

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291881** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.12

(22) Дата подачи заявки
2020.12.07

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) СТАБИЛИЗАЦИЯ РЕТРОМЕРА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ДРУГИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ

(31) **62/943,999; 63/074,578**

(32) **2019.12.05; 2020.09.04**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/063627**

(87) **WO 2021/113824 2021.06.10**

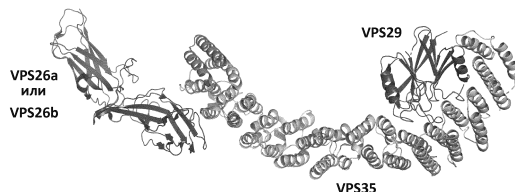
(71) Заявитель:
**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ КОЛАМБИЯ
ЮНИВЕРСИТИ ИН ДЗЕ
СИТИ ОФ НЬЮ ЙОРК;
КОРНЕЛЛ ЮНИВЕРСИТИ (US);
МЕИРЭДжТиЭкс ЮКей П ЛИМИТЕД
(GB)**

(72) Изобретатель:
**Смолл Скотт Э., Петско Грегори,
Куреша Ясер Х., Уоксел Сэмьюэл Д.,
Форбс Александрия, Кокс Ребекка
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам и композициям для увеличения уровня и стабилизации ретромера для лечения и/или профилактики болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных нарушений. Кроме того, настоящее изобретение относится к терапии на основе аденовирусного вектора для лечения болезни Альцгеймера (AD) и других нейродегенеративных состояний, таких как болезнь Паркинсона (PD), нейрональный цероидный липофусциноз (NCL) и трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (TSE или прионное заболевание), множественная системная атрофия (MSA), синдром Дауна и наследственная спастическая параