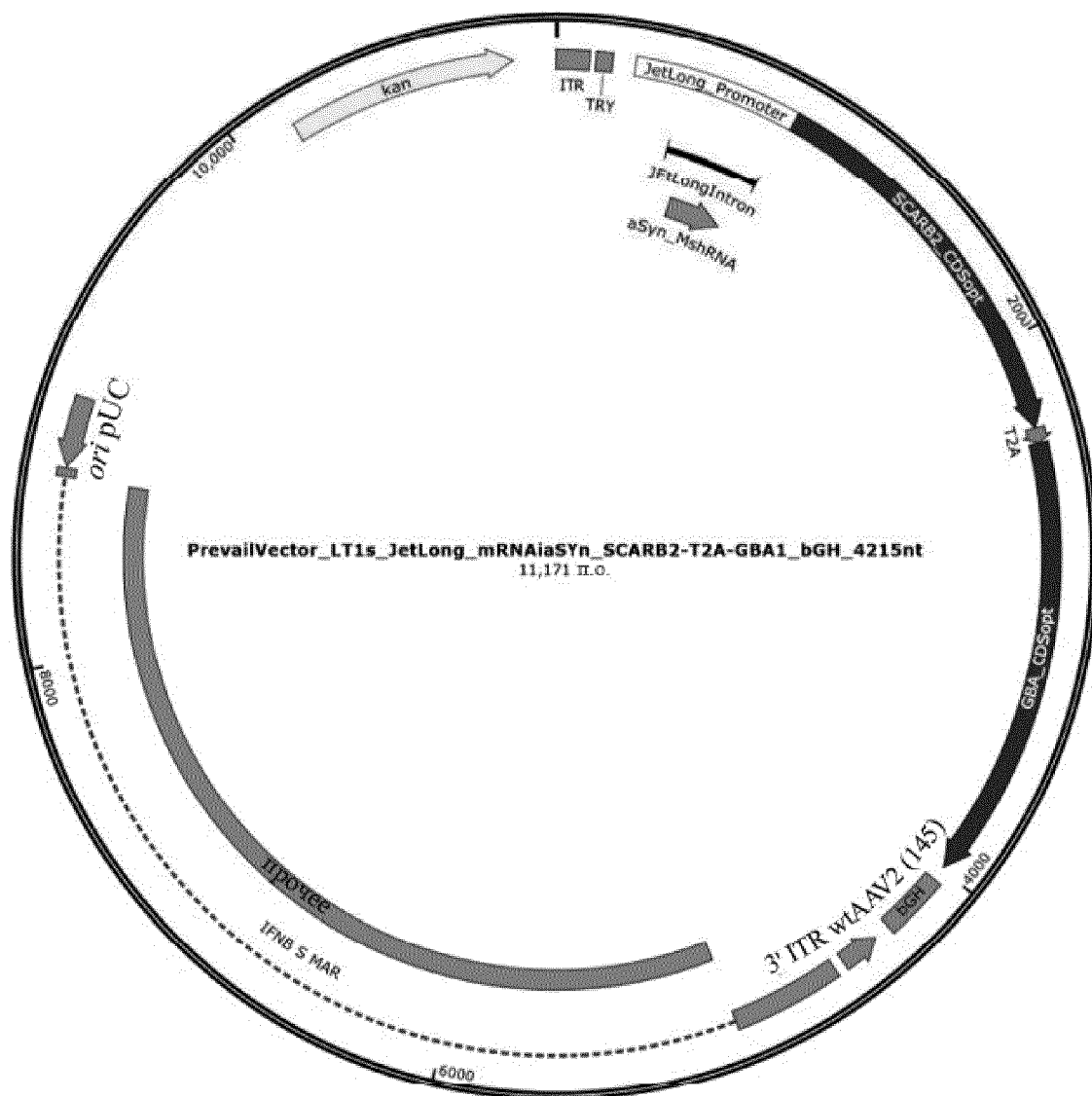
Фиг. 1



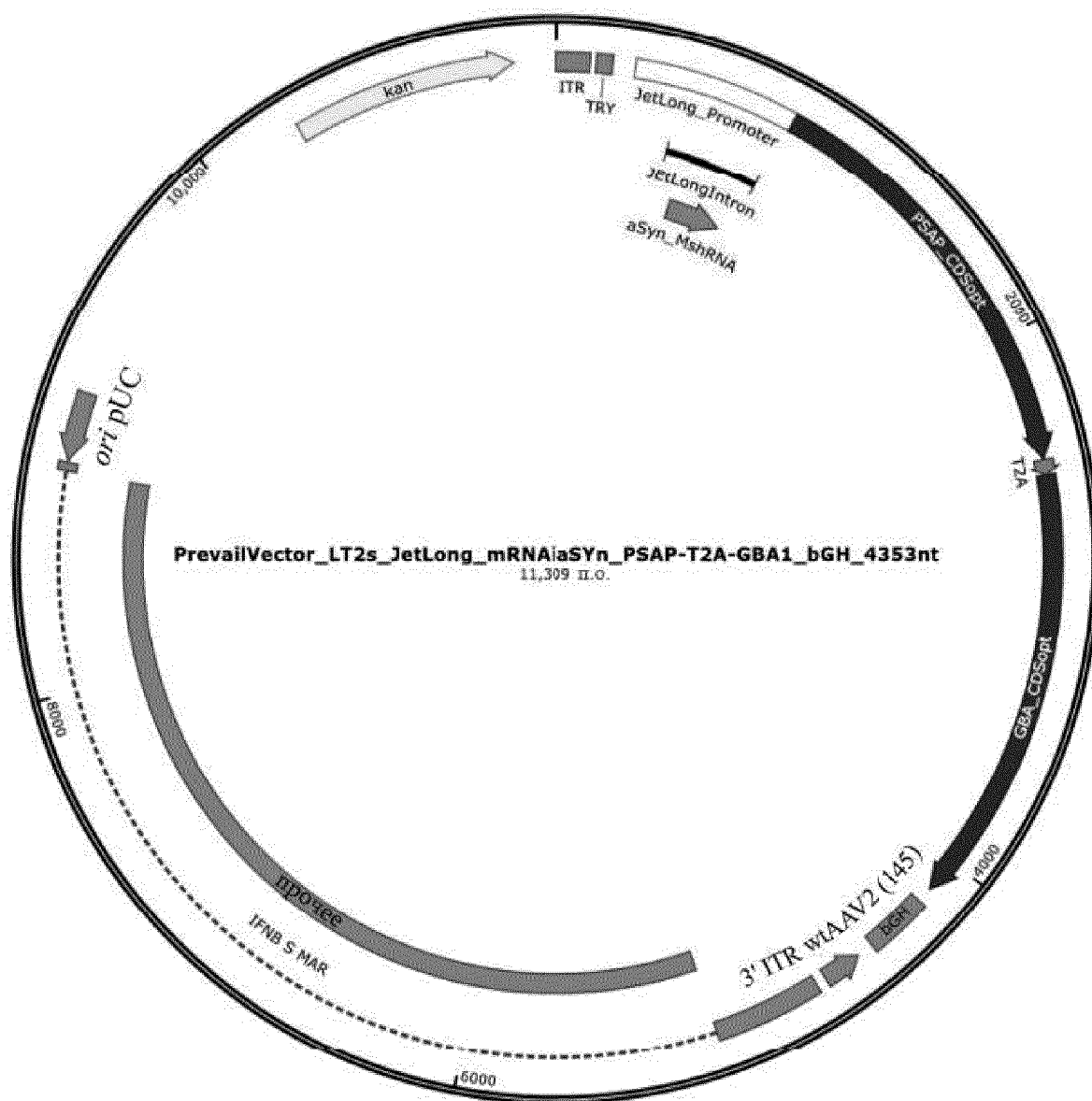
Фиг. 2



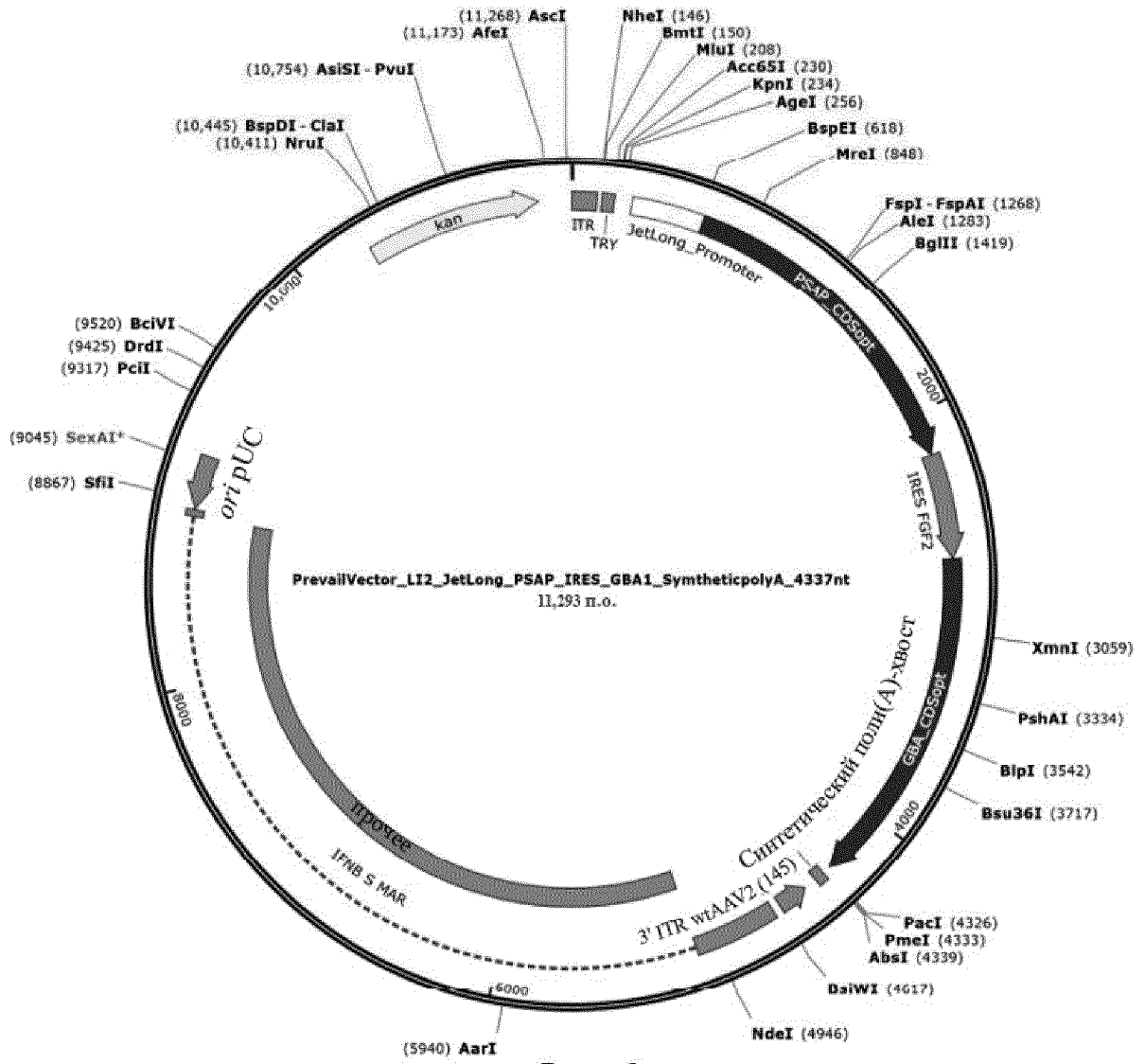
Фиг. 3



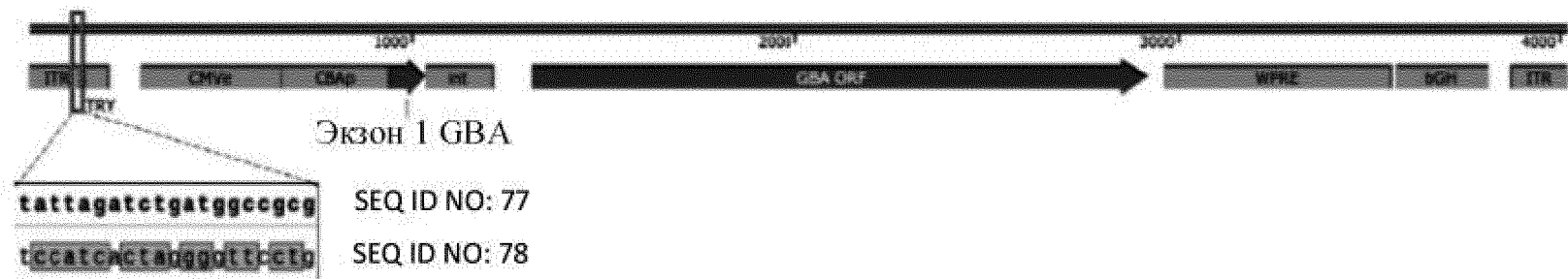
Фиг. 4



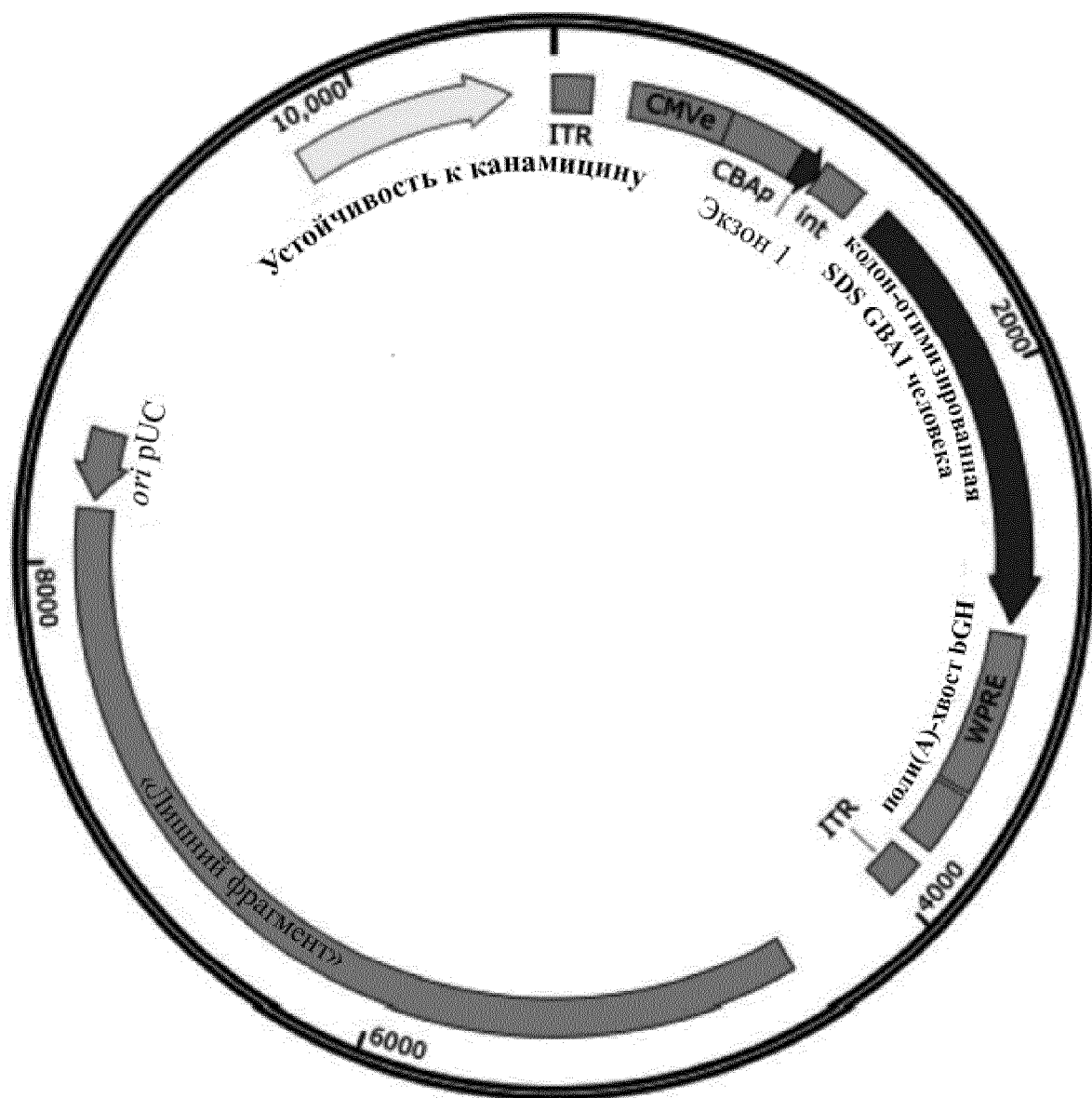
Фиг. 5



Фиг. 6

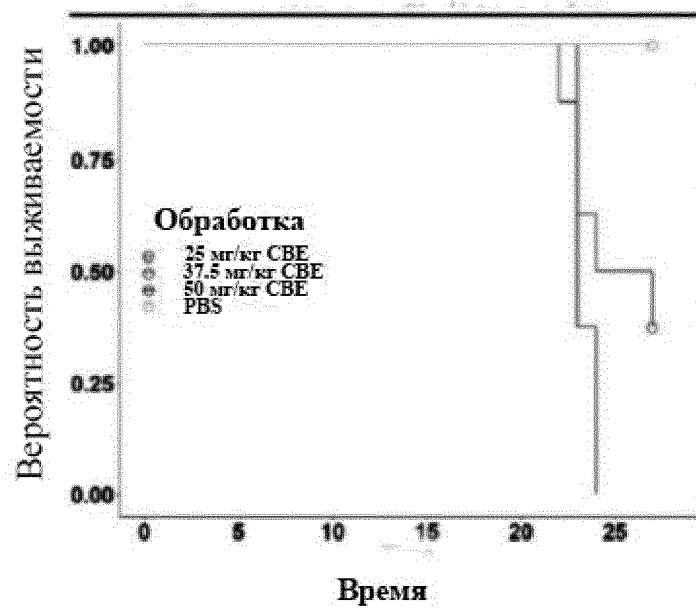


Фиг. 7

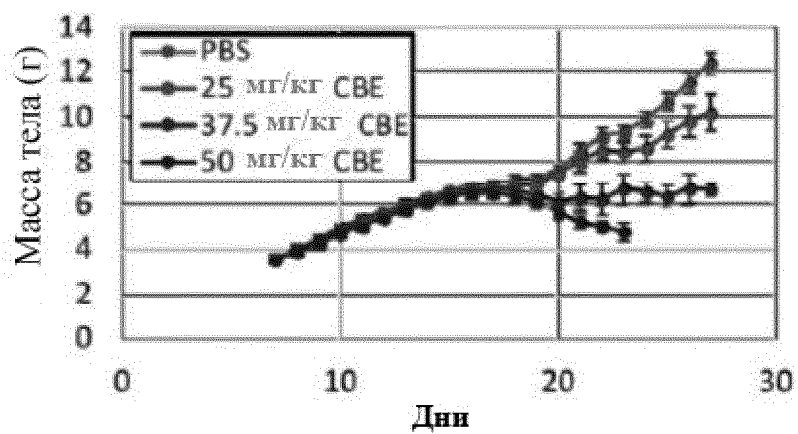


Фиг. 8

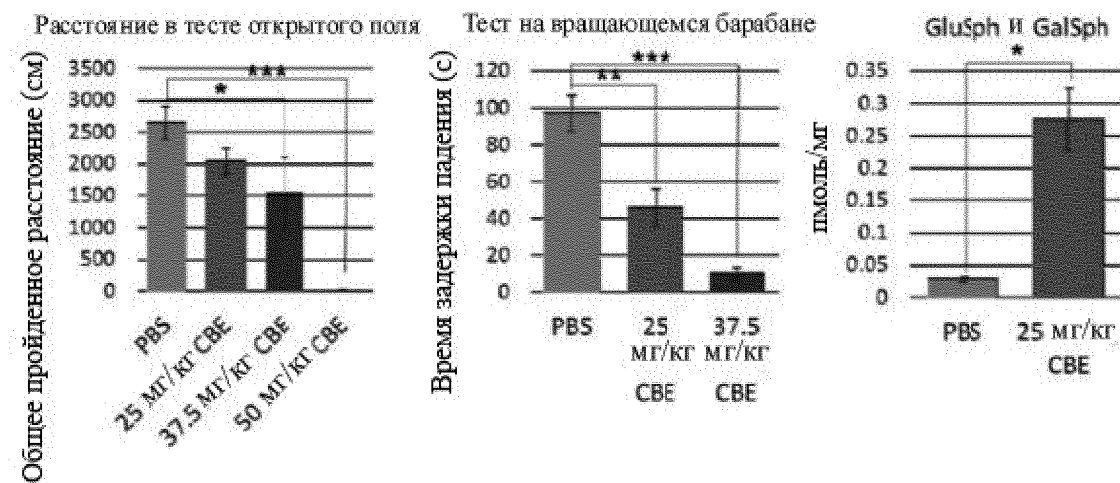
Кривая выживаемости Каплана-Мейера



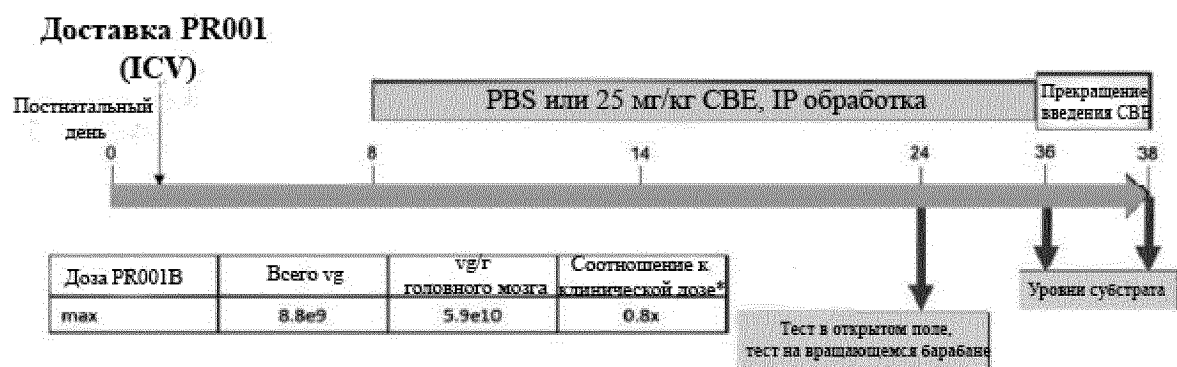
Динамика изменения массы тела



Фиг. 9

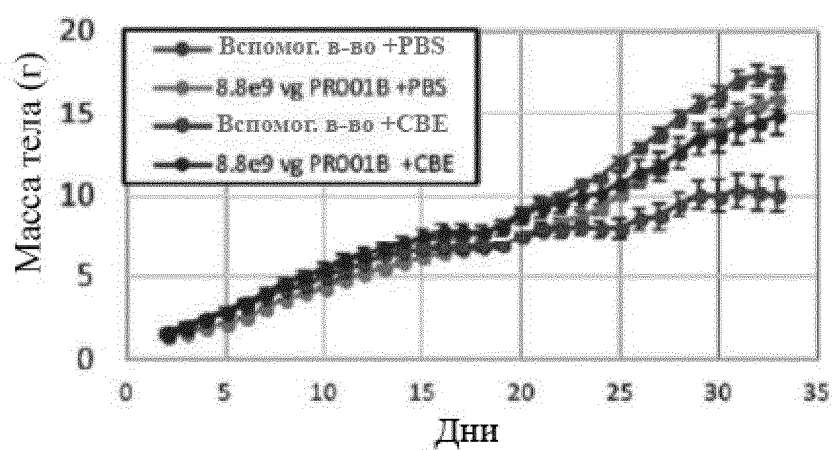


Фиг. 9 (продолжение)

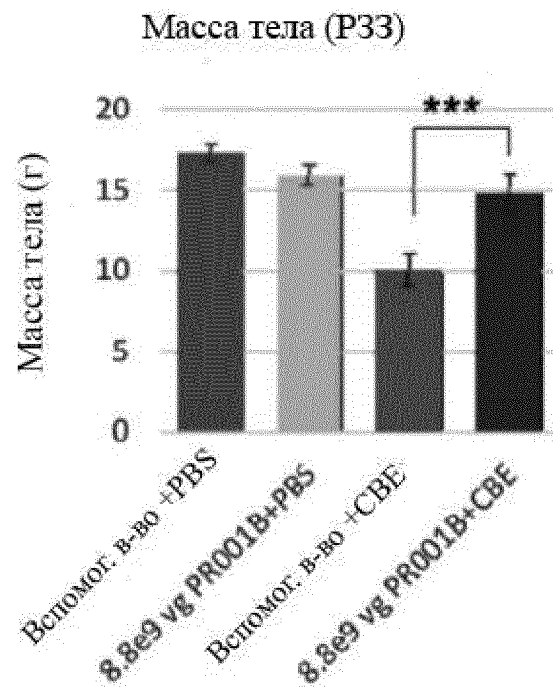


Фиг. 10

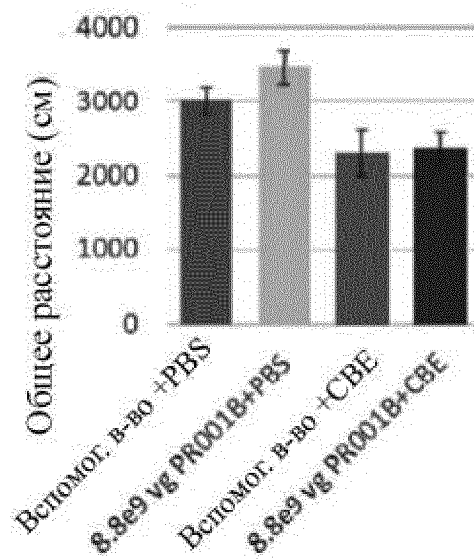
Динамика изменения массы тела



Фиг. 11

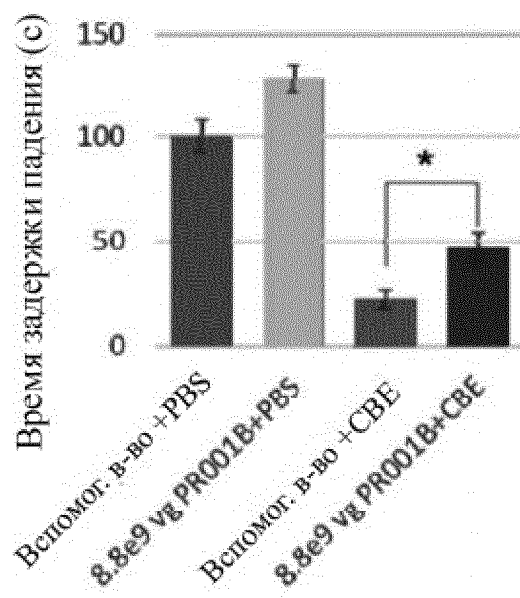


Расстояние в тесте открытого поля



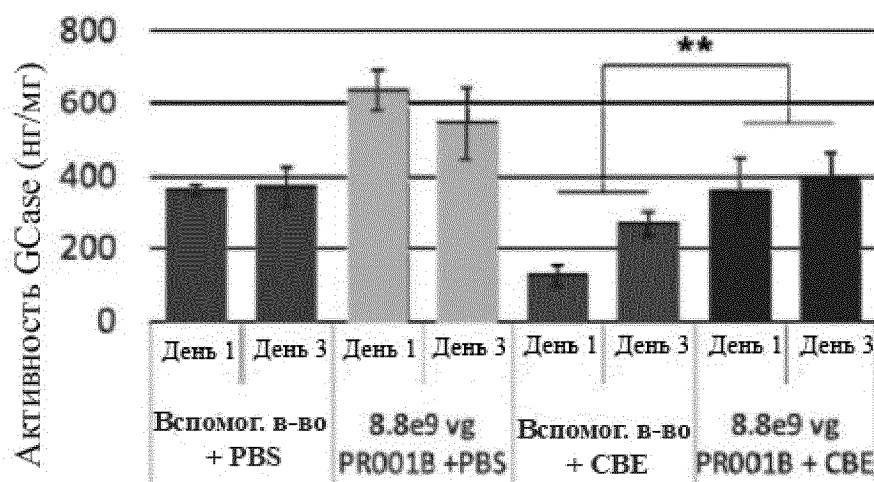
Фиг. 11 (продолжение)

Тест на вращающемся барабане

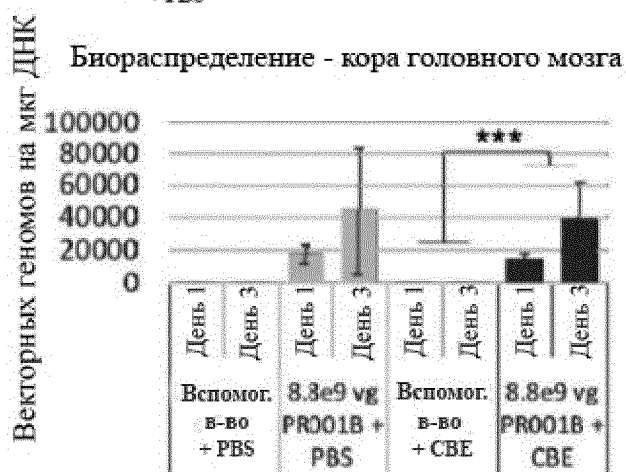
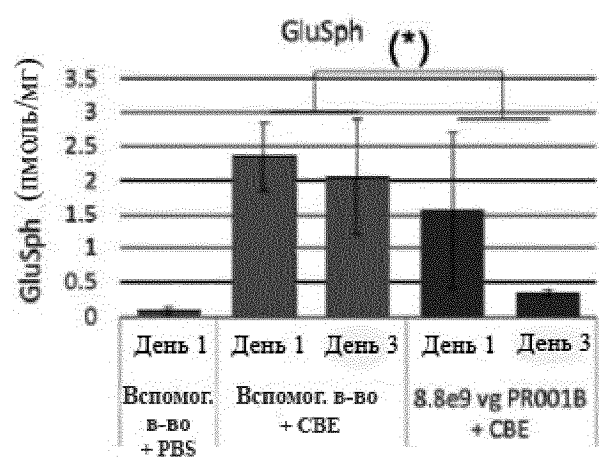
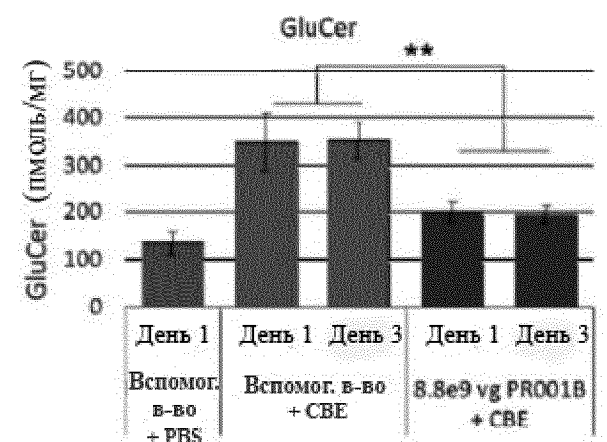


Фиг. 11 (продолжение)

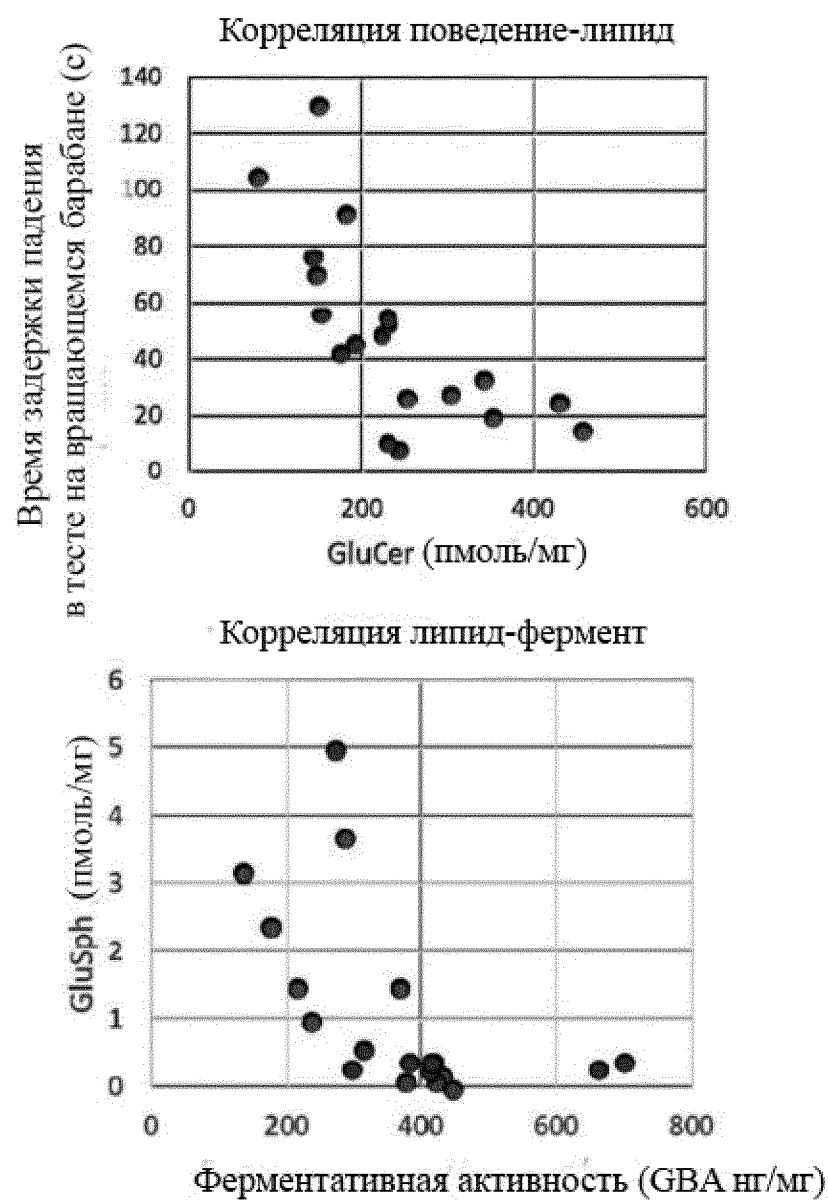
Ферментативная активность



Фиг. 12

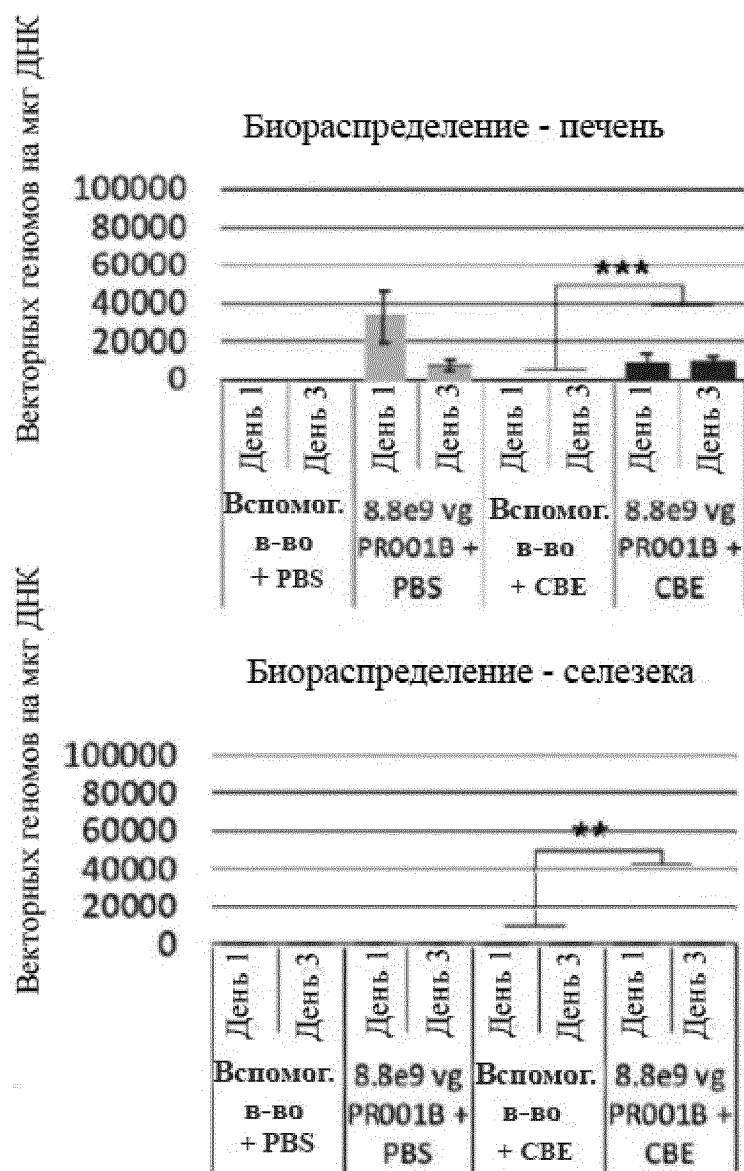


Фиг. 12 (продолжение)

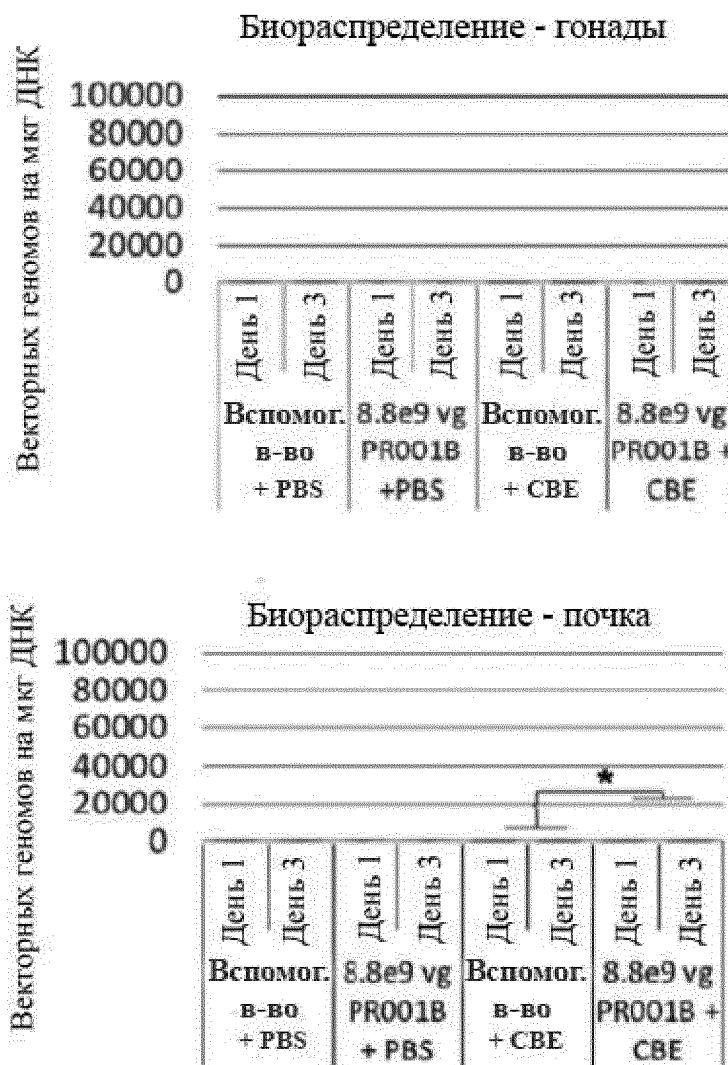


● Вспомог. в-во + PBS ● Вспомог. в-во + СВЕ ● 8.8e9 vg PR001B + СВЕ

Фиг. 13

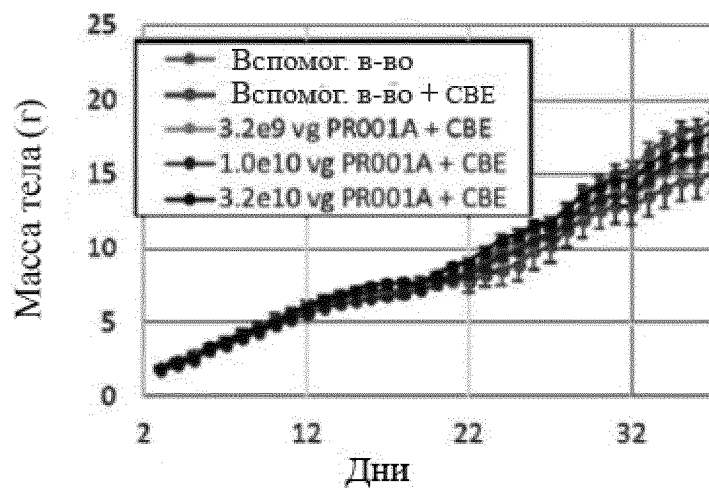


Фиг. 14

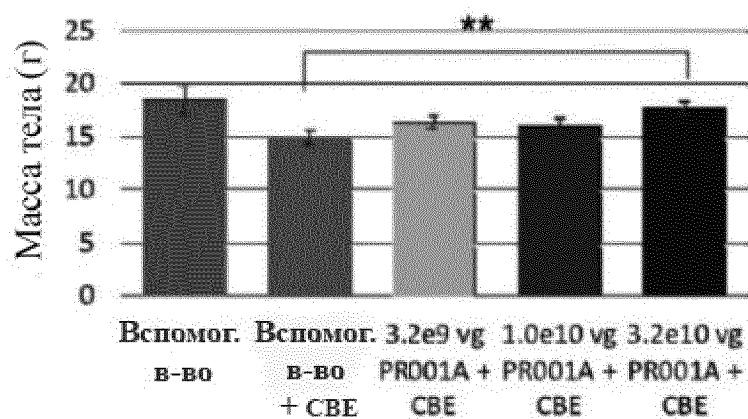


Фиг. 14 (продолжение)

Динамика изменения массы тела

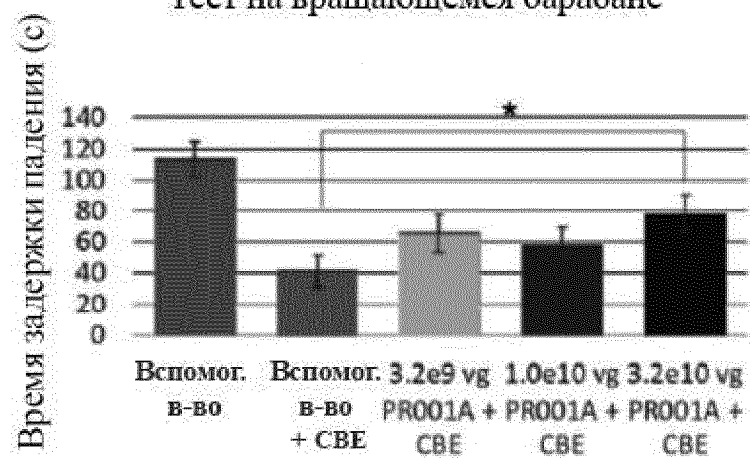


Масса тела (P37)

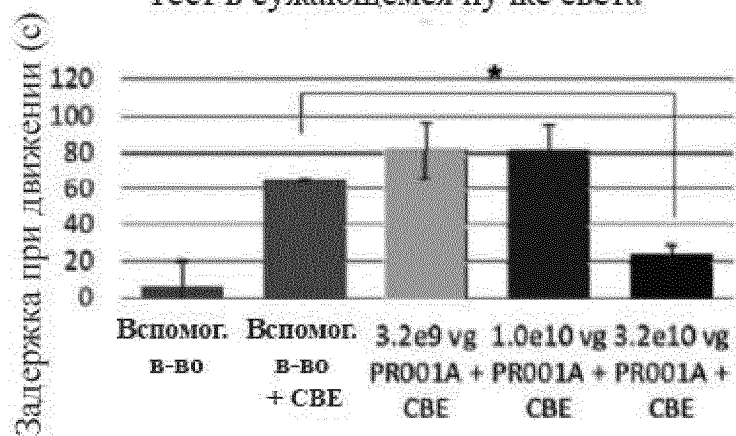


Фиг. 15

Тест на вращающемся барабане

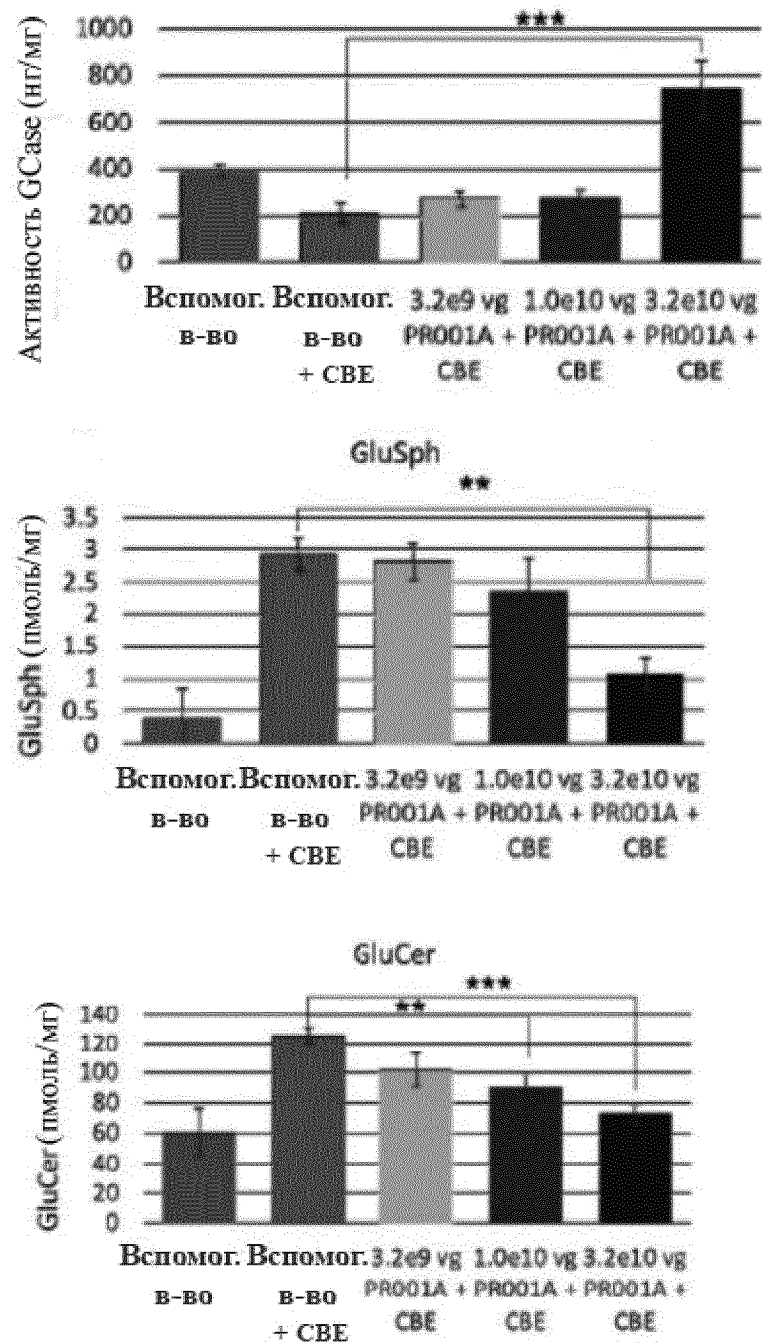


Тест в сужающемся пучке света

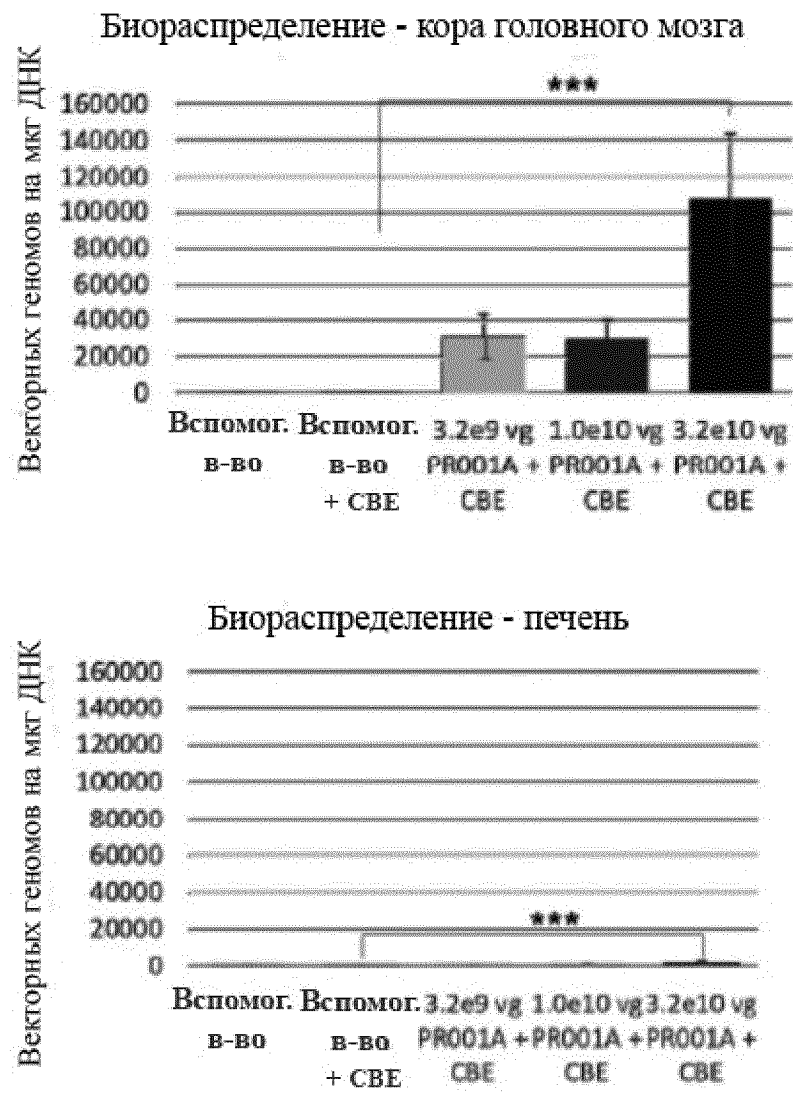


Фиг. 15 (продолжение)

Ферментативная активность

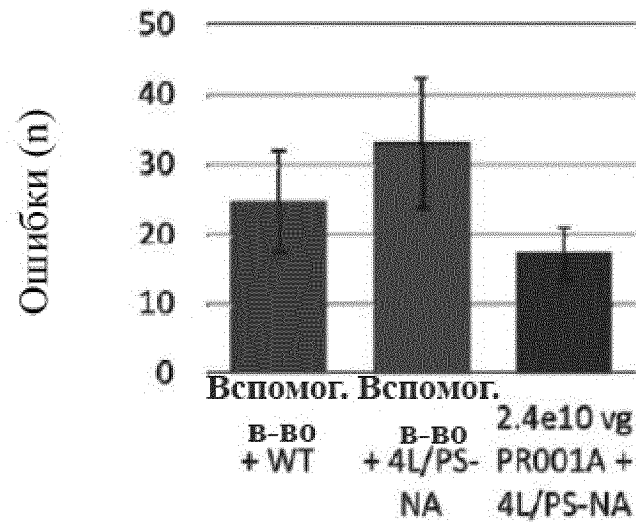


Фиг. 16

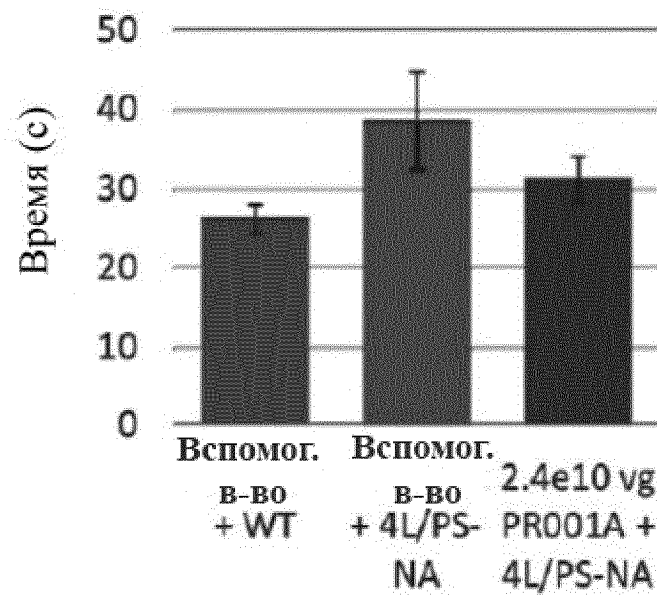


Фиг. 16 (продолжение)

Движение в пучке света - общее количество ошибок

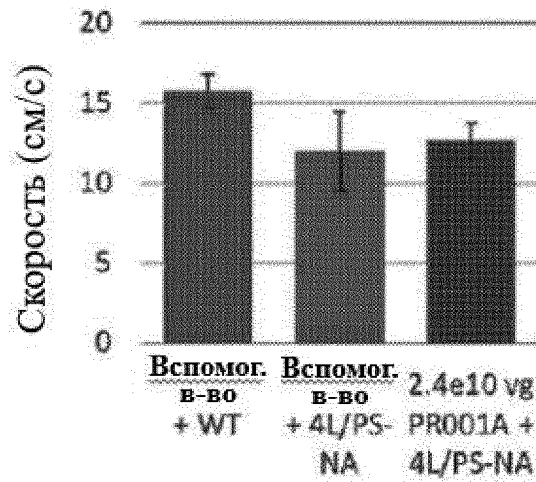


Движение в пучке света - активное время

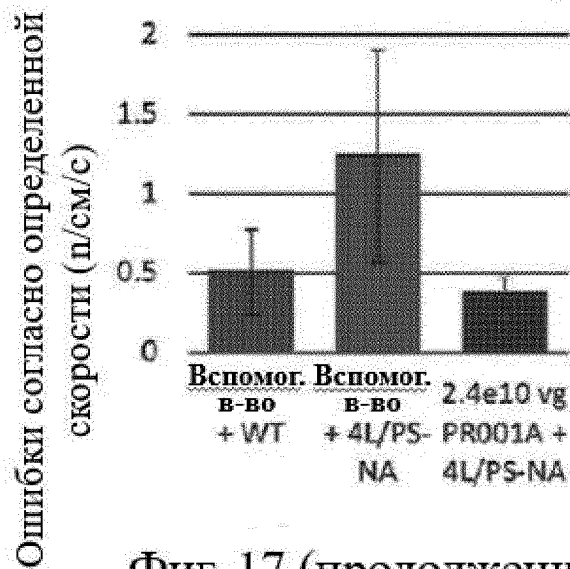


Фиг. 17

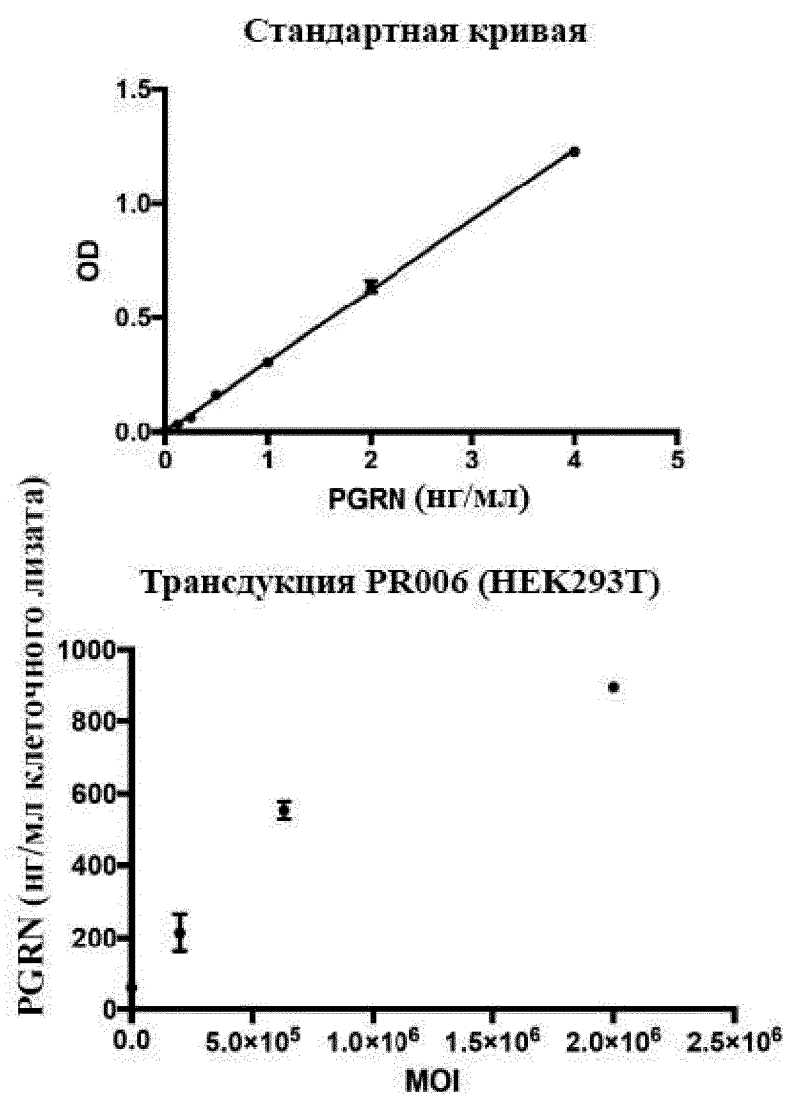
Движение в пучке света - Скорость



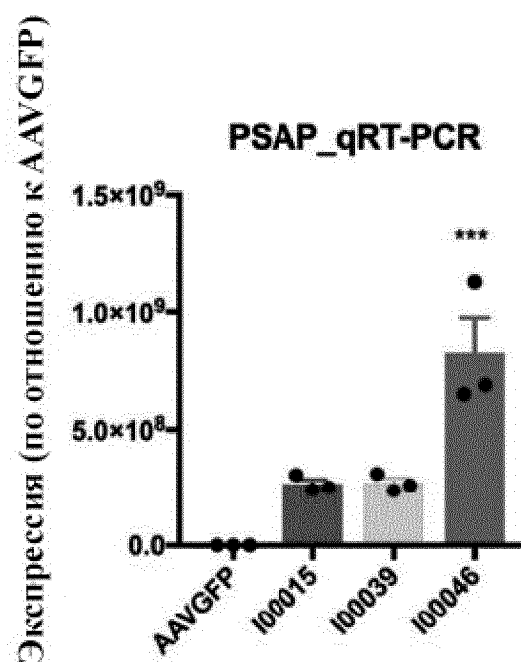
Движение в пучке света - Ошибки согласно определенной скорости



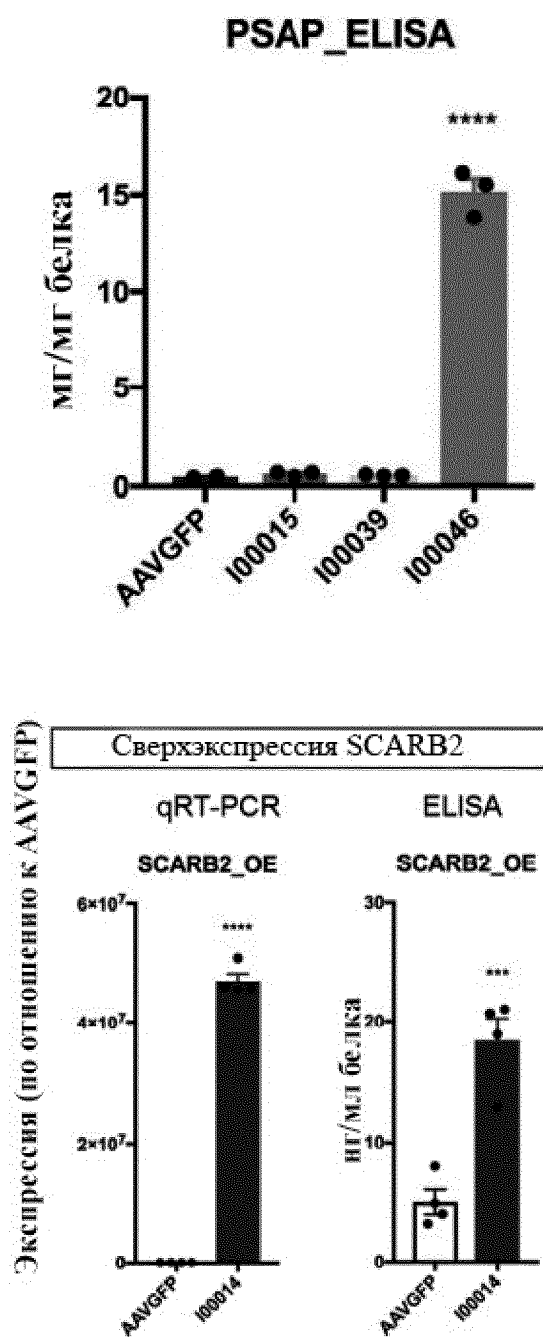
Фиг. 17 (продолжение)



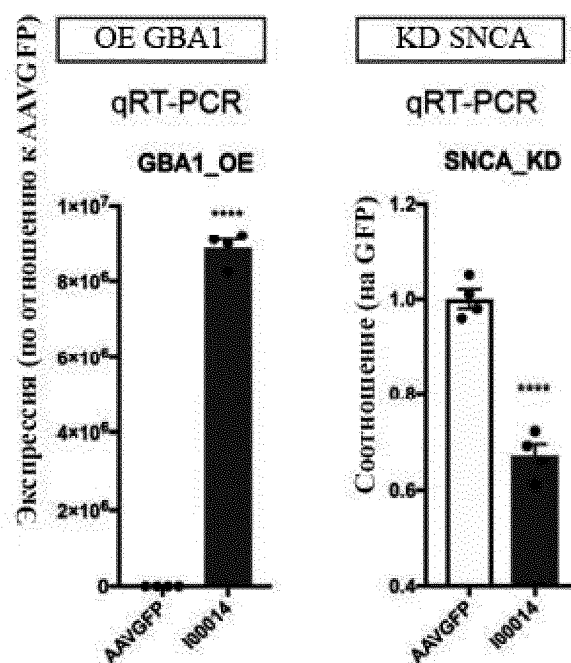
Фиг. 18



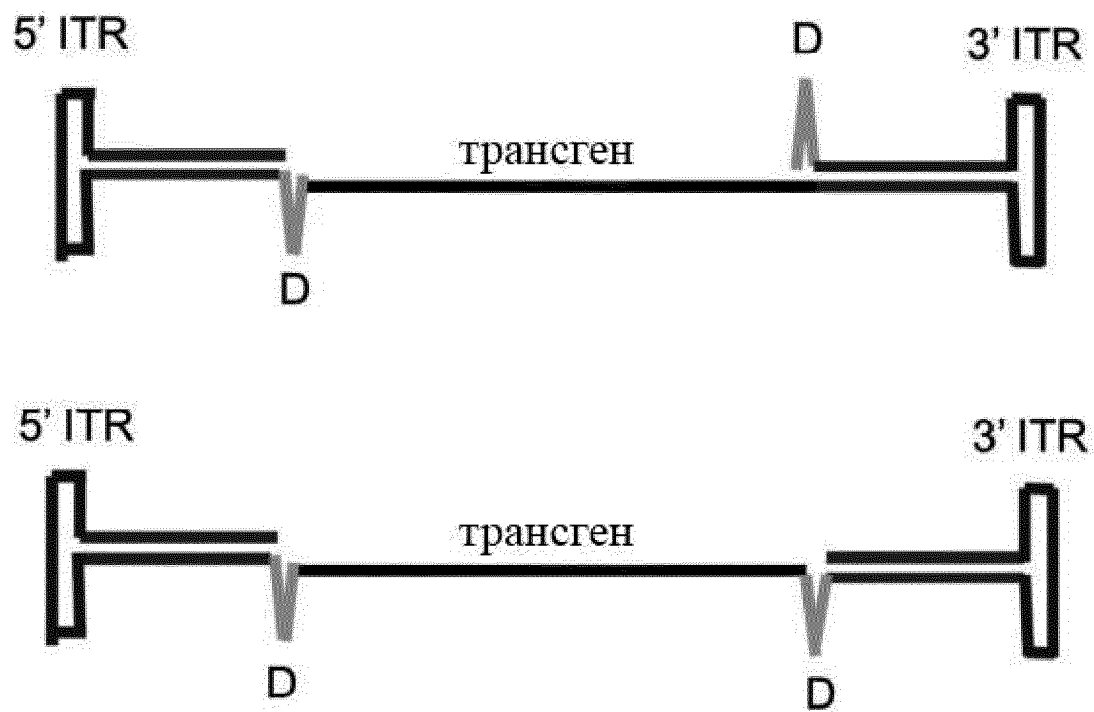
Фиг. 19



Фиг. 19 (продолжение)



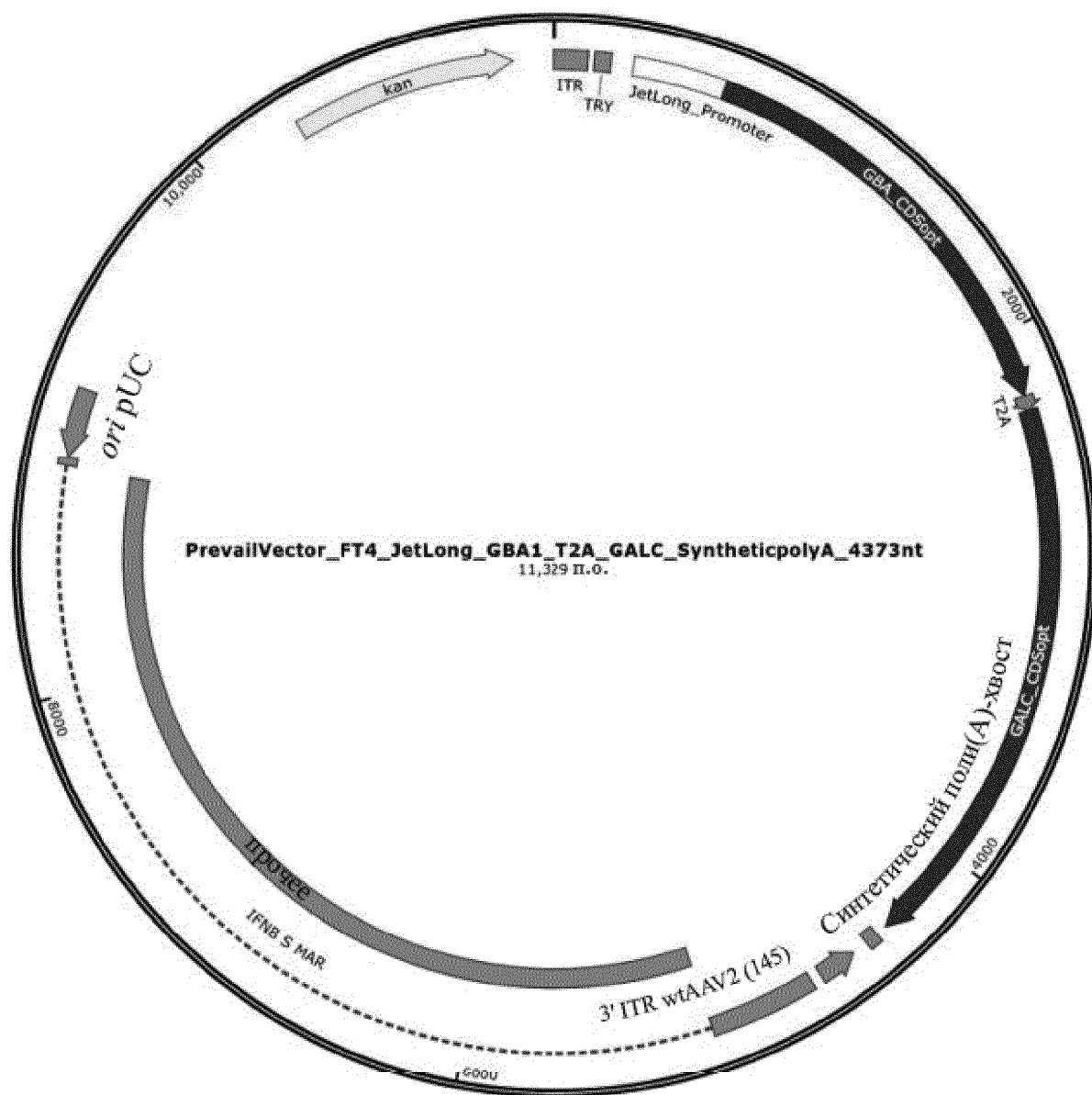
Фиг. 19 (продолжение)



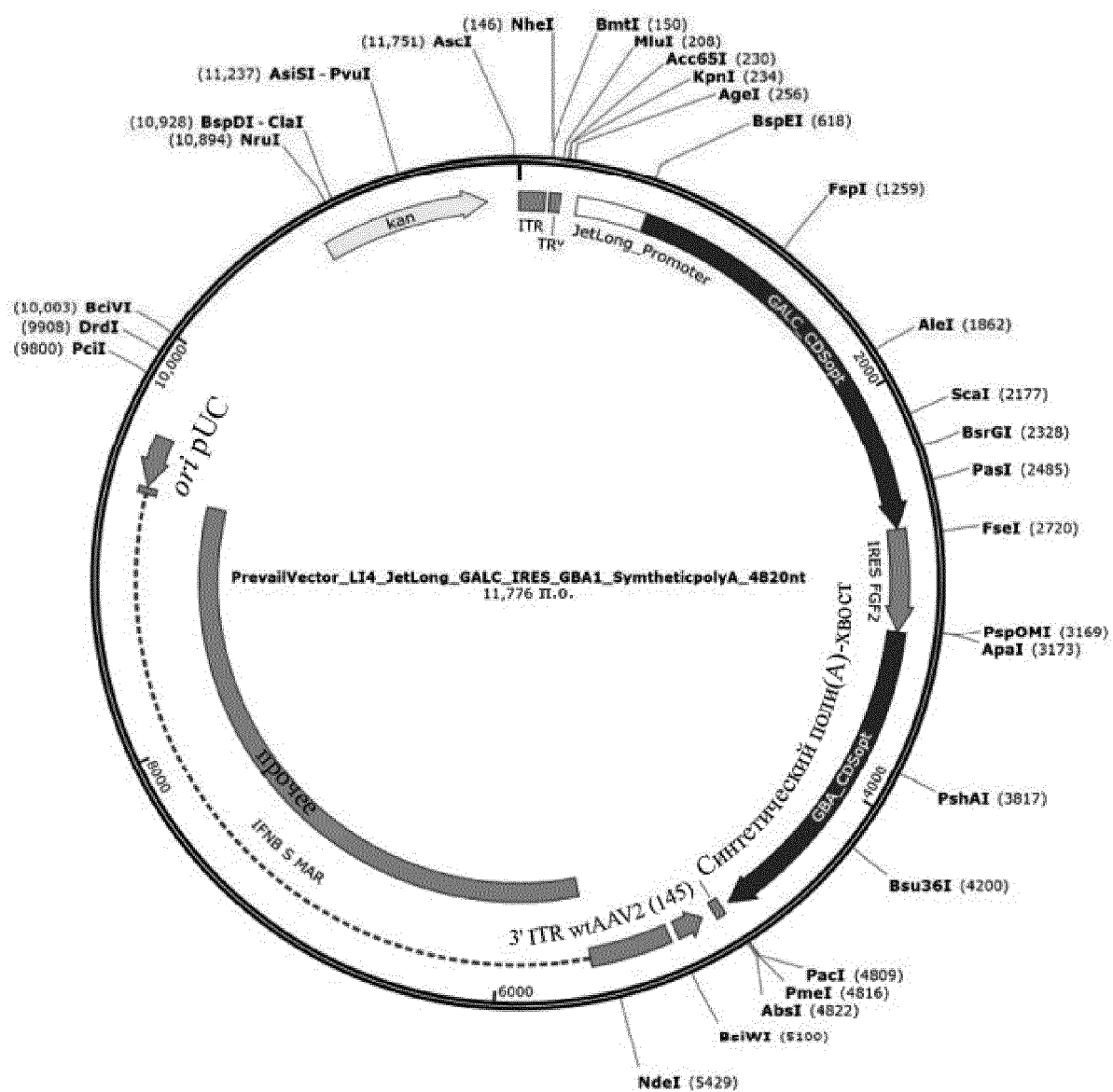
Фиг. 20



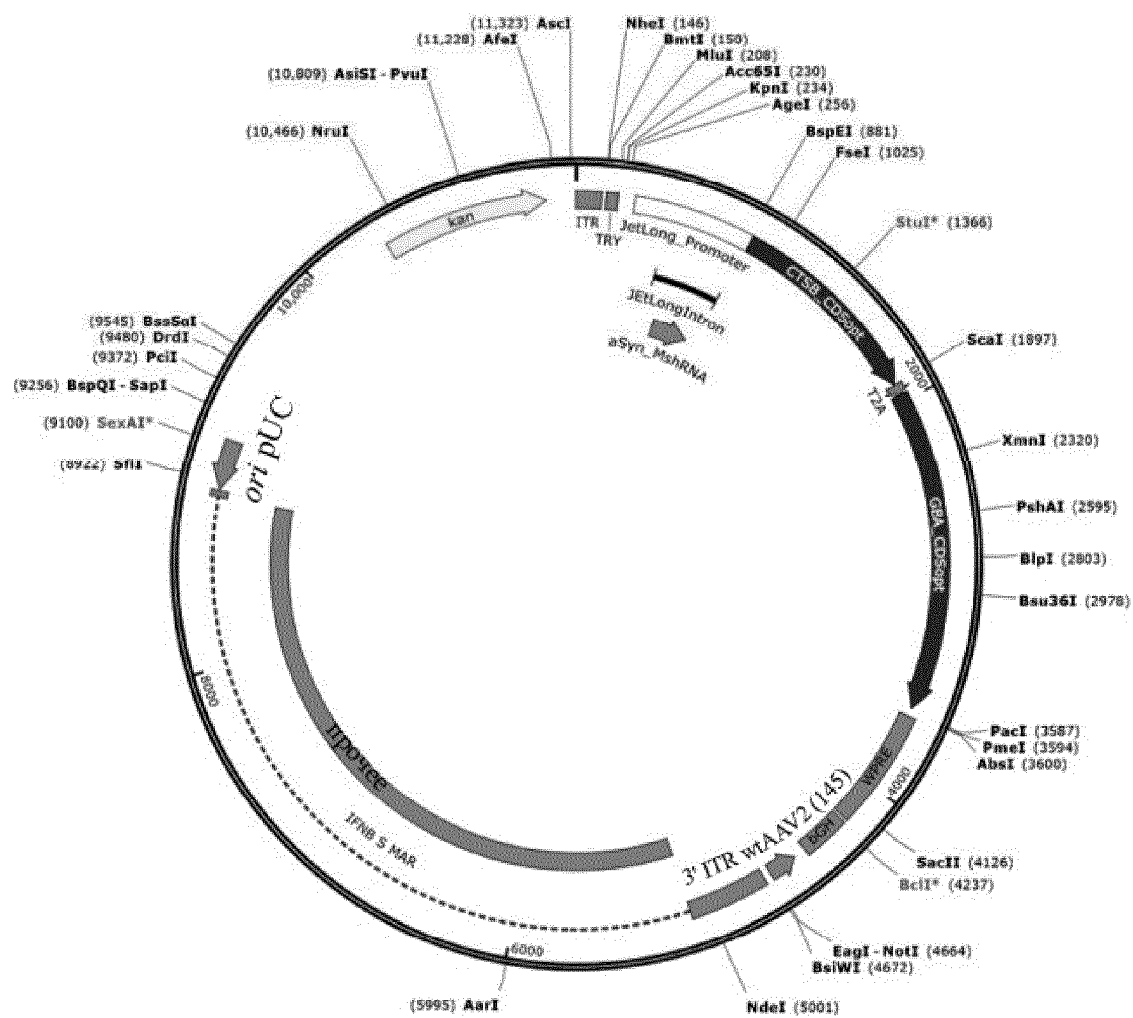
Фиг. 21



Фиг. 22



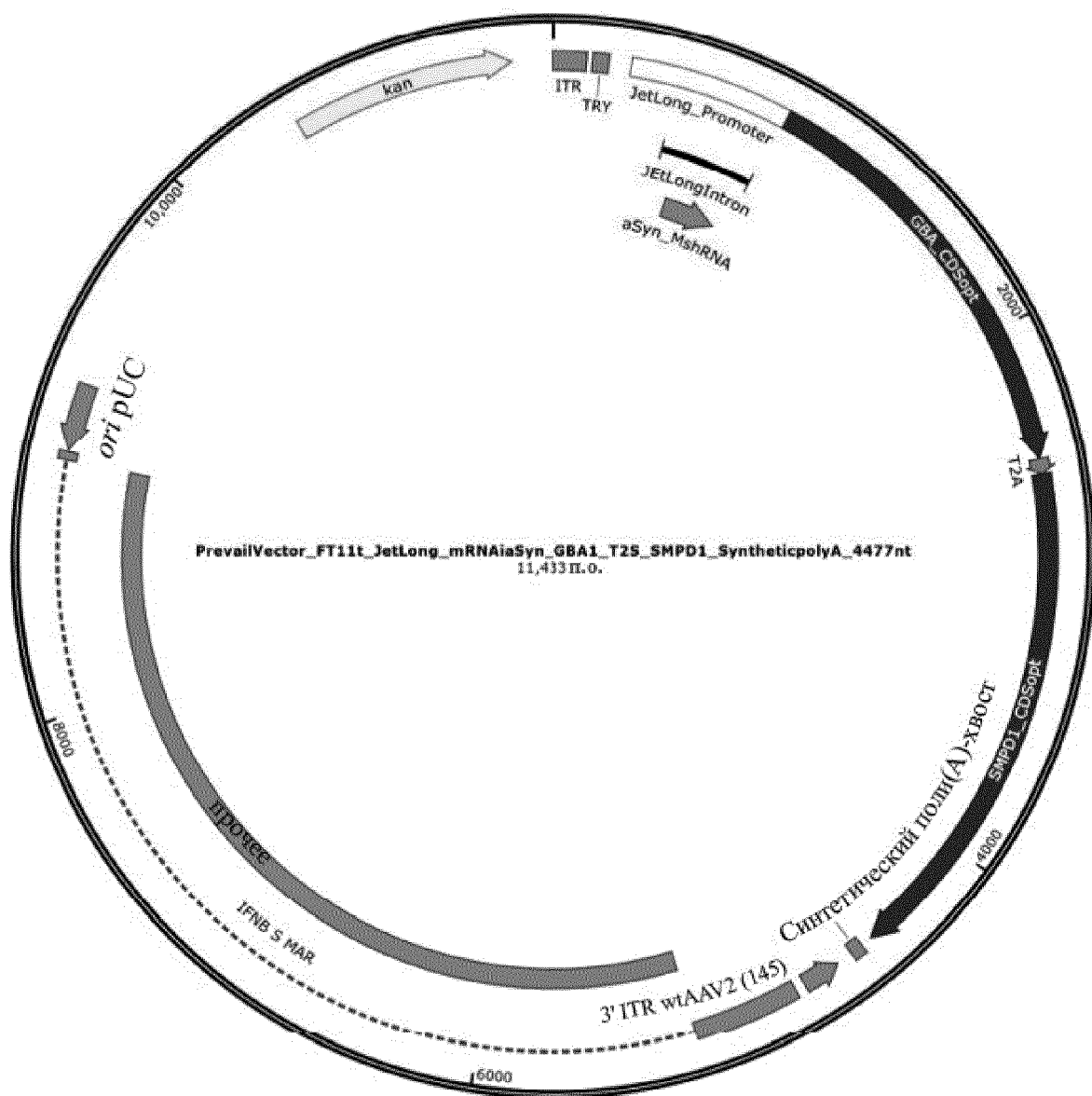
Фиг. 23



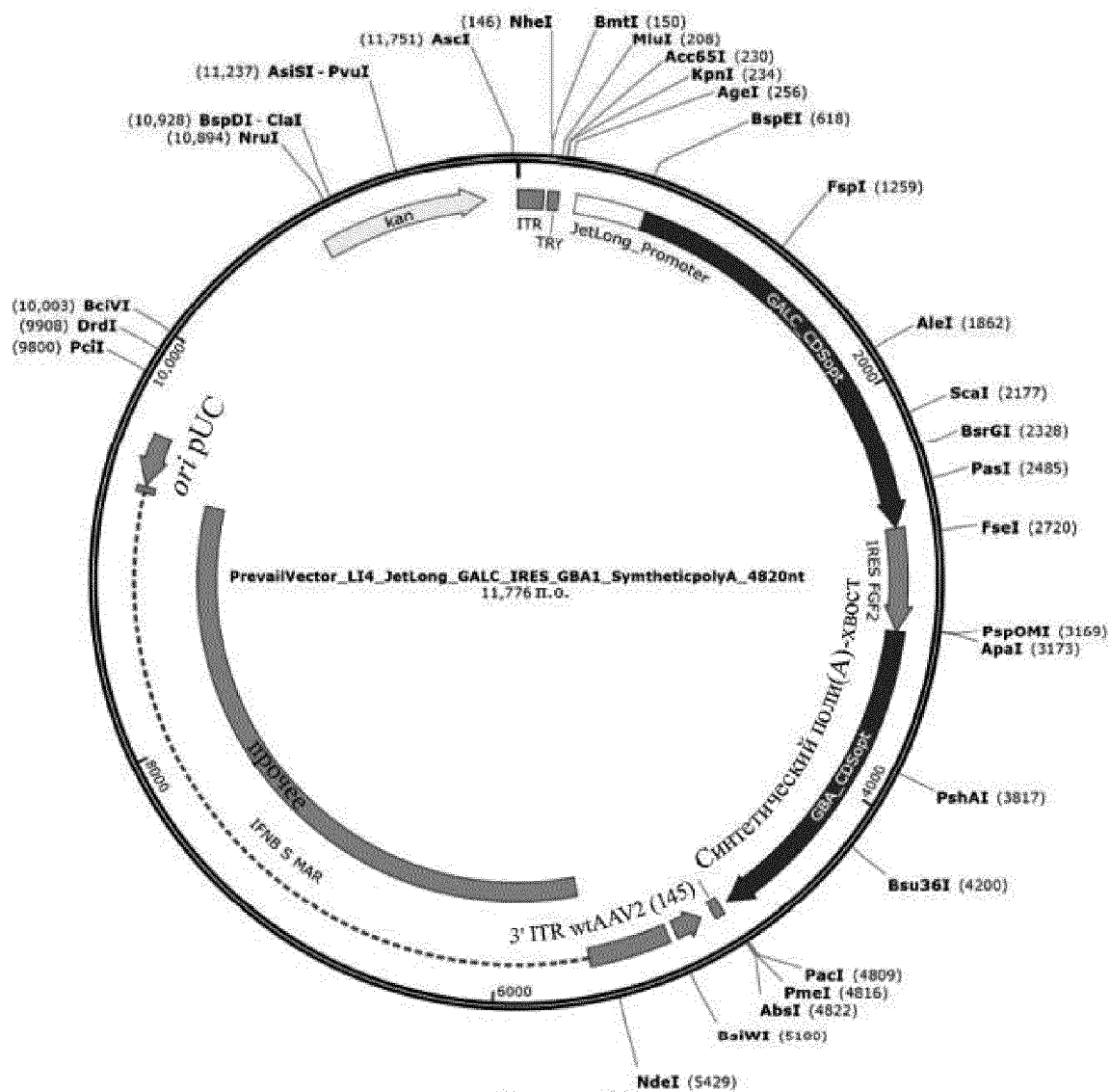
PrevailVector_LT5s_JetLong_mRNAiaSyn_CTSB-T2A-GBA1_WPRE_bGH_4392nt

11,348 п.о.

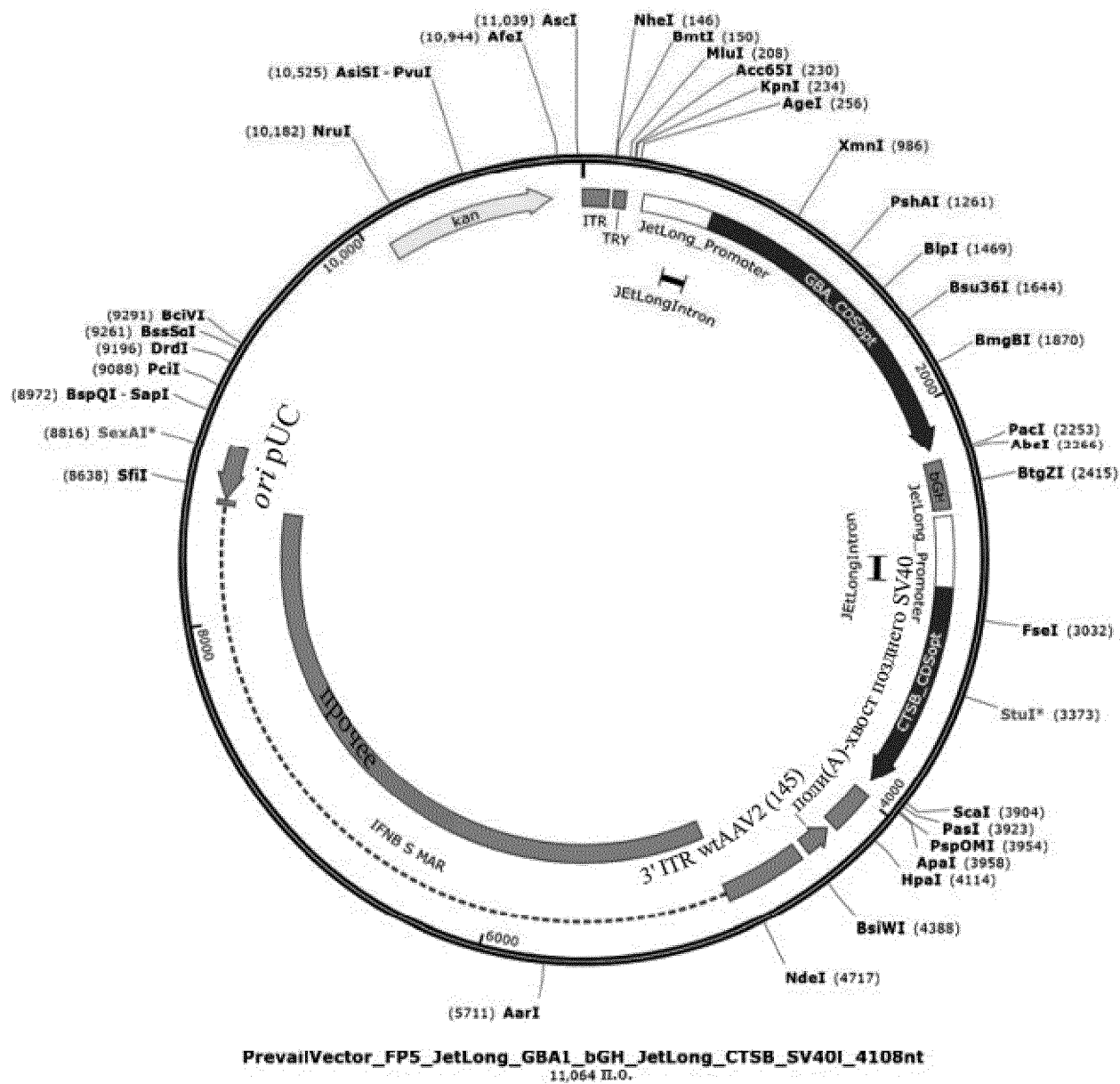
Фиг. 24



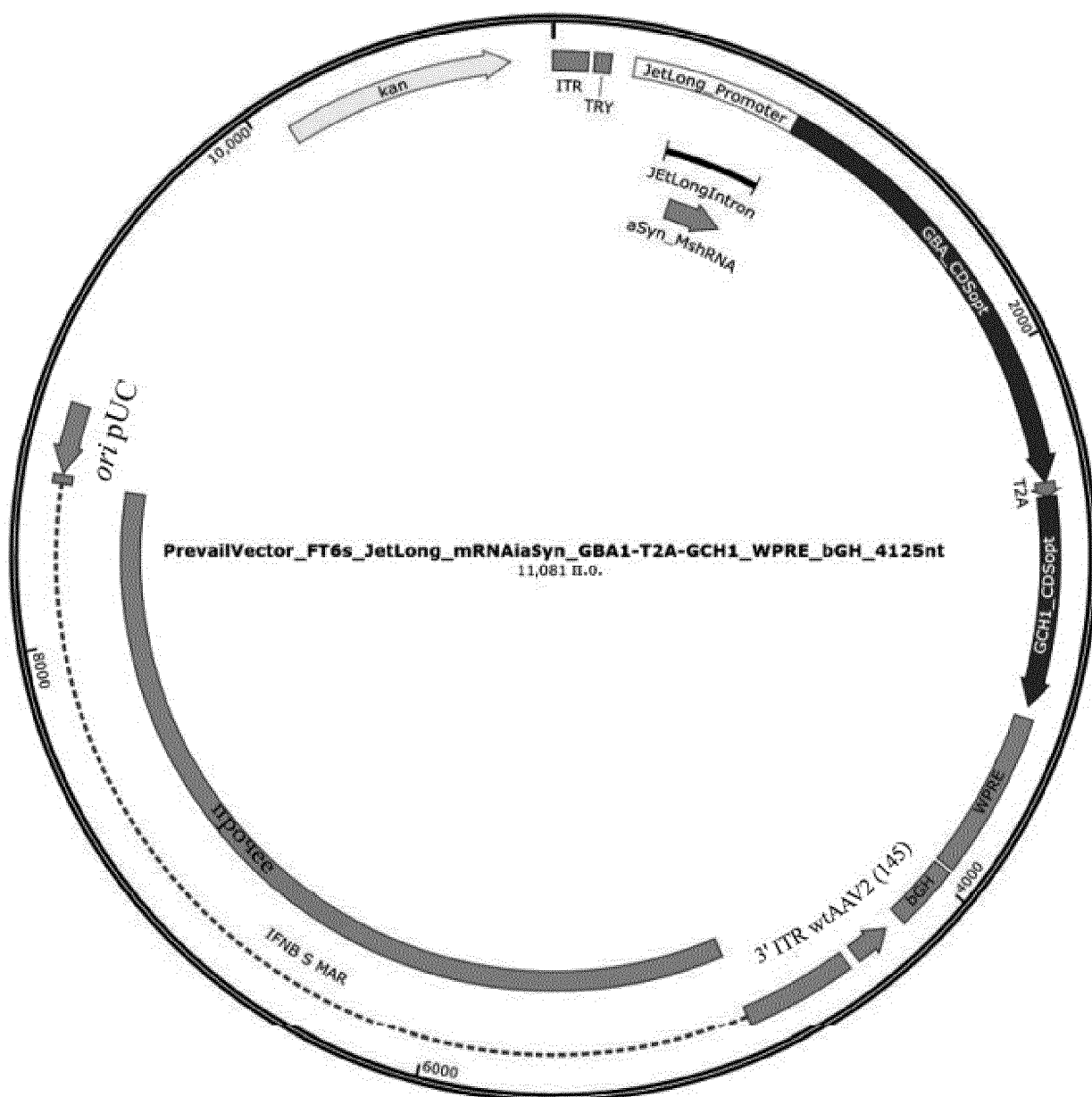
Фиг. 25



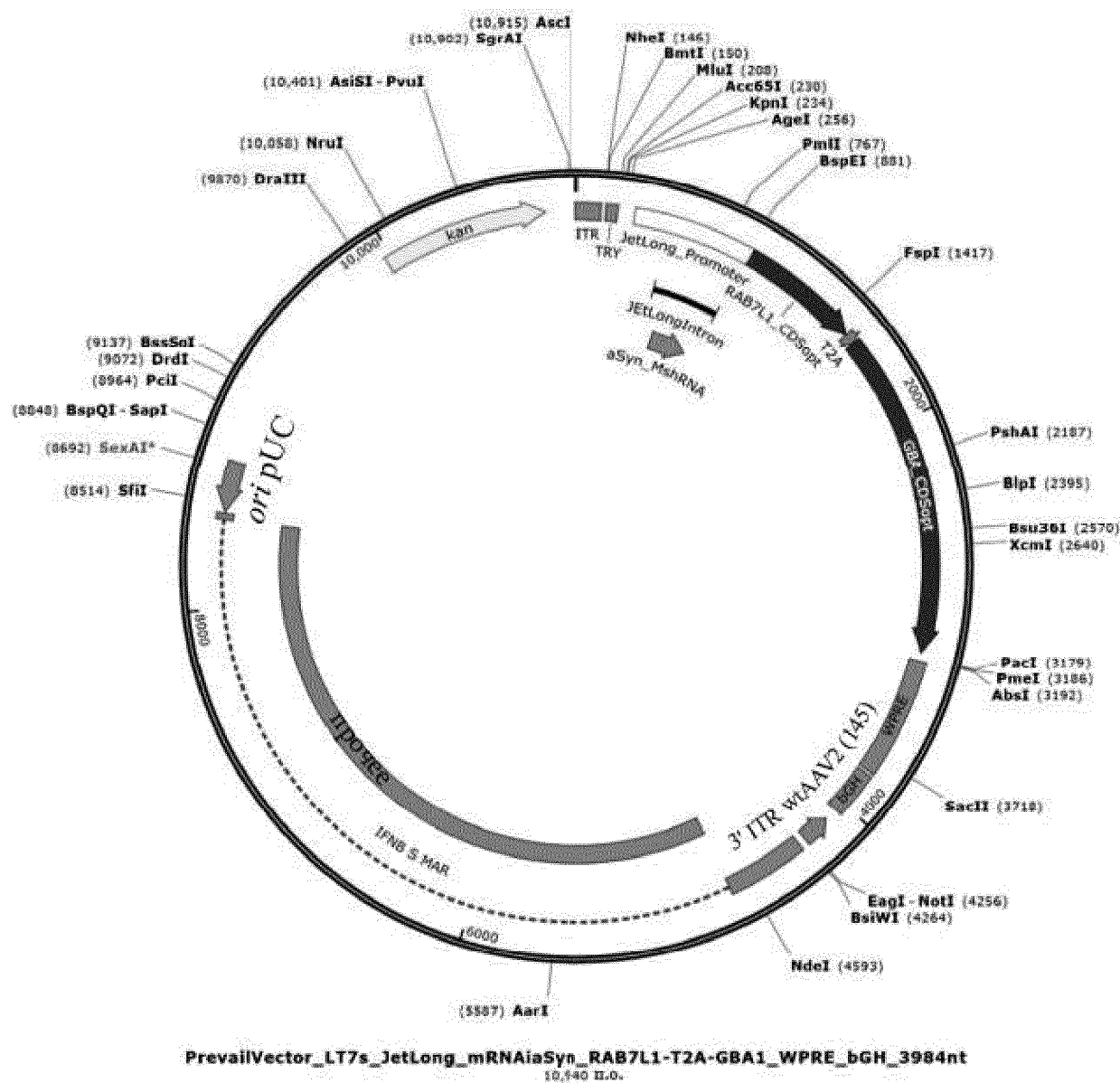
Фиг. 26



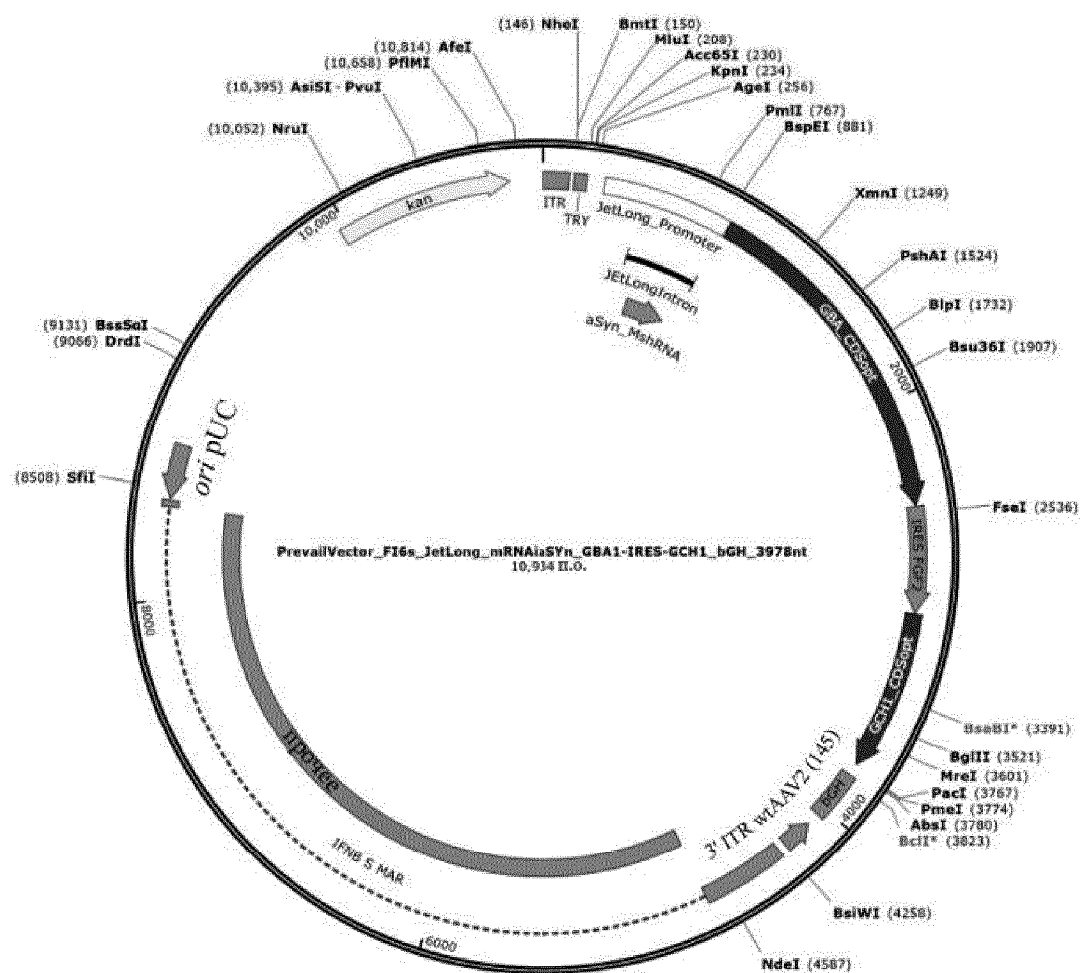
Фиг. 27



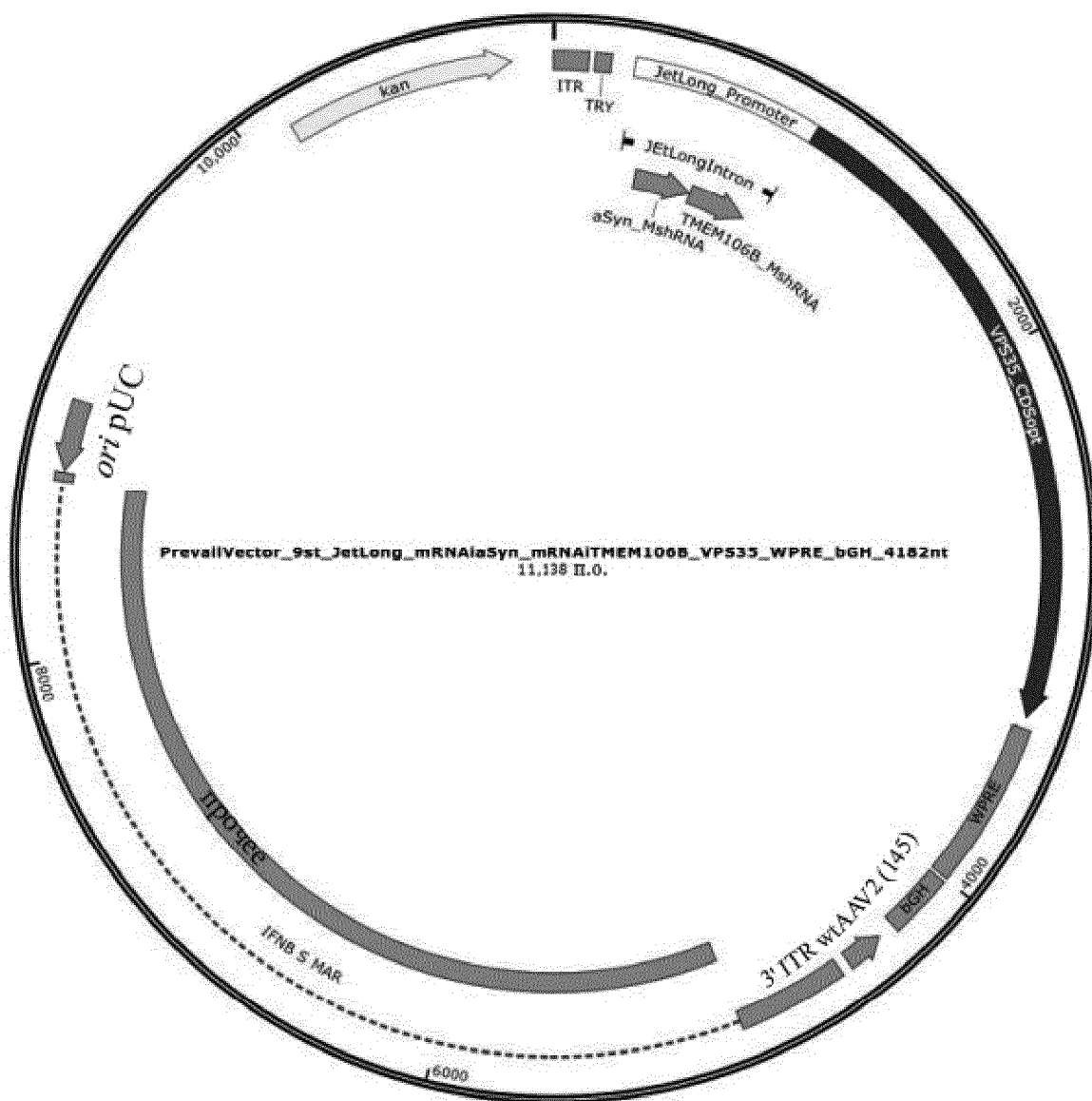
Фиг. 28



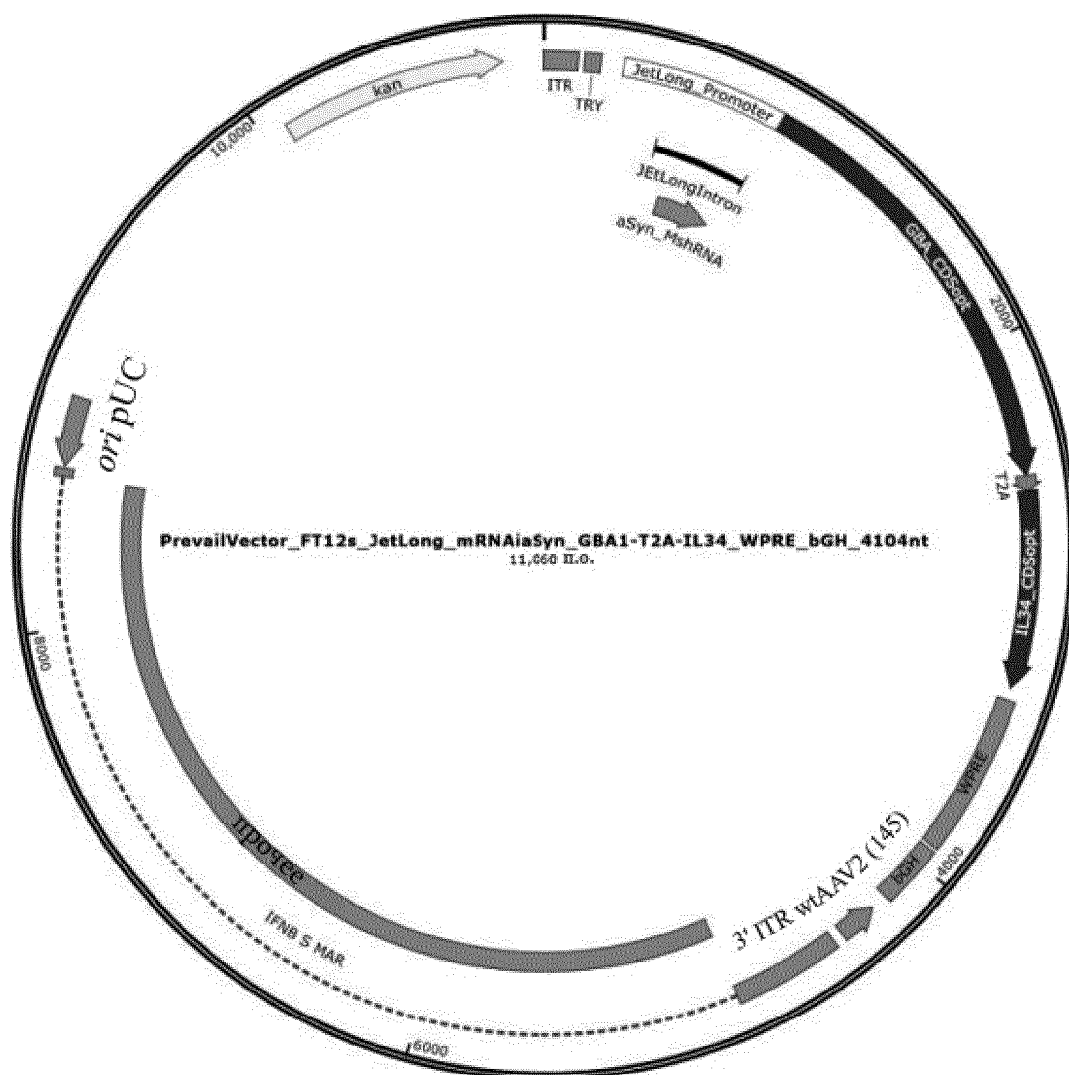
Фиг. 29



Фиг. 30



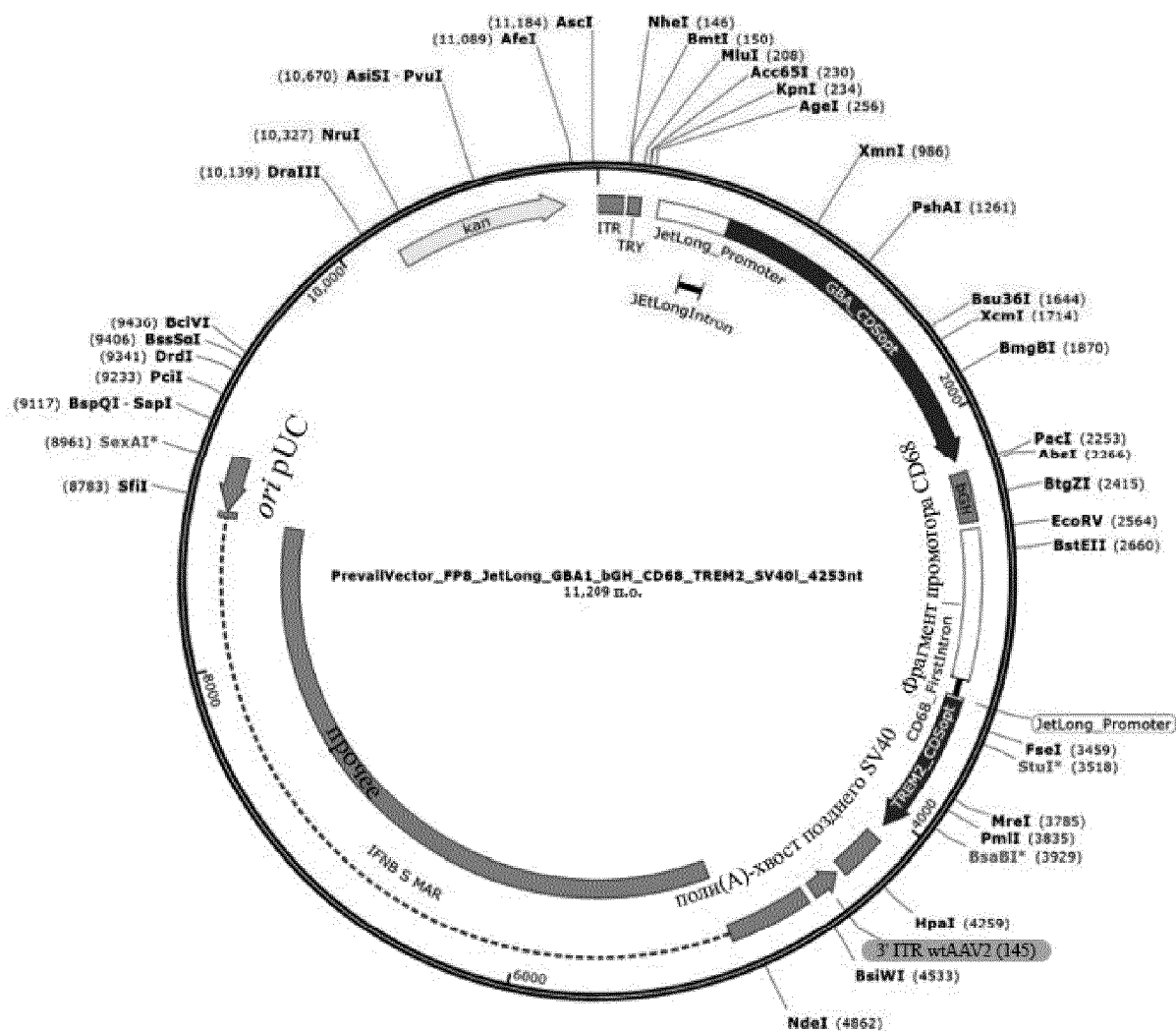
Фиг. 31



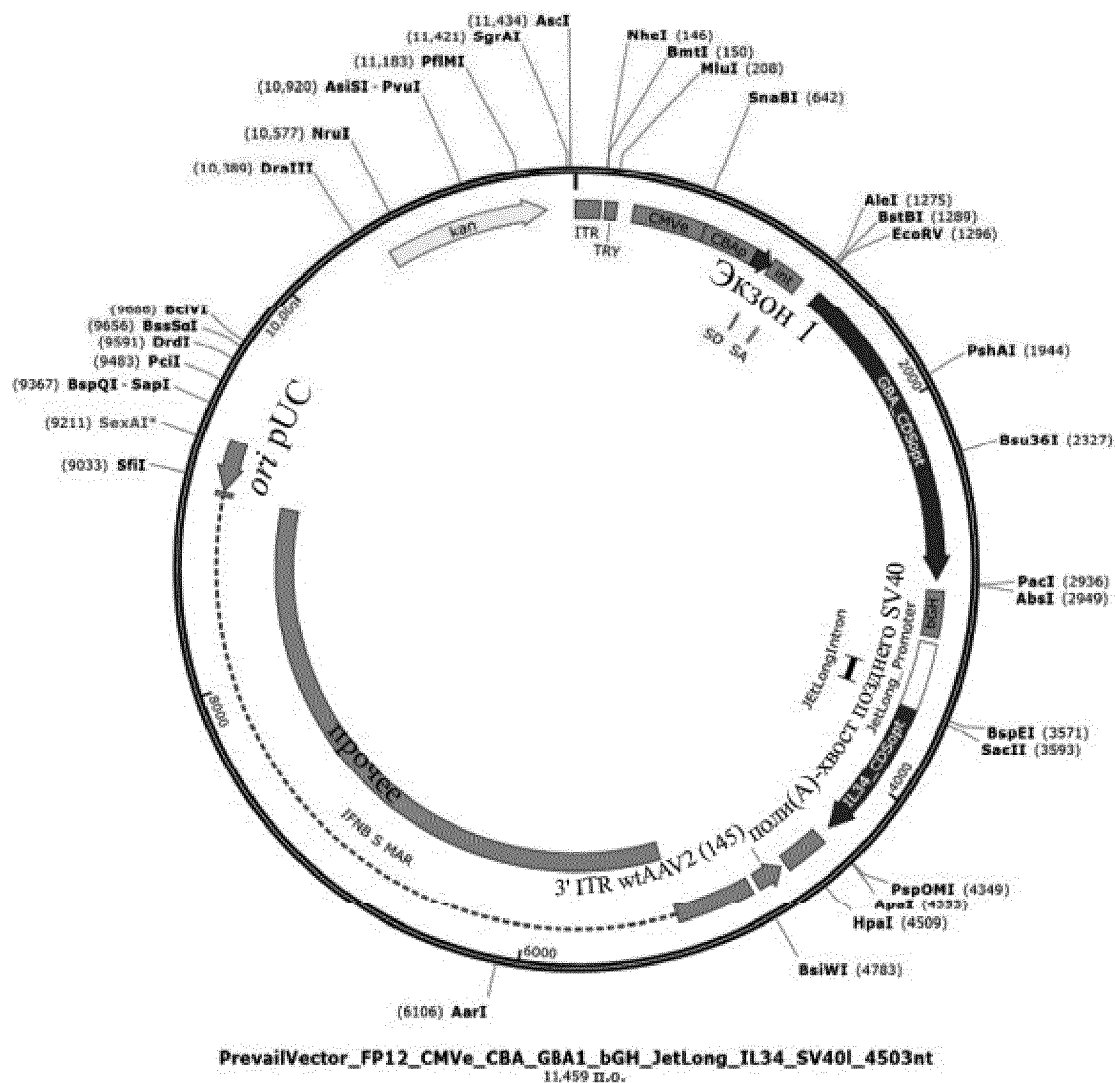
Фиг. 32



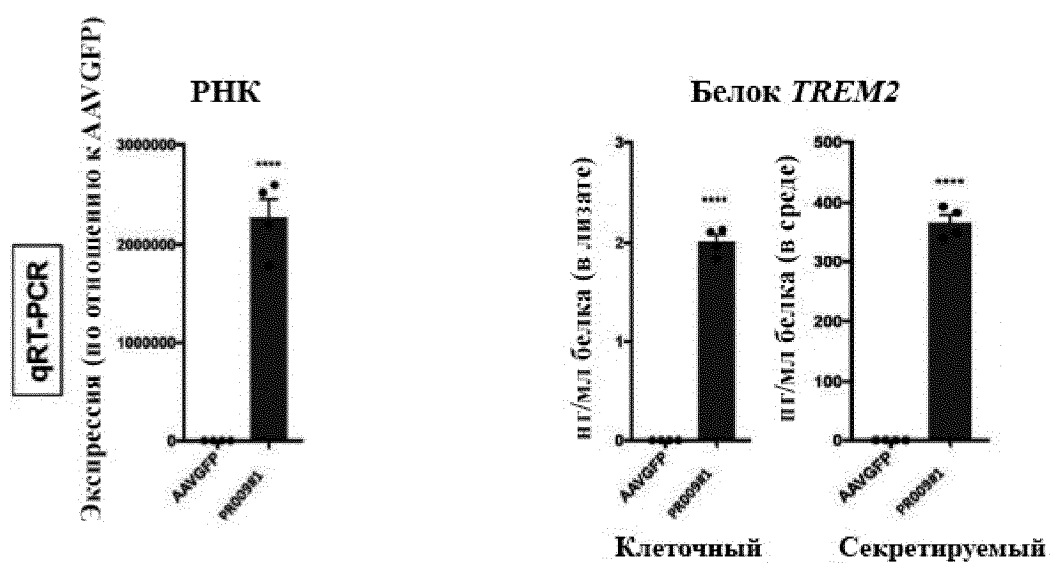
ФИГ. 33



Фиг. 34

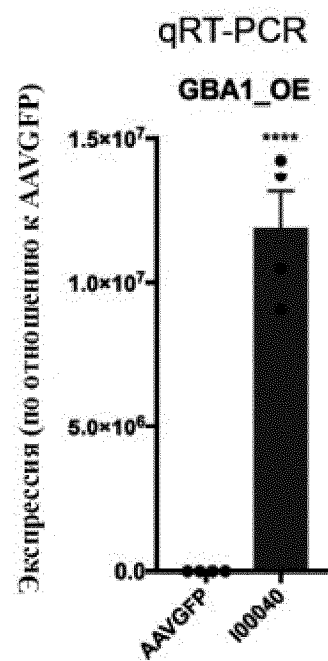


Фиг. 35

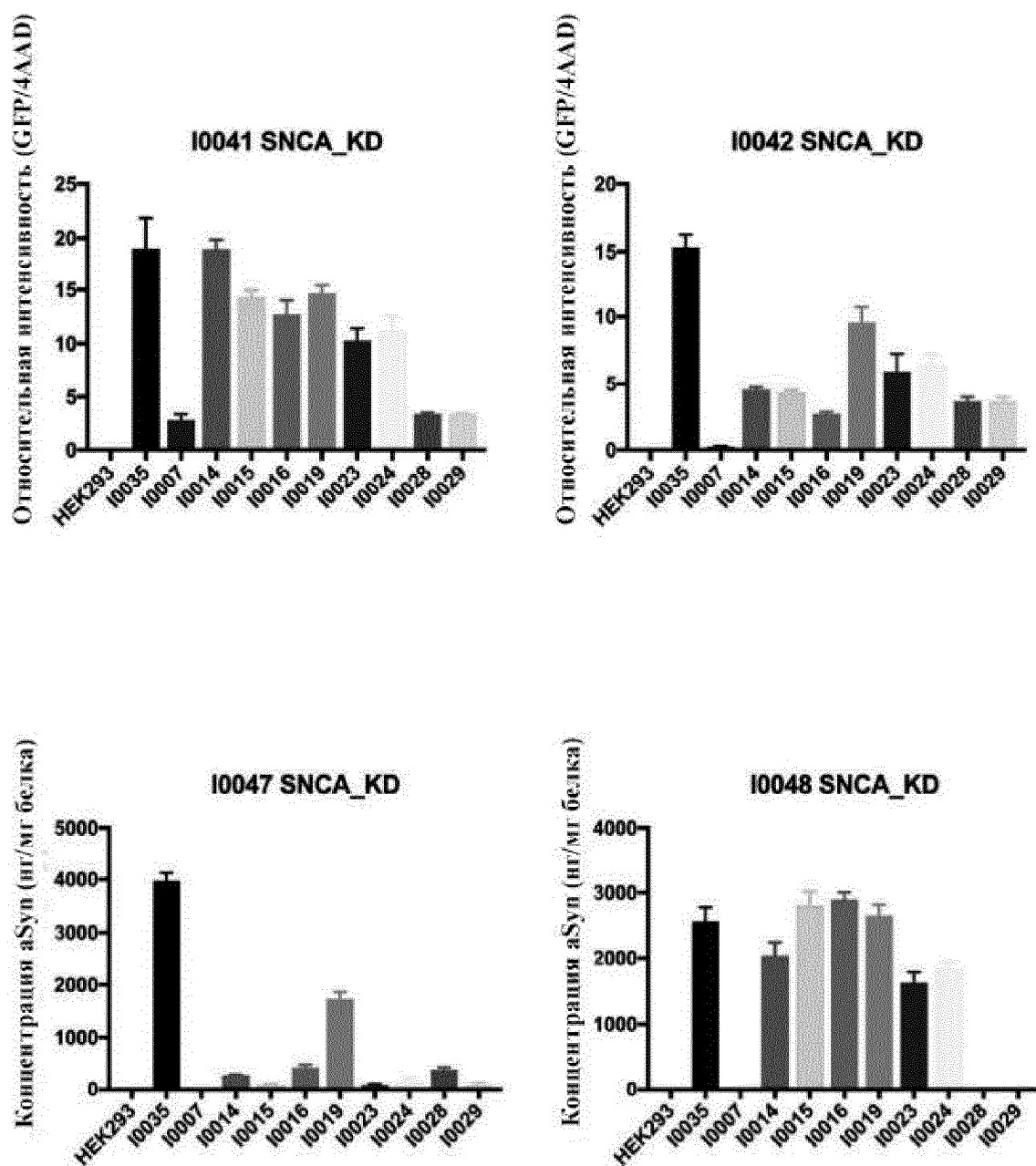


Фиг. 36А

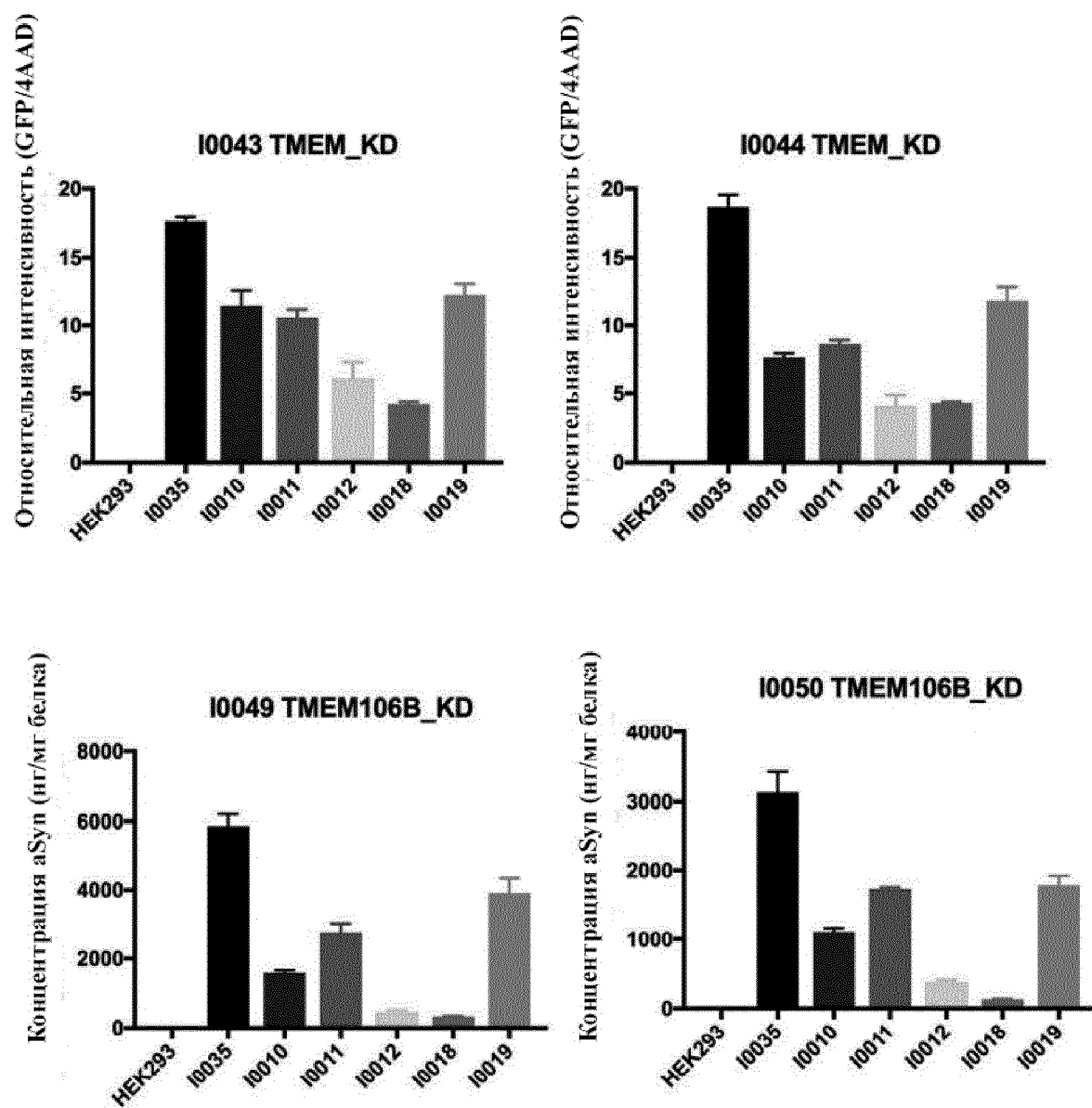
Сверхэкспрессия GBA1



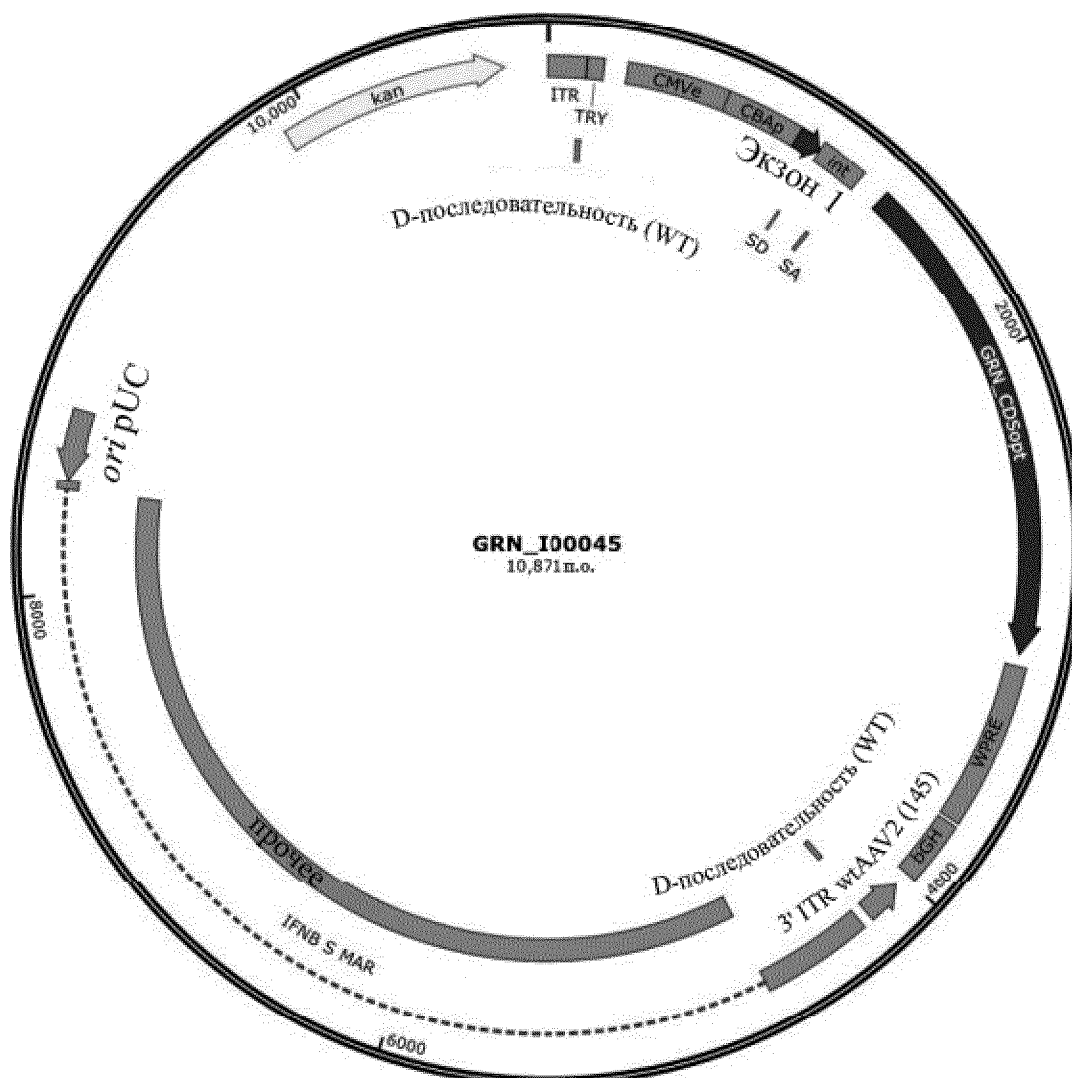
Фиг. 36В



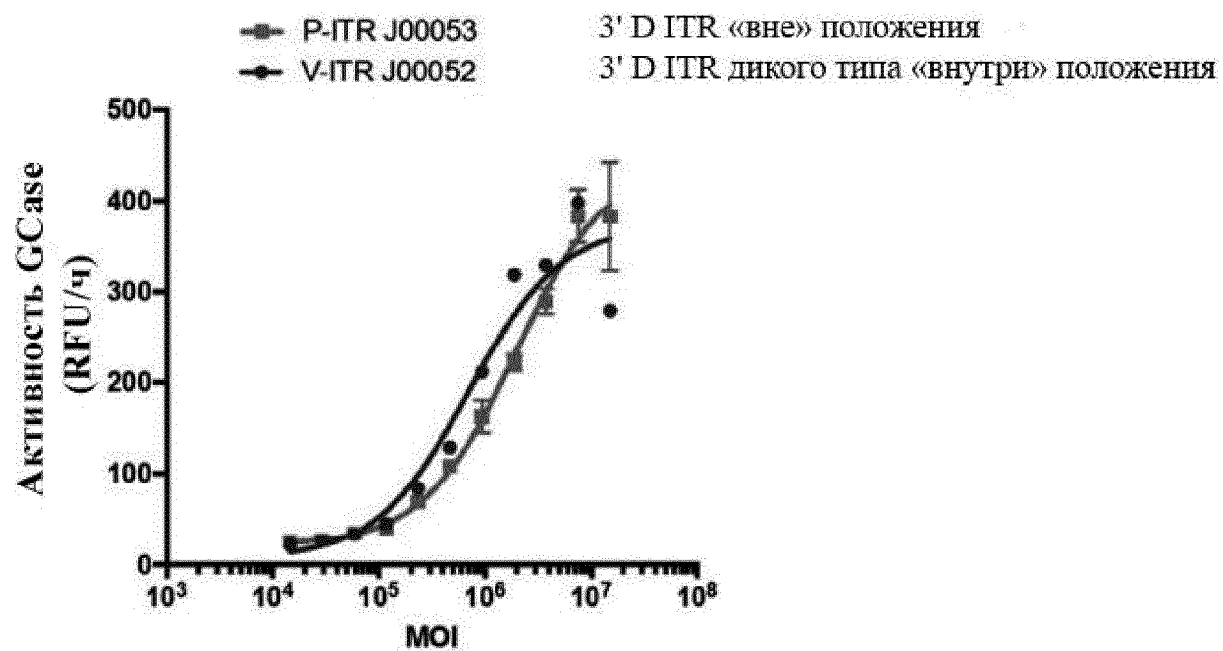
Фиг. 37



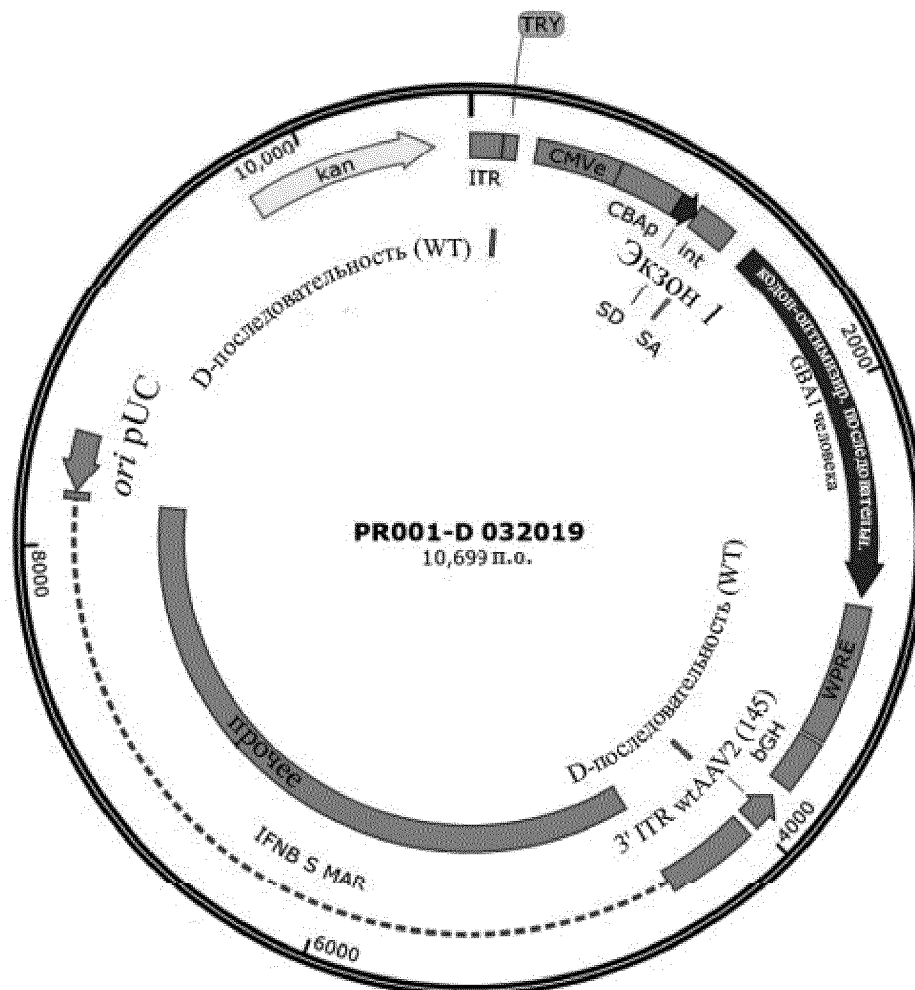
Фиг. 38



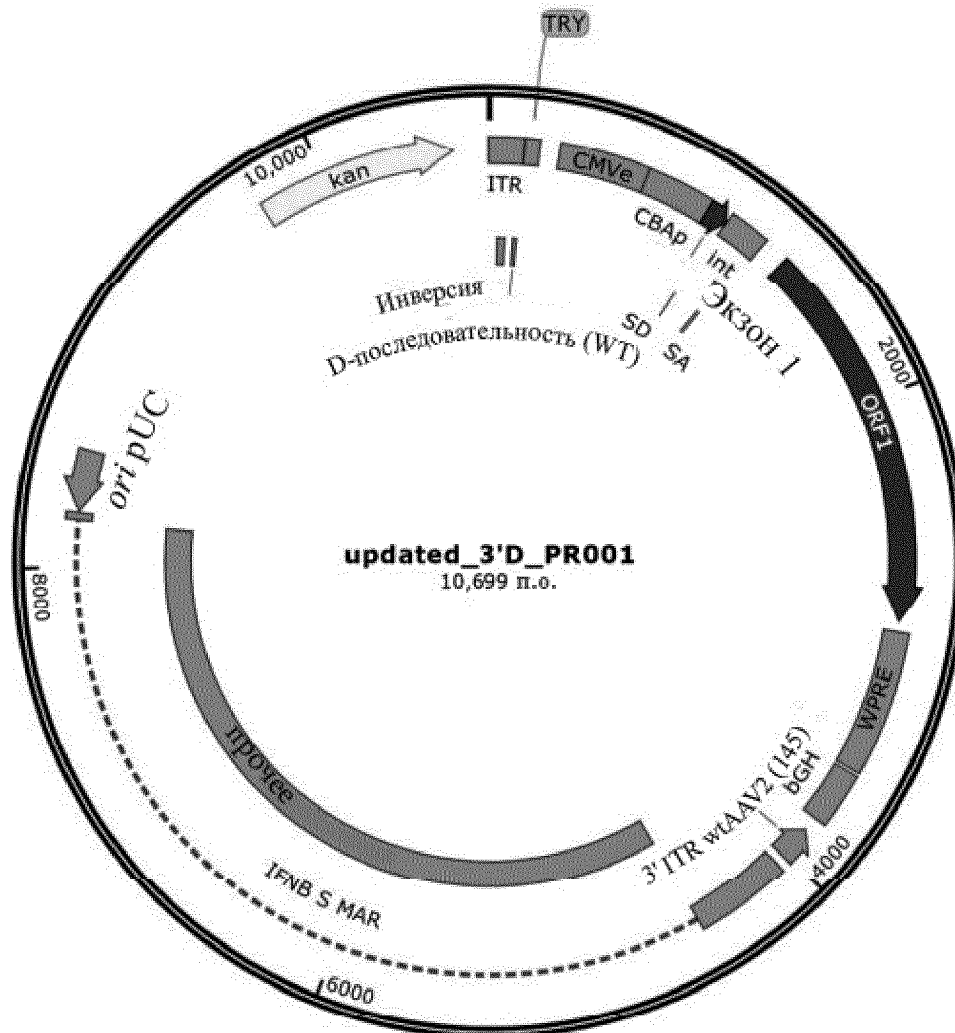
Фиг. 39



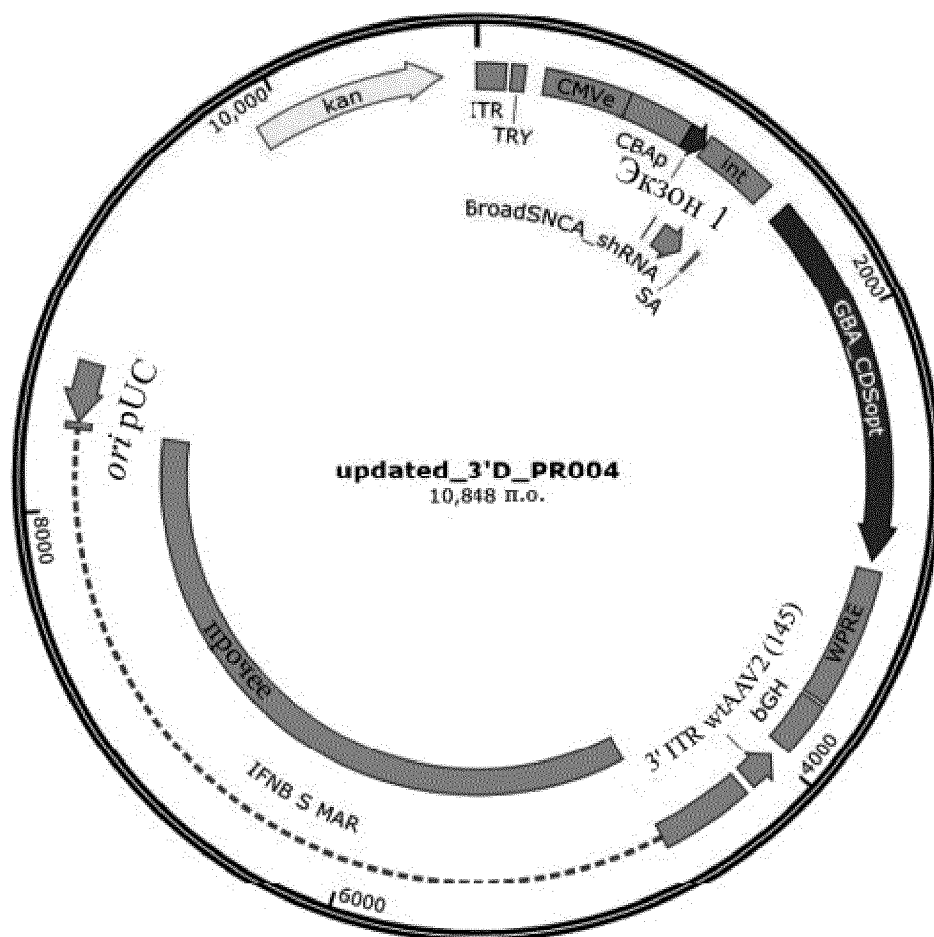
Фиг. 40



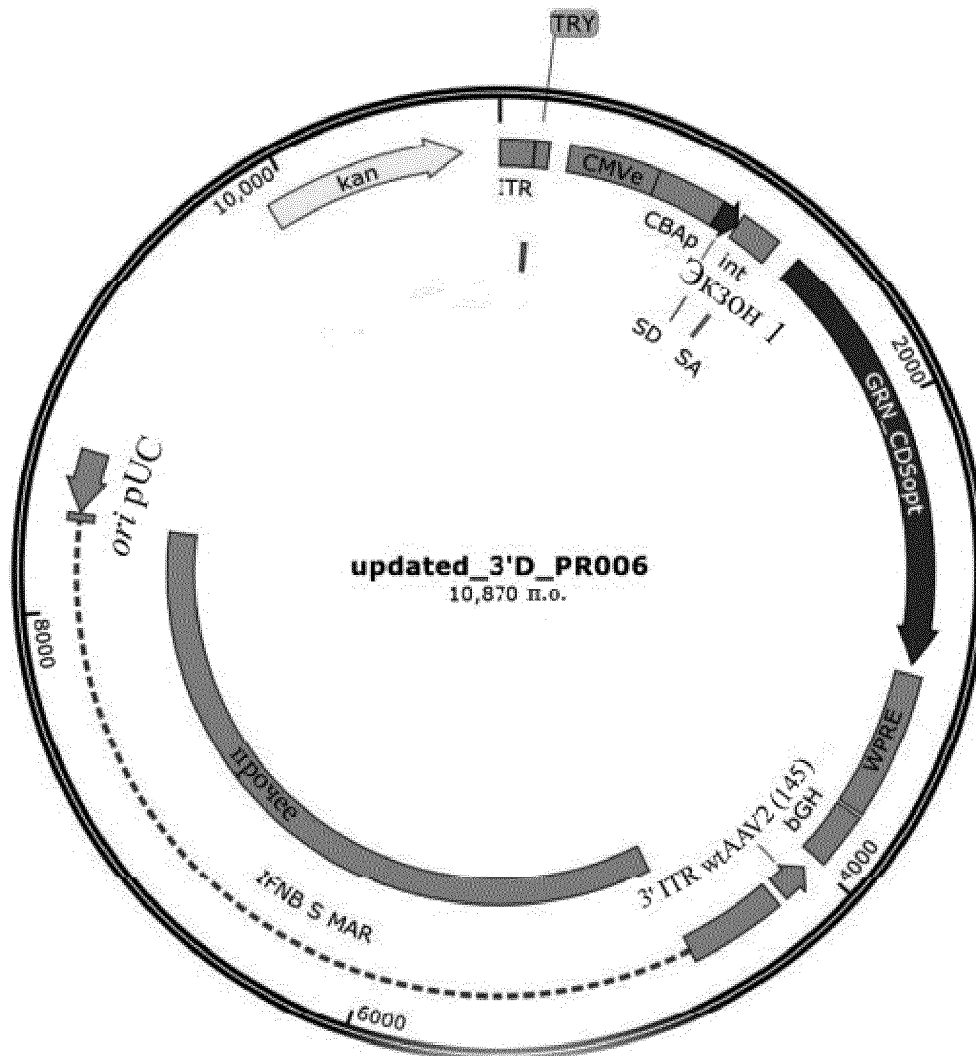
Фиг. 41



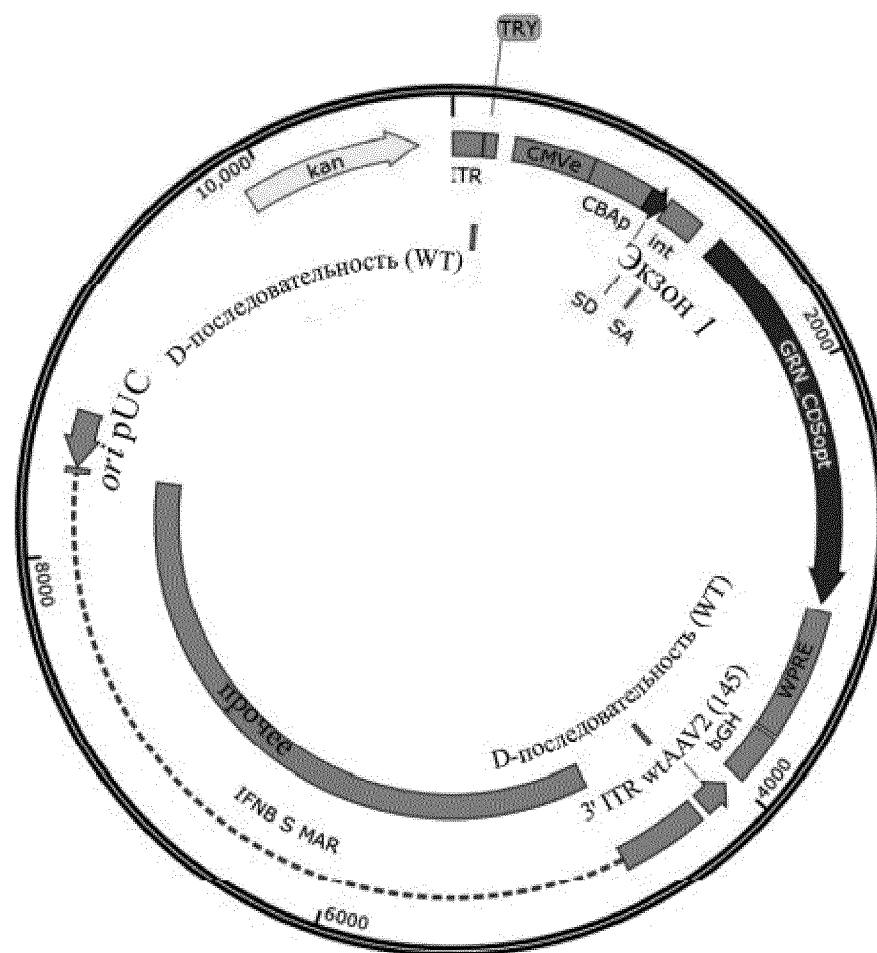
Фиг. 42



Фиг. 43

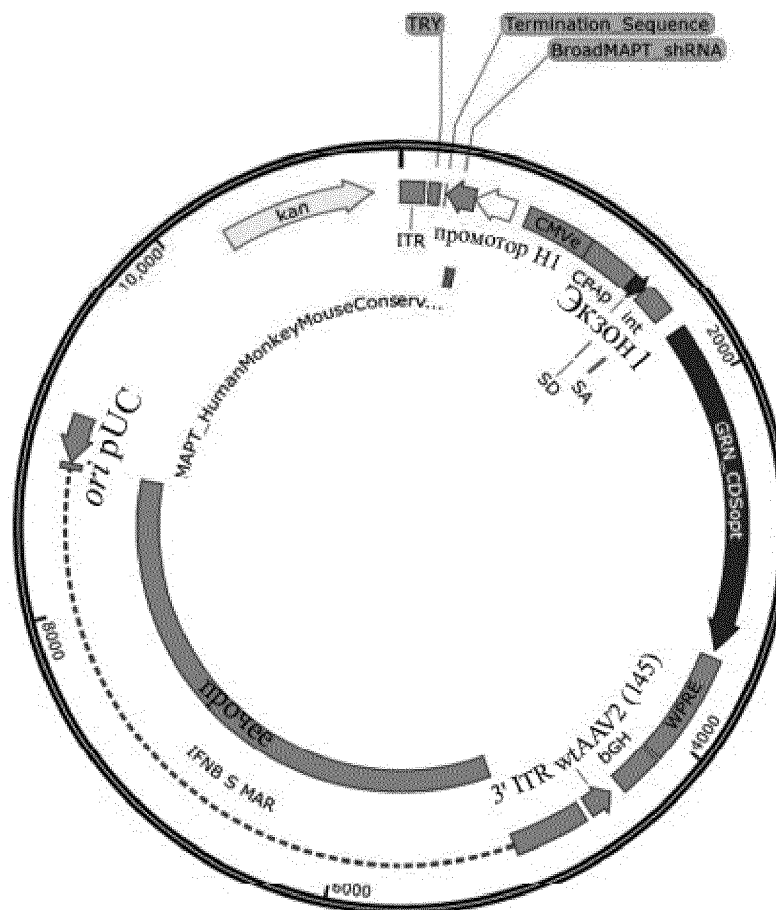


Фиг. 44



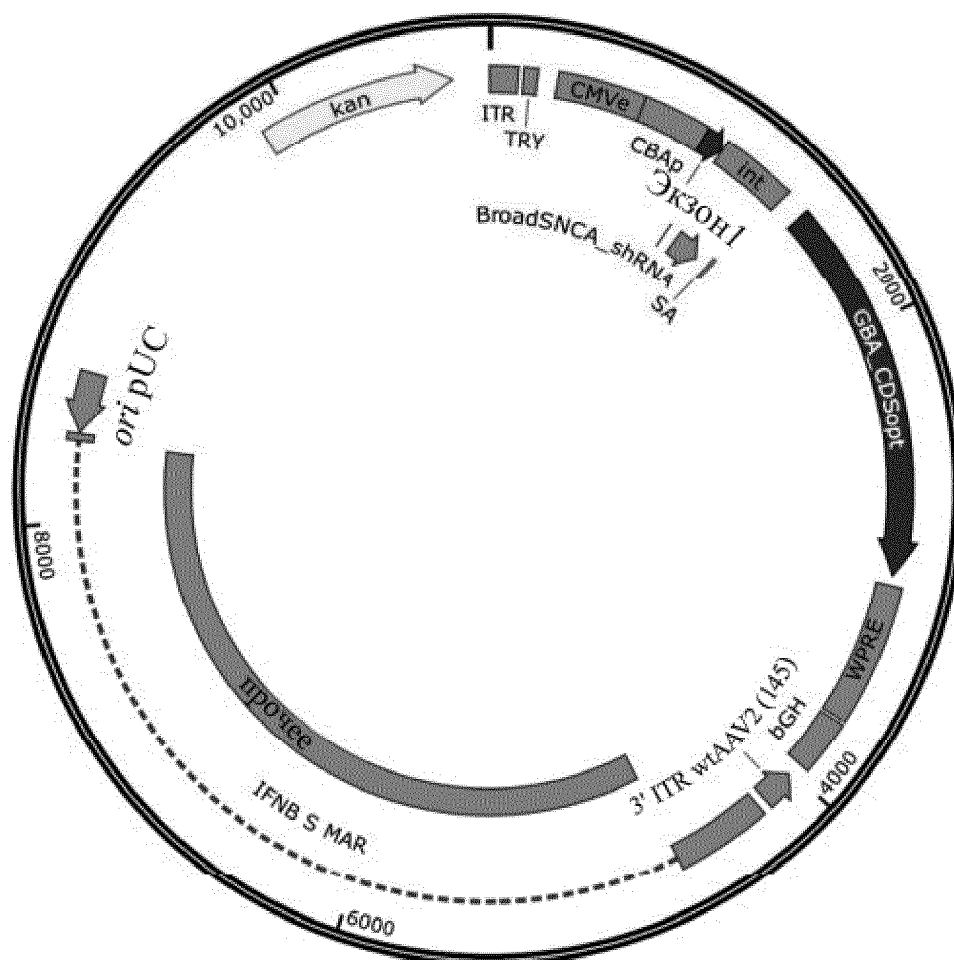
updated_38.GRN_PW aligned both VM and P (1)
10,870 п.о.

Фиг. 45



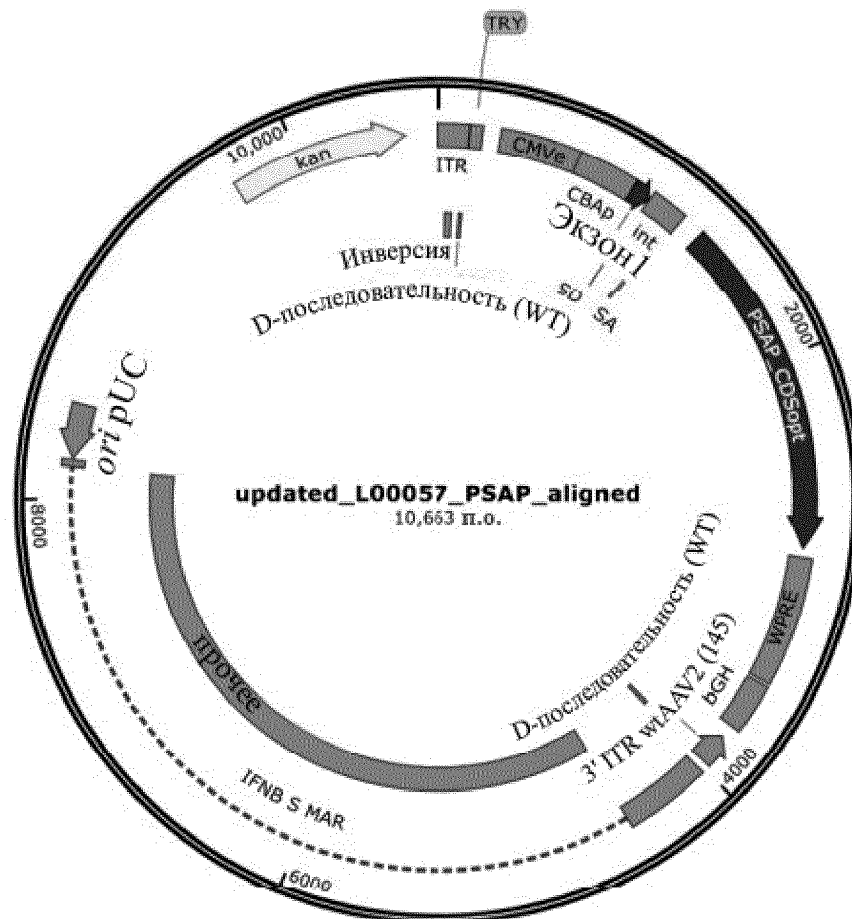
updated_H1_BroadConservedMAPTshRNA_GRN_alignment
11,264 п.о.

Фиг. 46

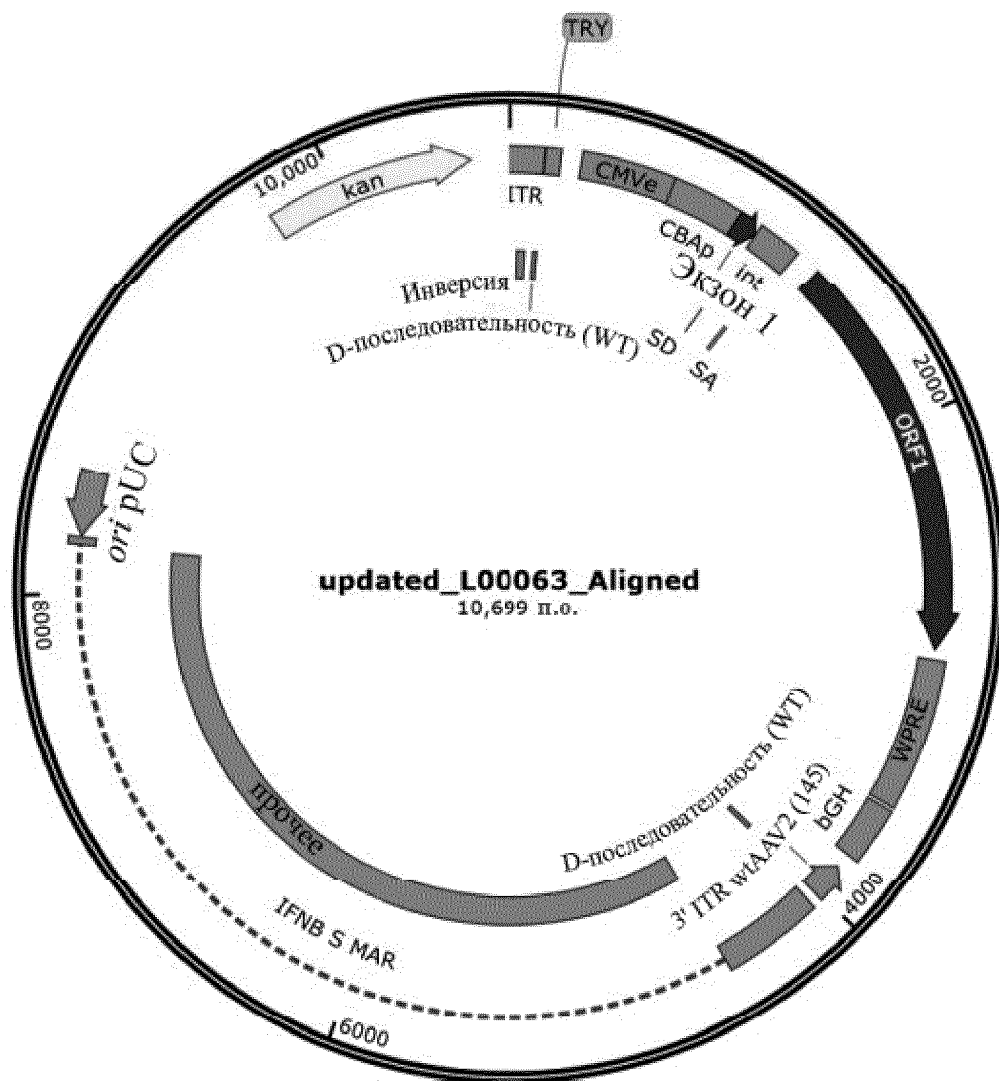


updated_Intronic_SNCA_Broad_sh_GBA1_aligned
10,848 п.о.

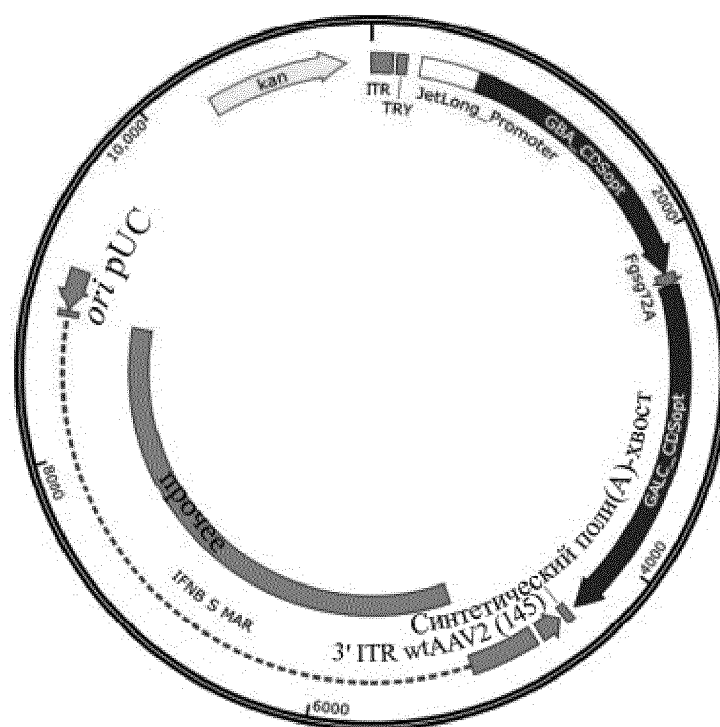
Фиг. 47



Фиг. 48

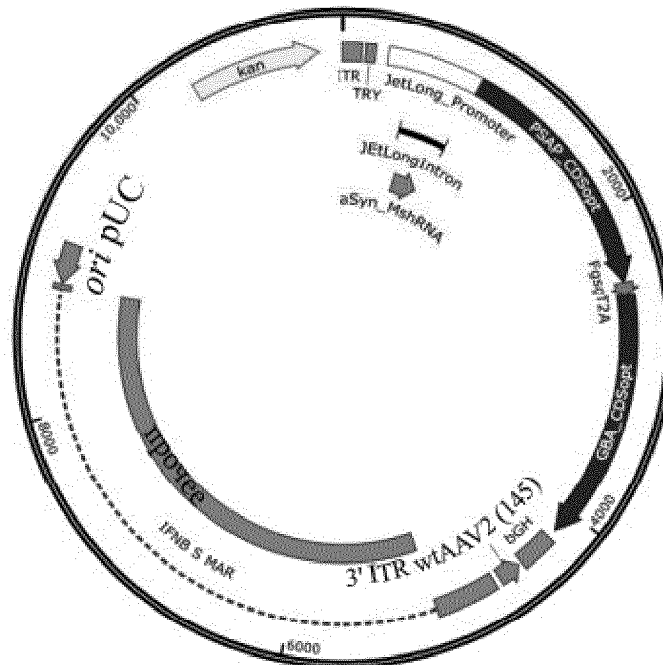


Фиг. 49



updated_PrevailVector_FT4_JetLong_GBA1_FgsgT2A_GALC_SyntheticpolyA_4394nt_aligned
11,311 П.О.

Фиг. 50

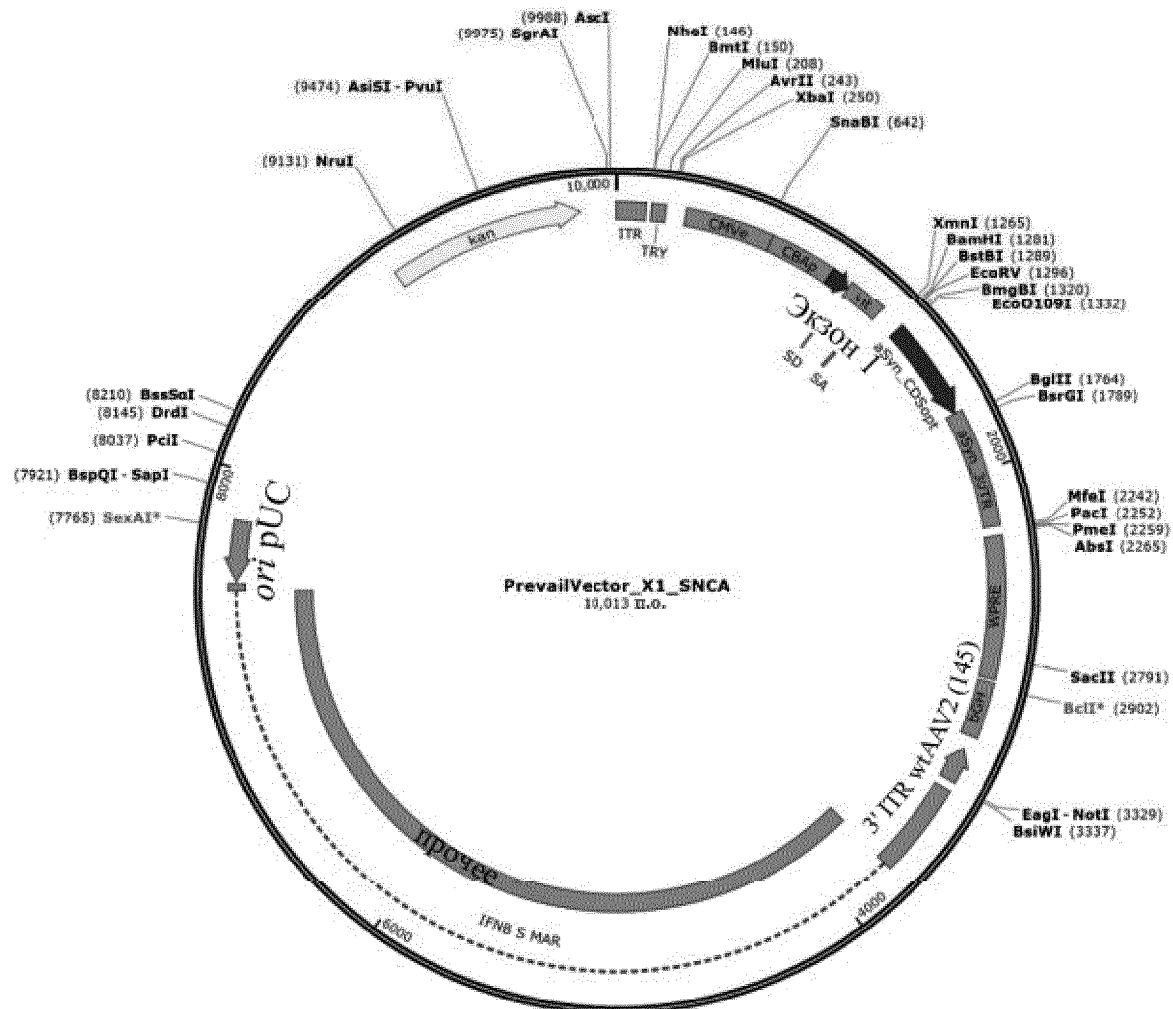


updated_PrevailVector_LT2s_JetLong_mRNAiaSYn_PSAP-FgsgT2A-GBA1_bGH_4374nt_aligned
11,292 nt

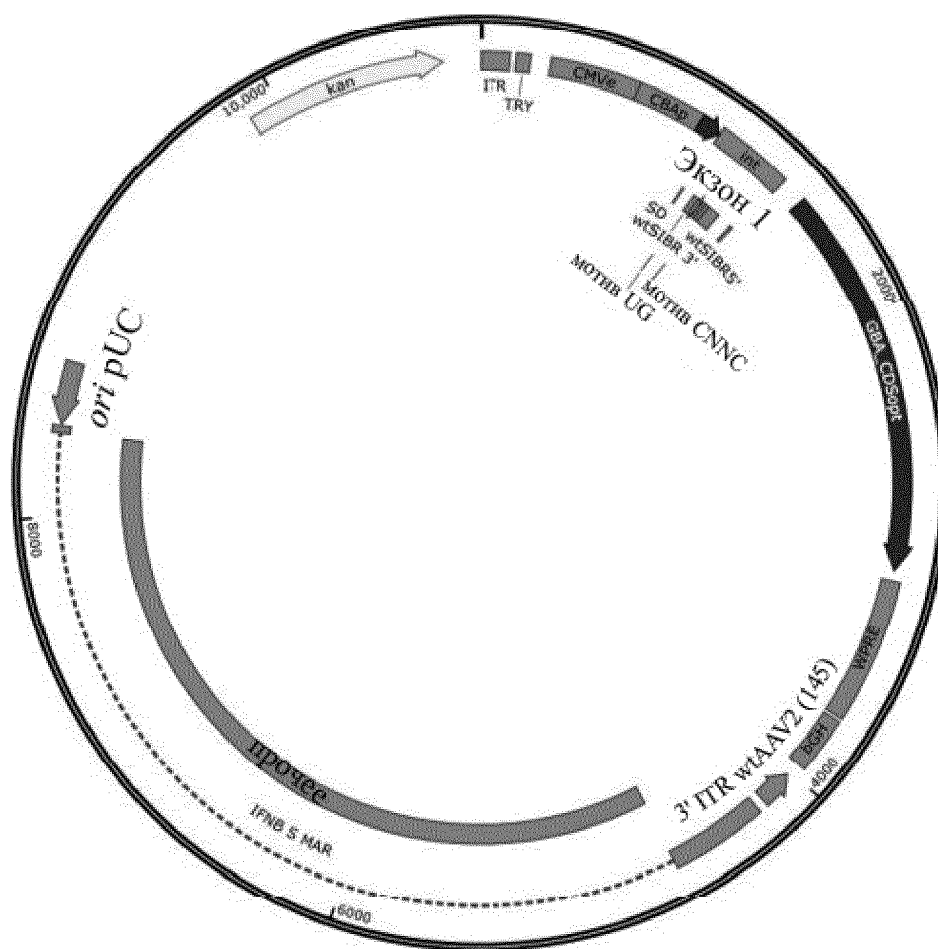
Фиг. 51



Фиг. 52

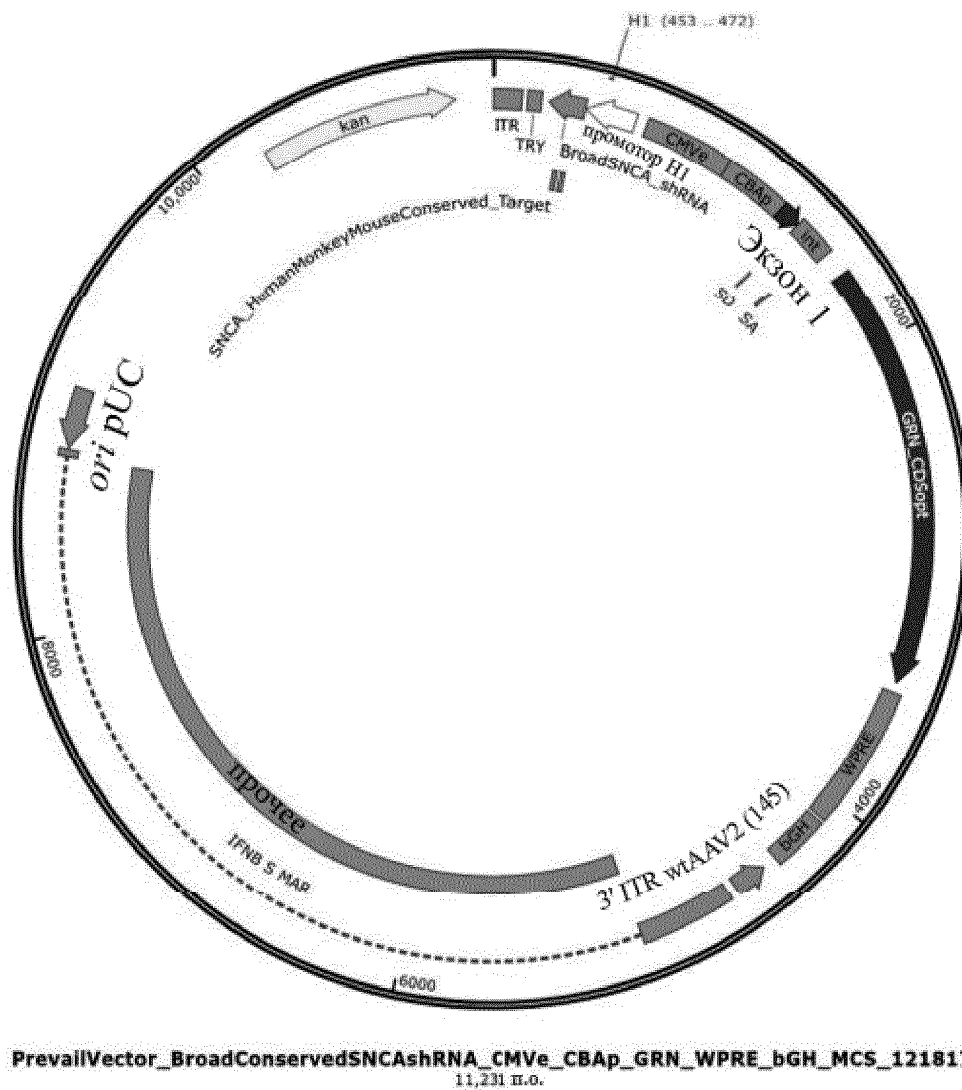


Фиг. 53

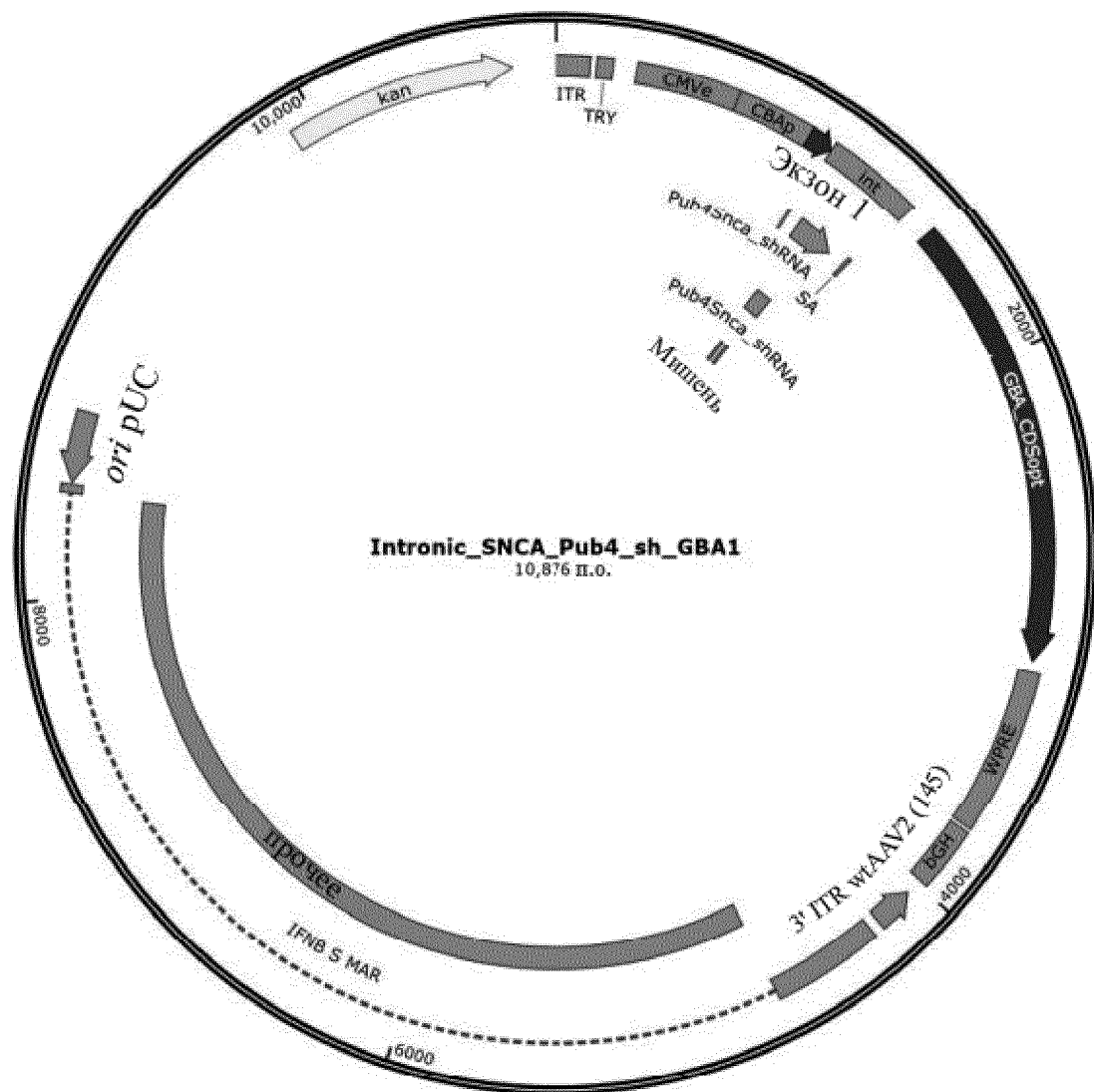


Intronic_eSIBR_Columbia_aSyn_CMVe_CBAP_GBA1_WPRE_bGH
10,845 п.о.

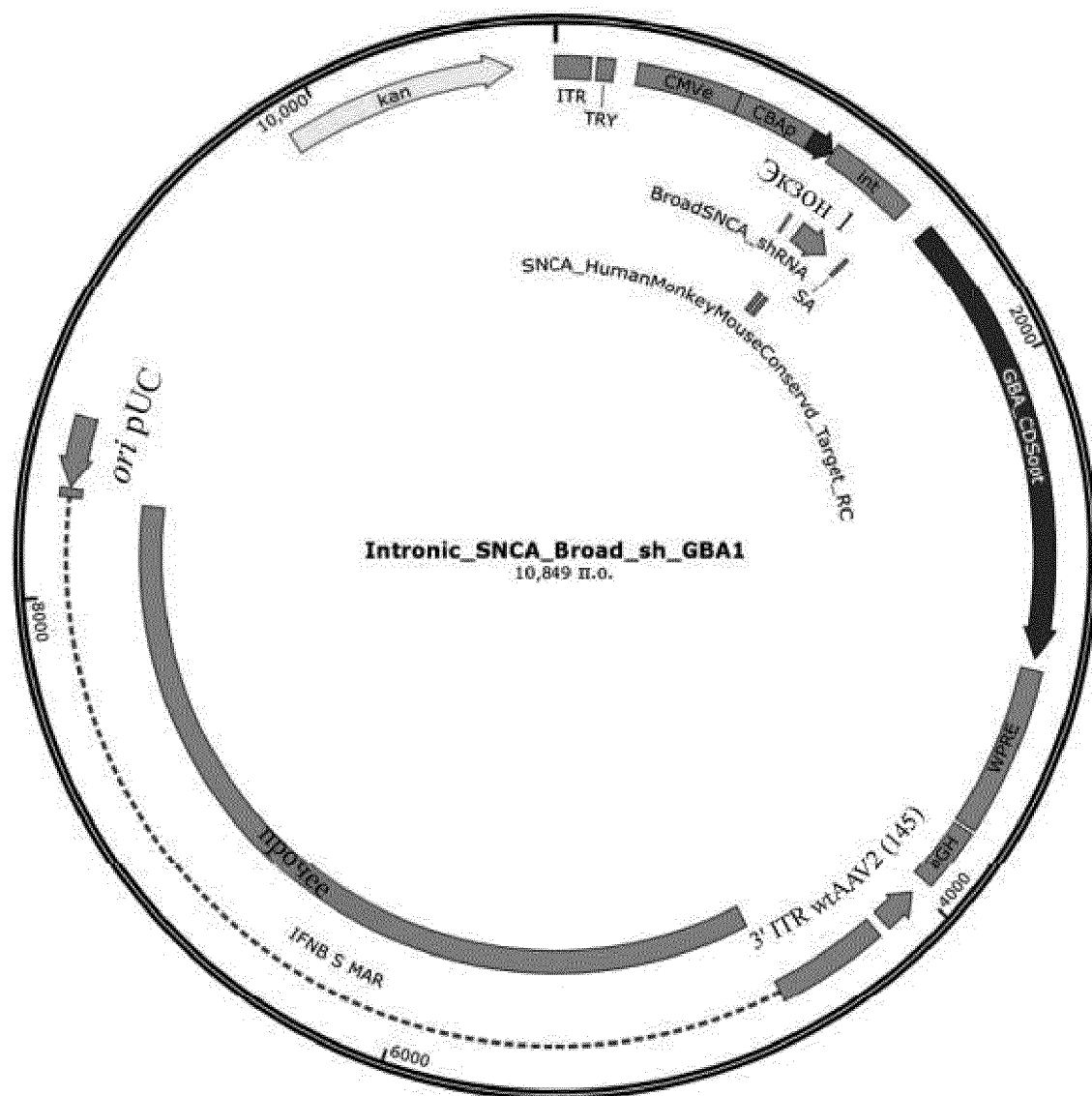
Фиг. 54



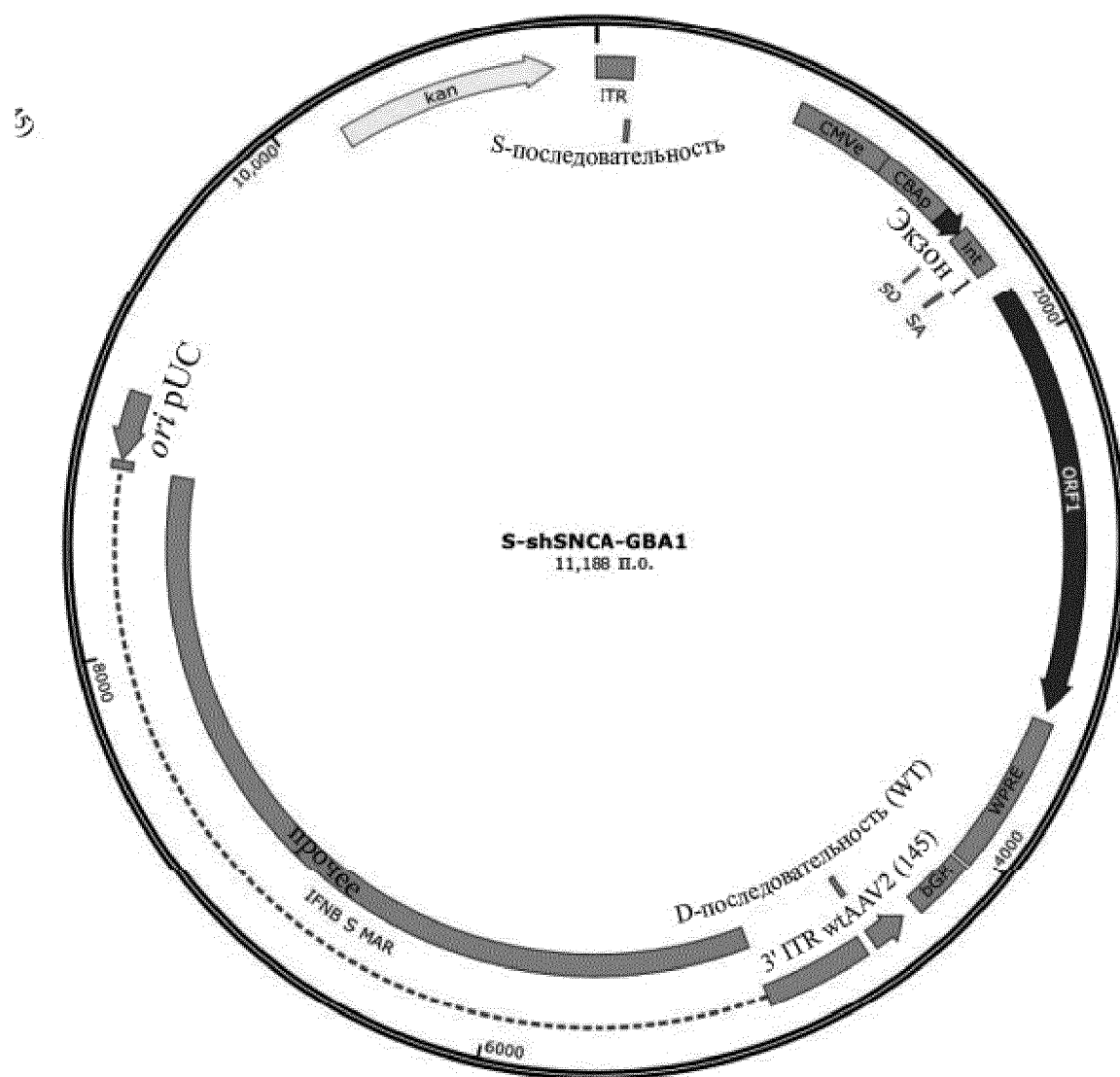
Фиг. 55



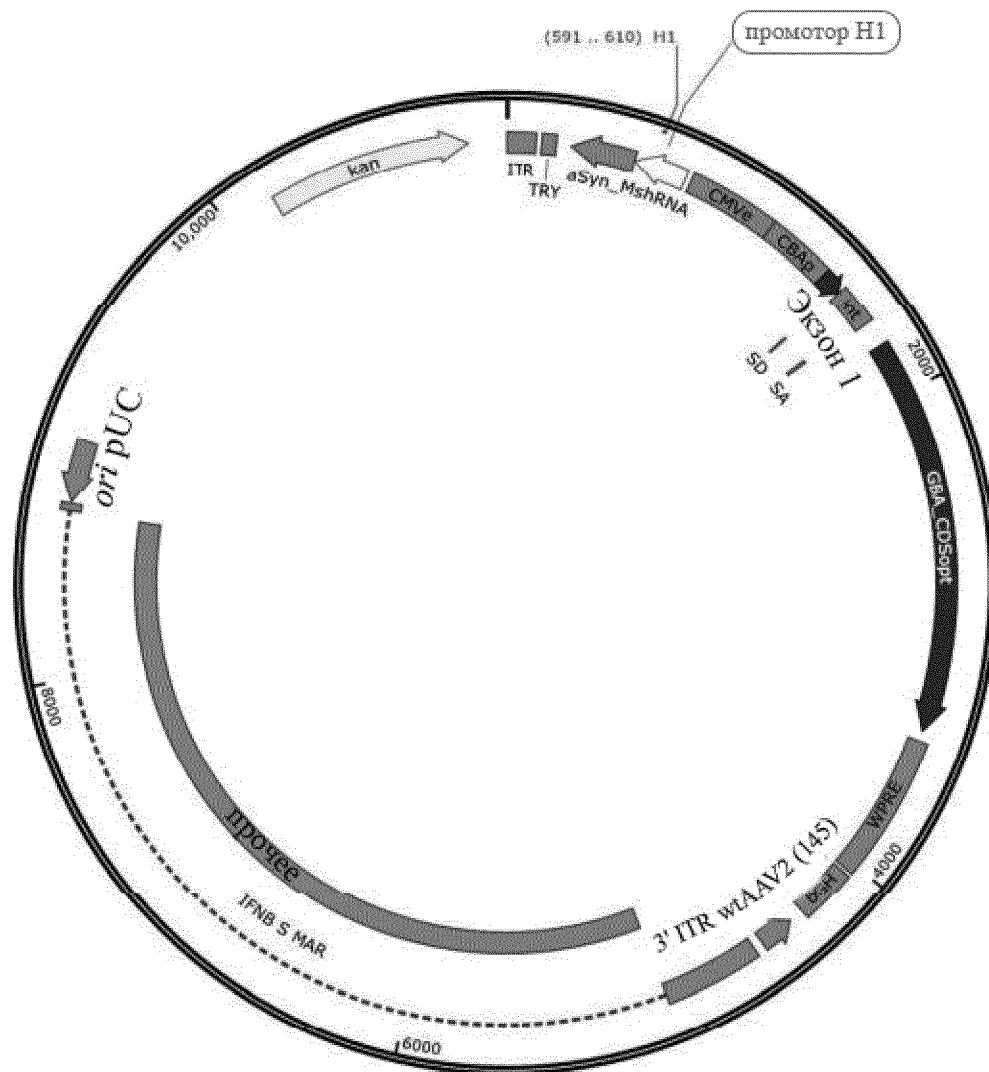
Фиг. 56



Фиг. 57

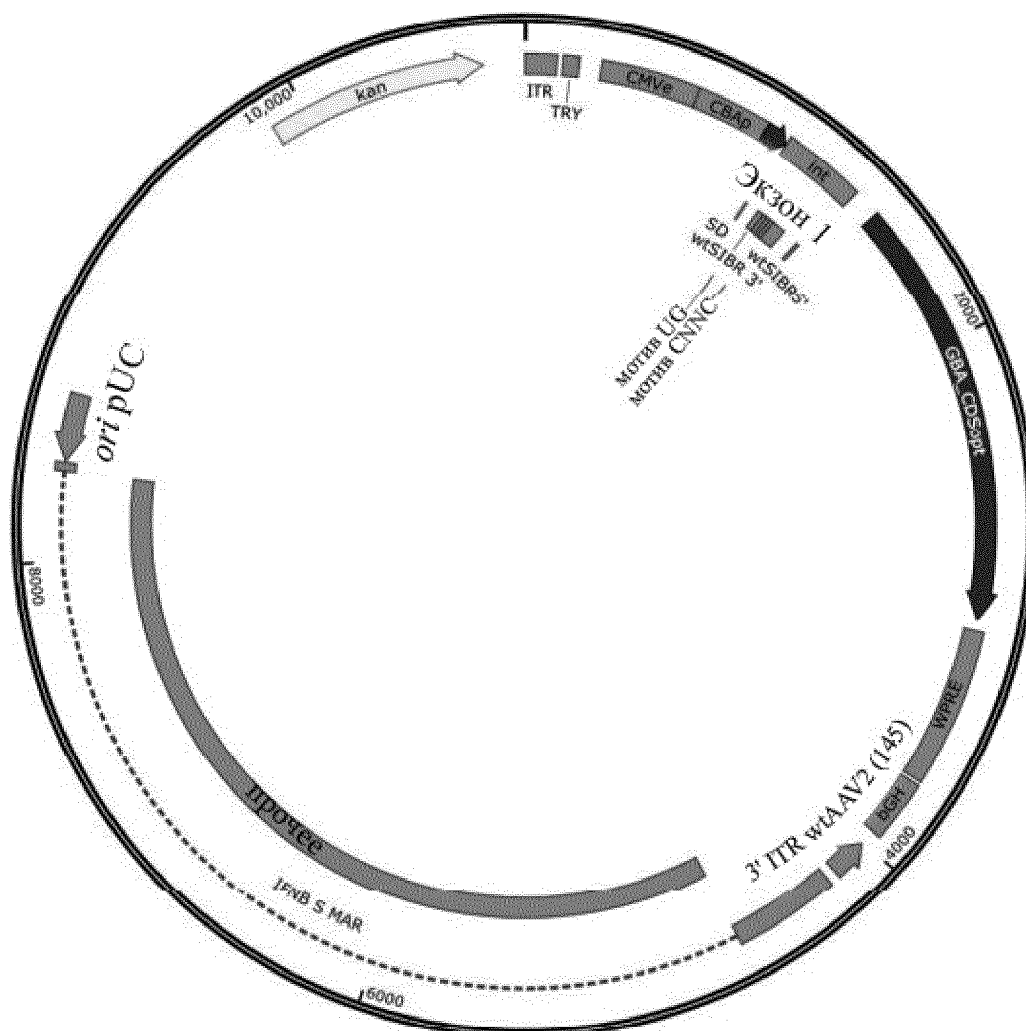


Фиг. 58



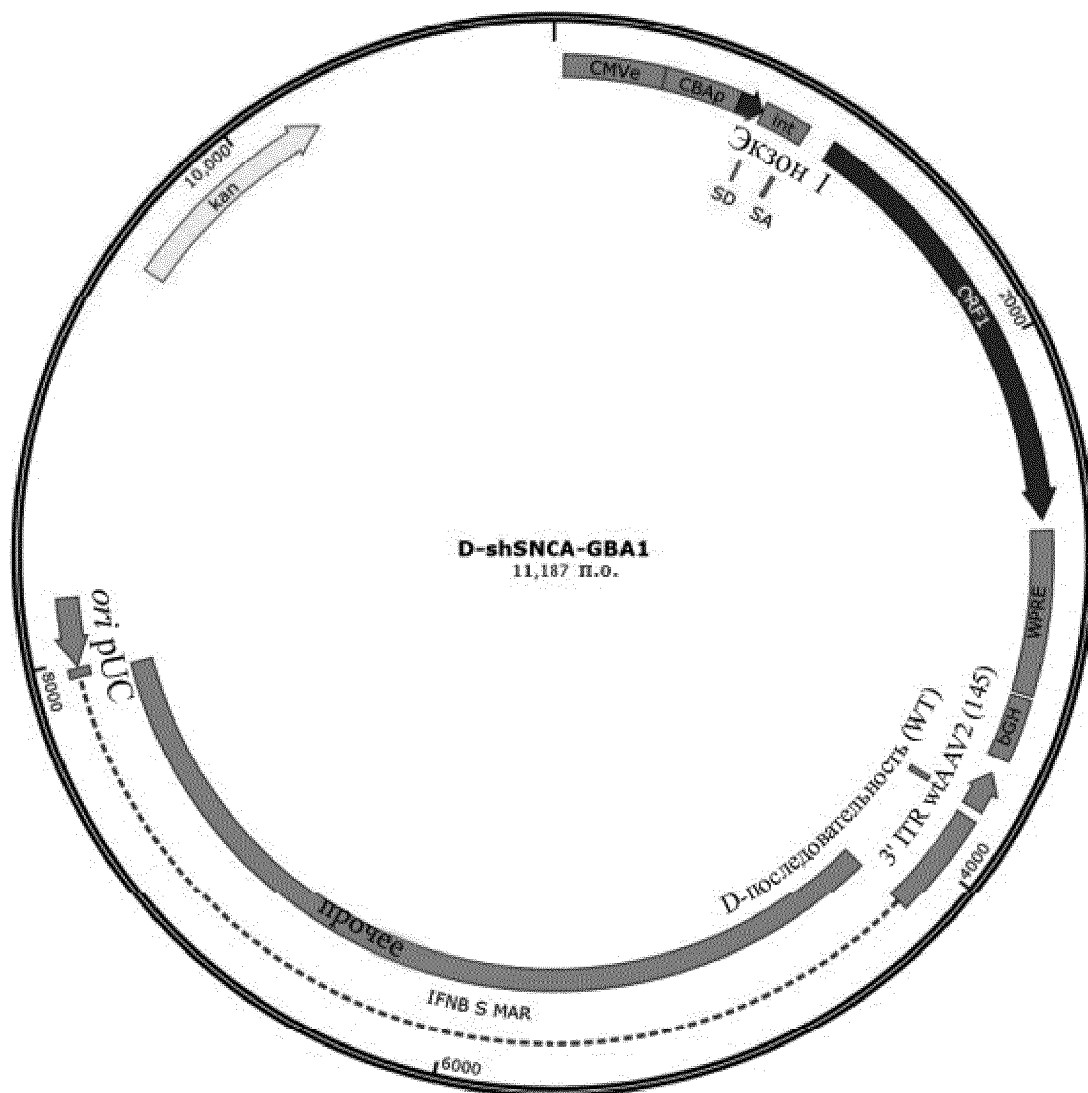
PrevailVector_OH_H1_aSynshRNA_CMVe_CBAp_GBA1_WPRE_bGH_4218nt
11,174 п.о.

Фиг. 59

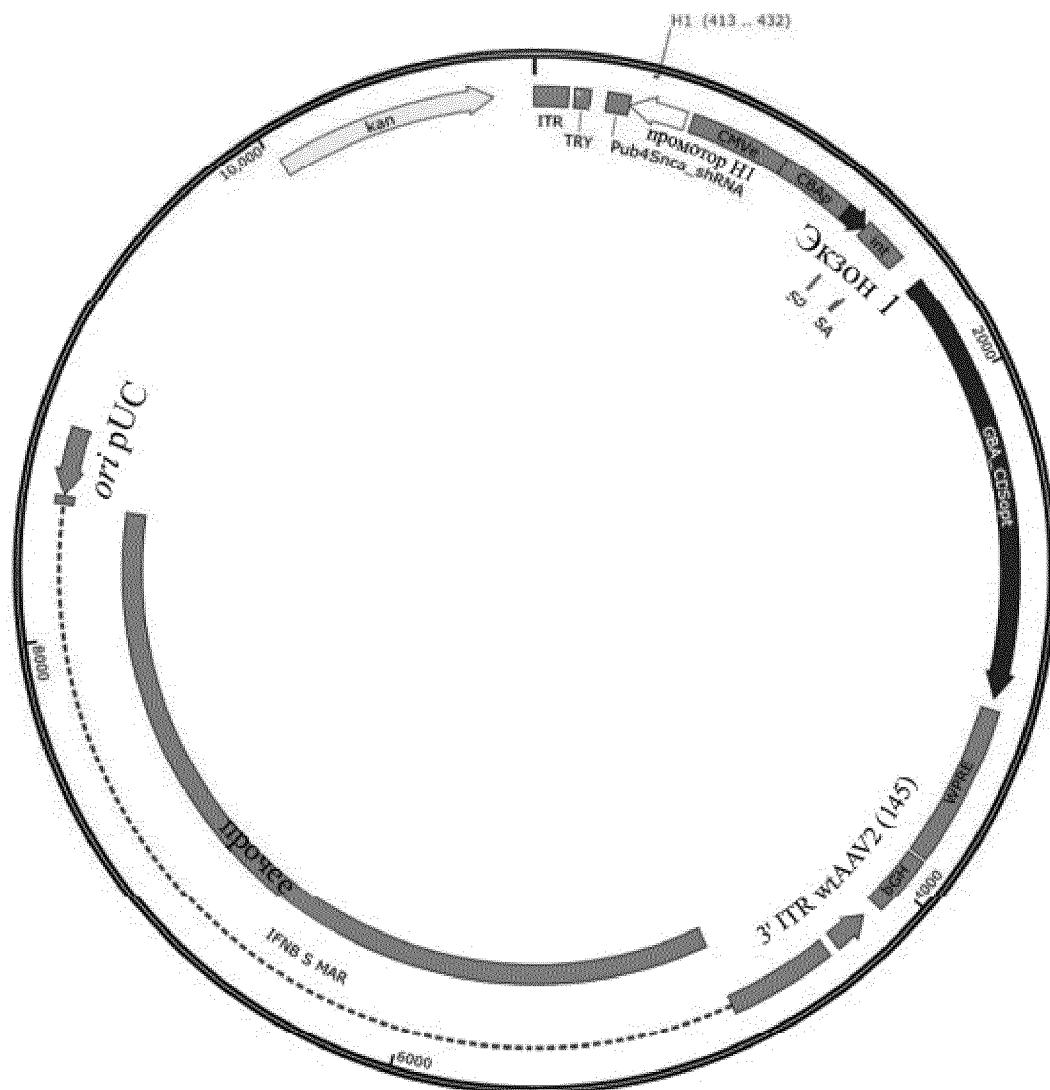


Intronic_eSIBR_Pub_aSyn_CMVe_CBAp_GBA1_WPRE_bGH
10,841 П.О.

Фиг. 60



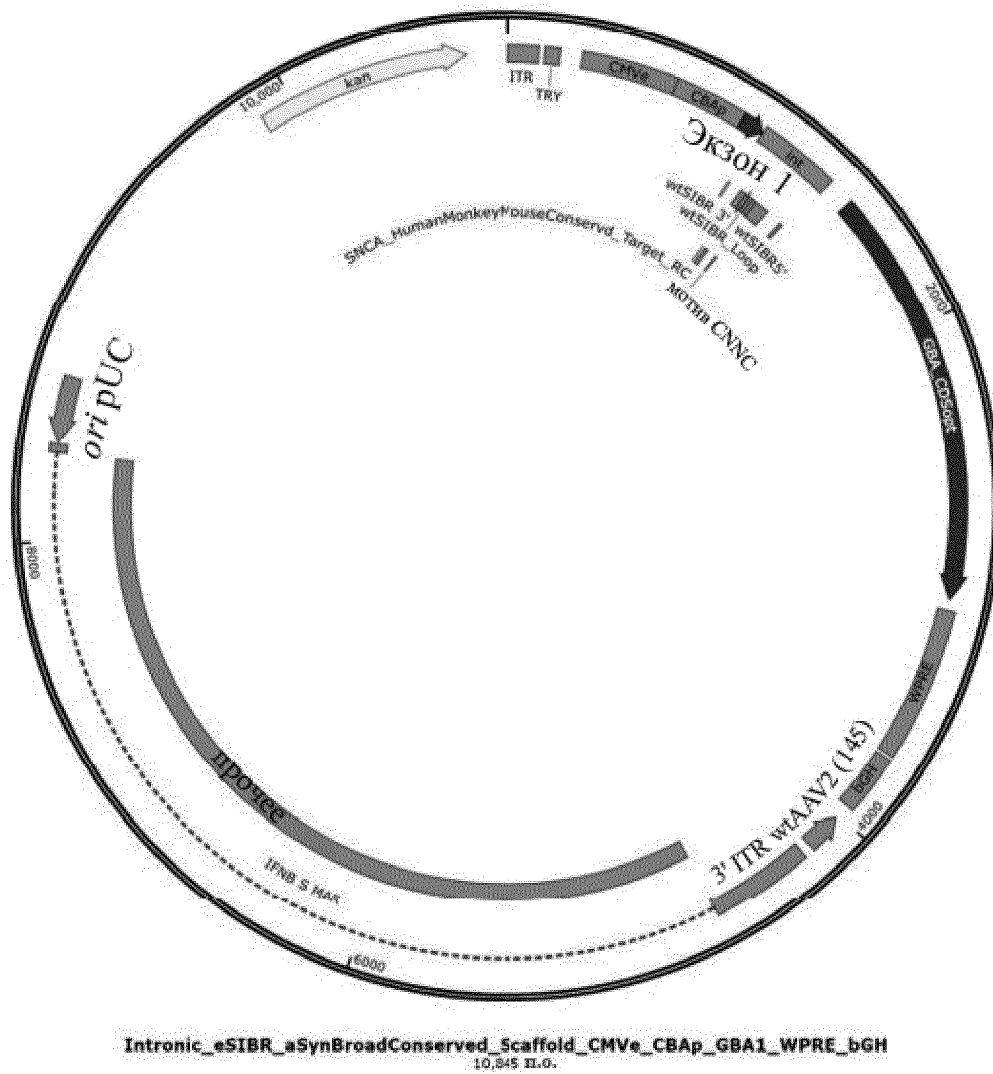
Фиг. 61



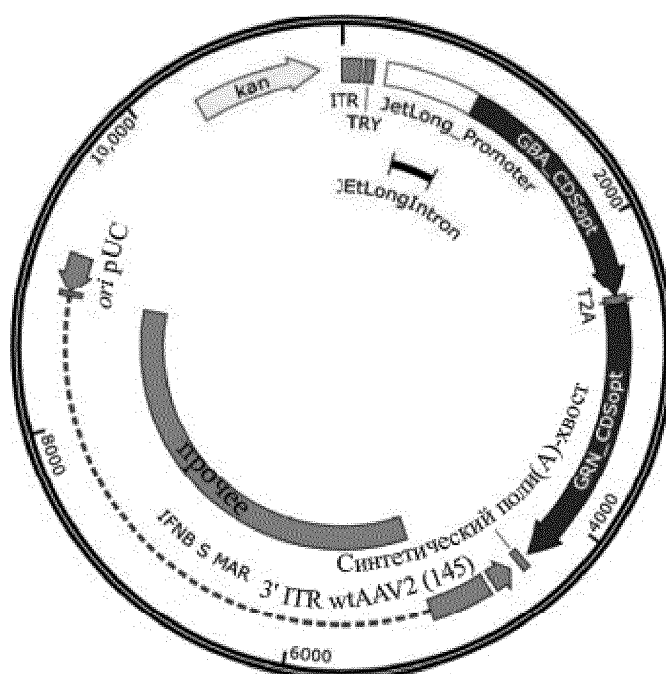
PrevailVector_0_H1_aSynPubshRNA4_CMVe_CBAp_GBA1_WPRE_bGH_4040nt

10,596 п.о.

Фиг. 62

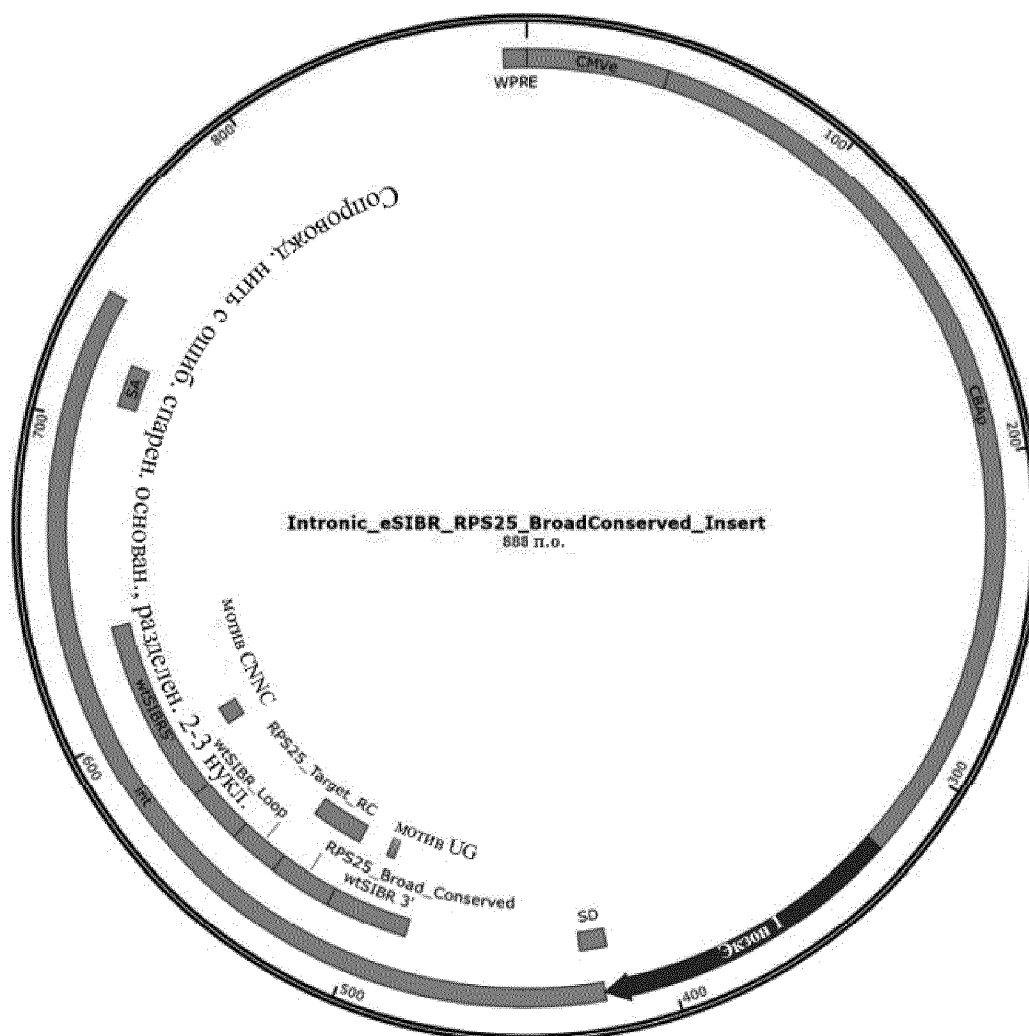


Фиг. 63

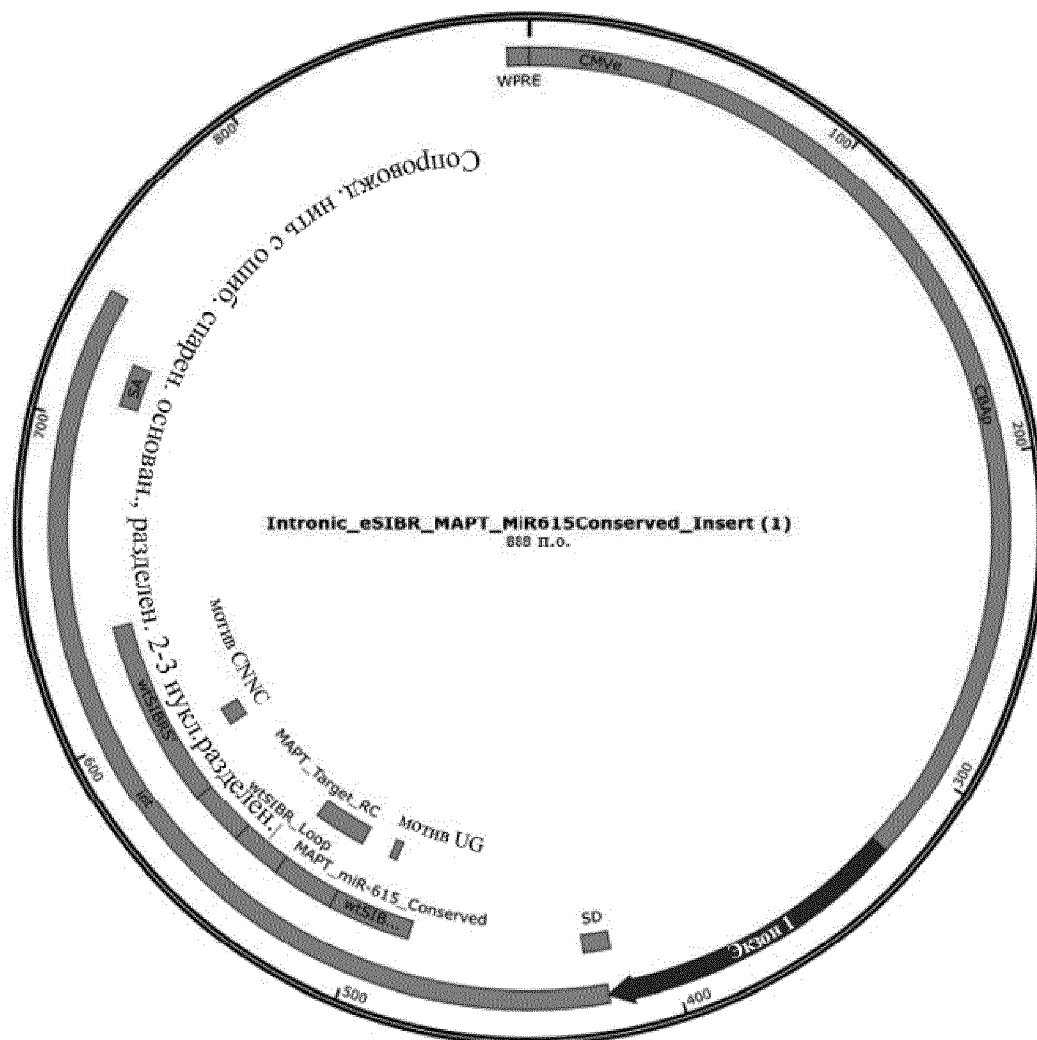


PrevailVector_FT3t_JetLong_mRNAiMEM106B_GBA1_T2S_GRN_SyntheticpolyA_4364nt
11,320 п.о.

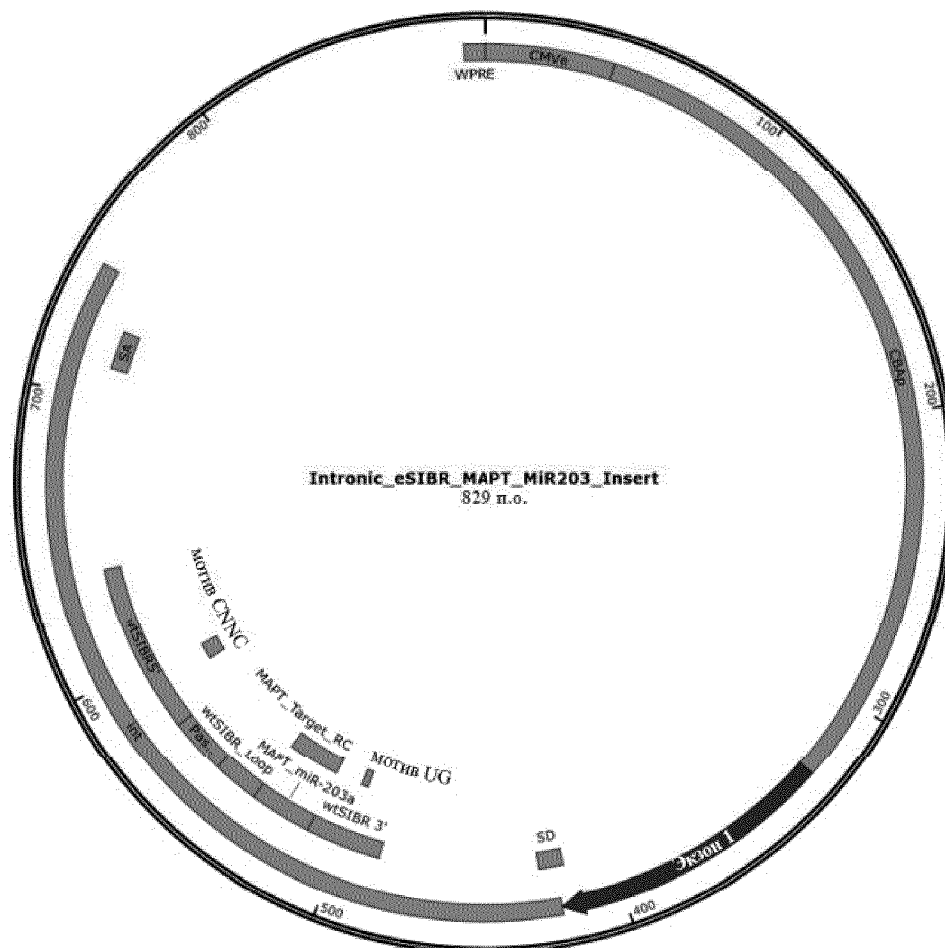
Фиг. 64



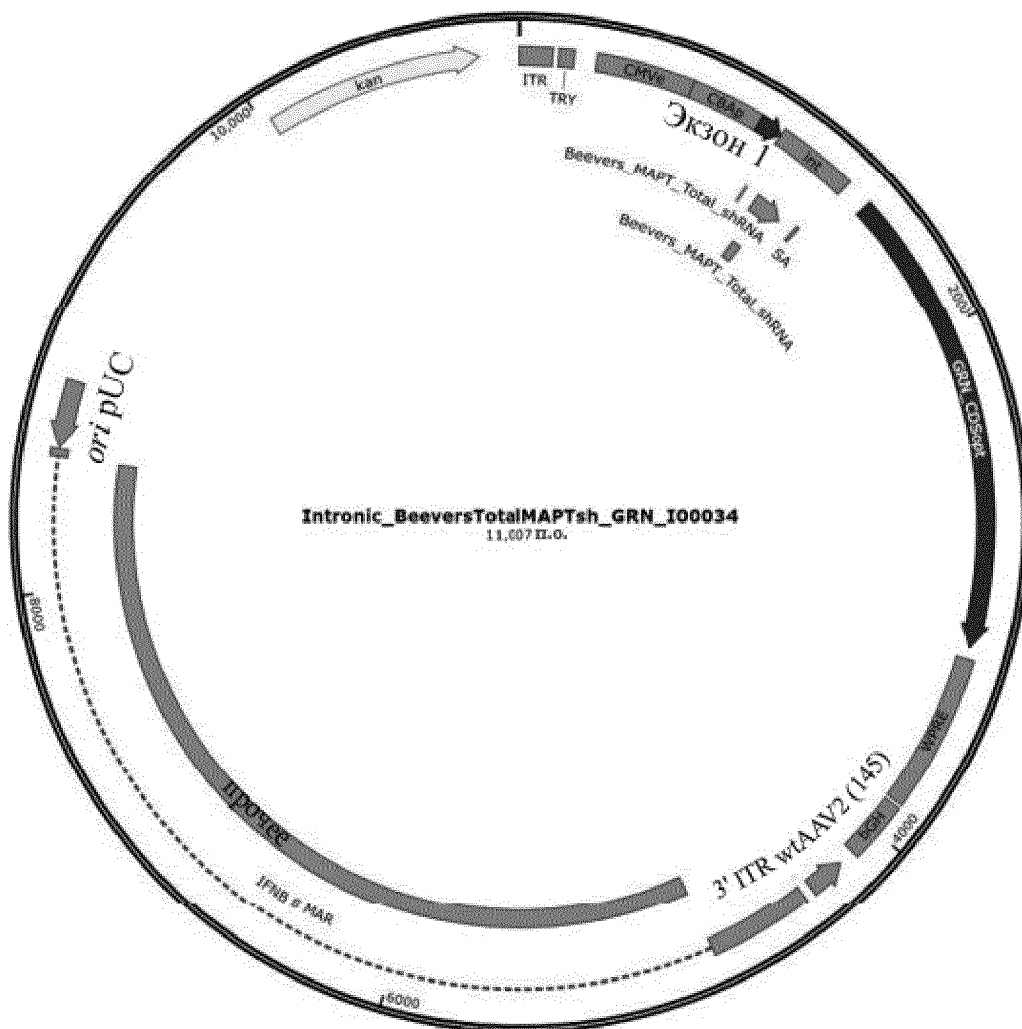
Фиг. 66



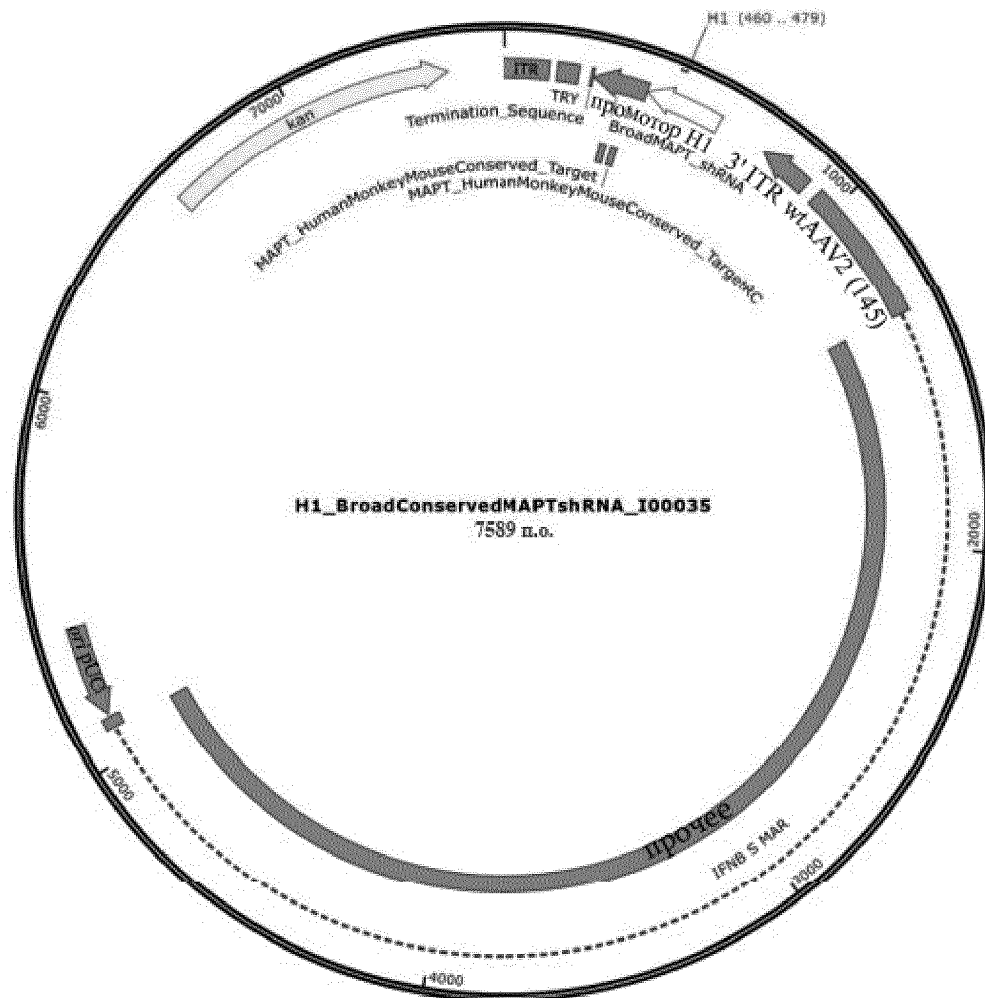
Фиг. 67



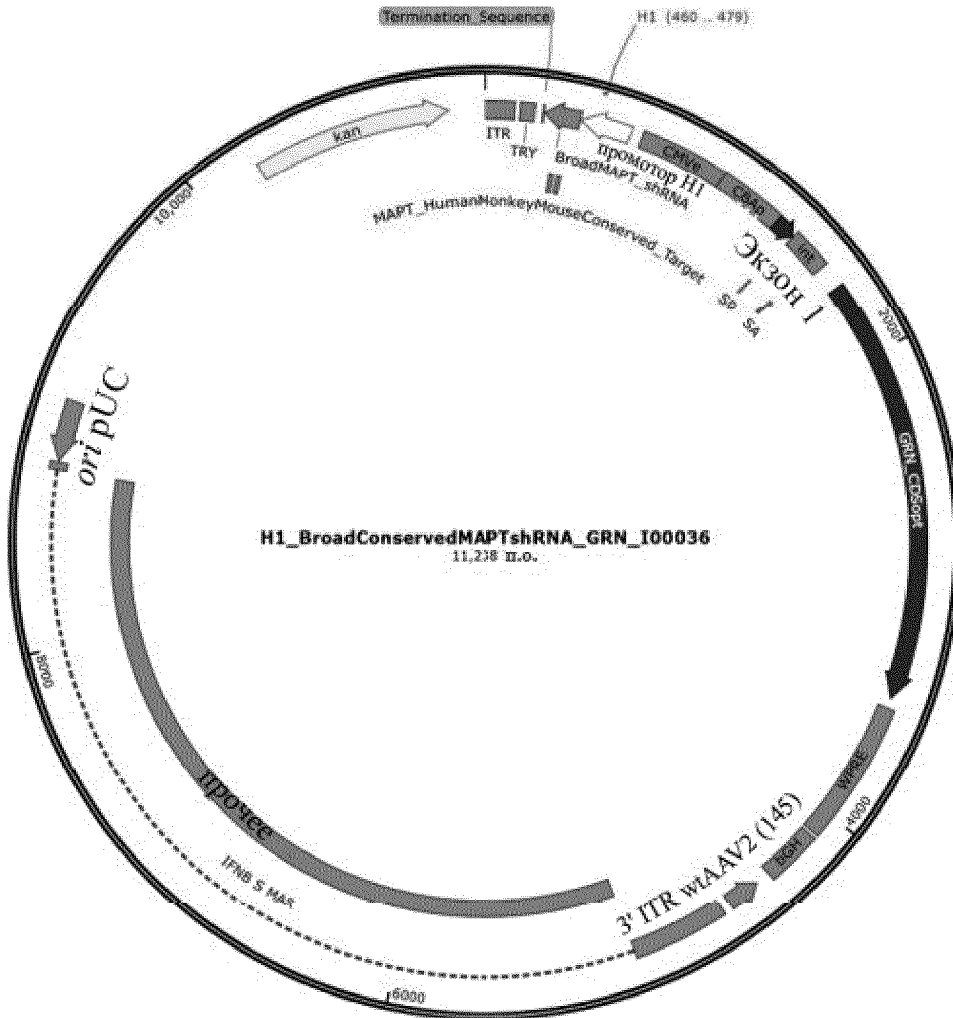
Фиг. 68



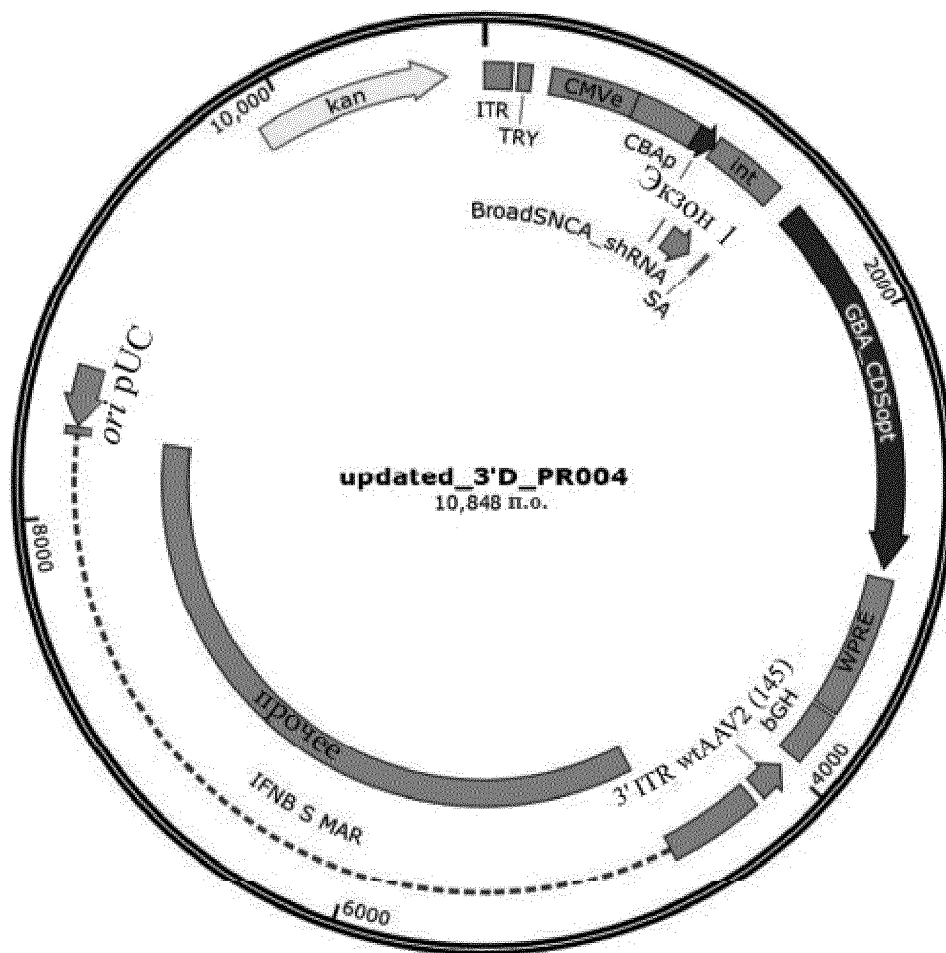
Фиг. 69



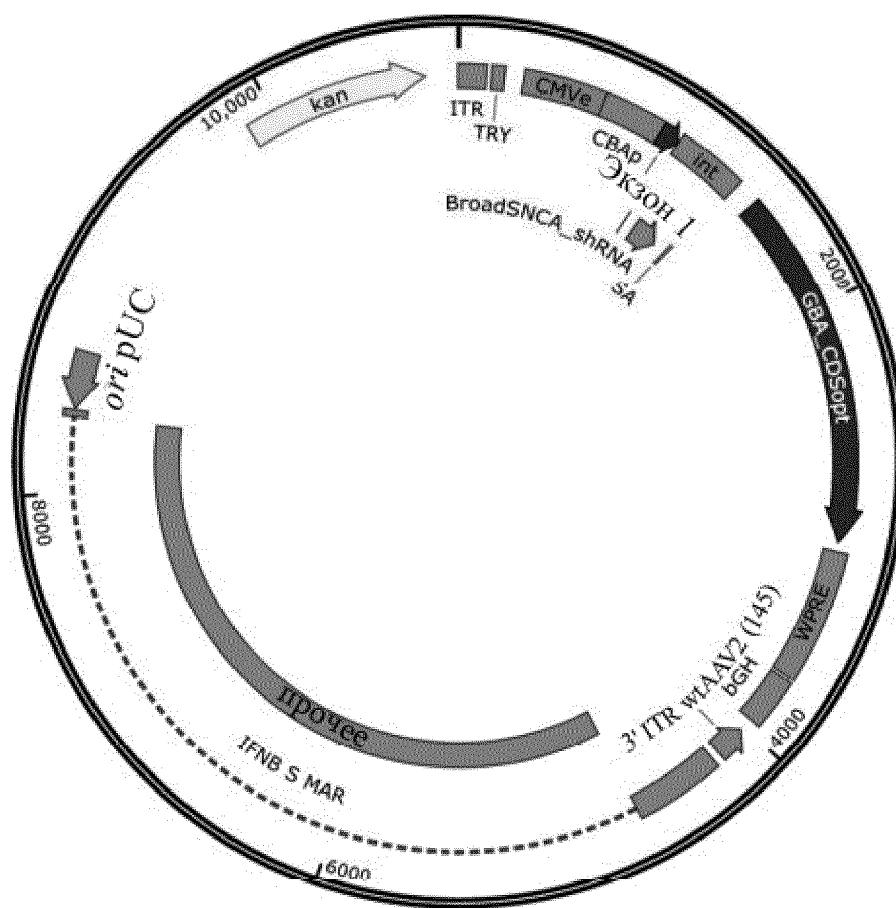
Фиг. 70



Фиг. 71

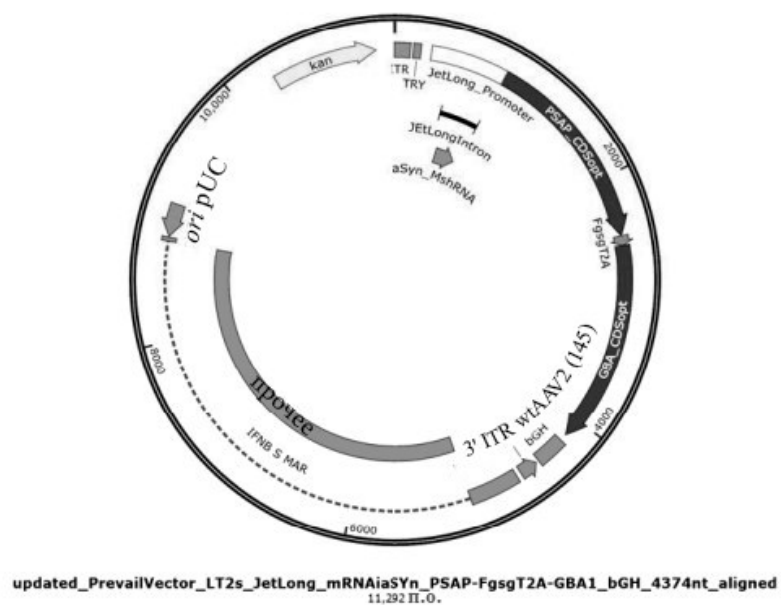


Фиг. 72



updated_Intronic_SNCA_Broad_sh_GBA1_aligned
10,848 п.о.

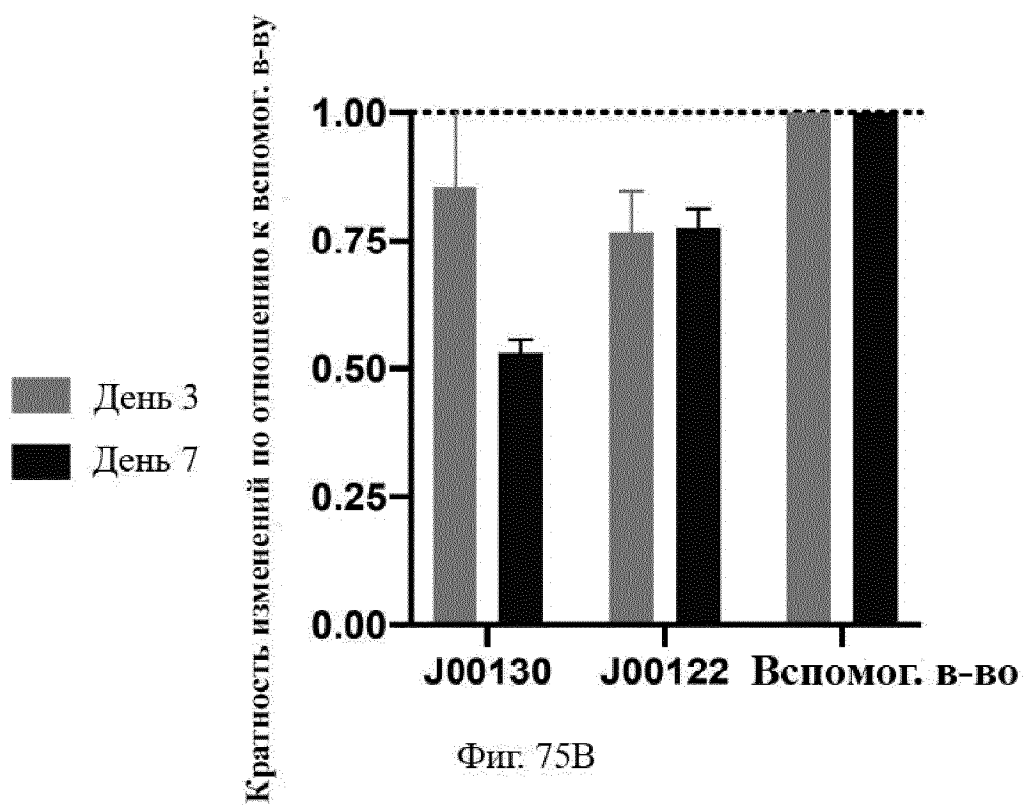
Фиг. 73



Фиг.74



Фиг. 75А



Вектор	Серия вируса
Intronic_eSIBR_MAPT_MiR615 , консервативный	J00130
Intronic_eSIBR_MAPT_MiR615 , консервативный	J00122

Фиг. 75С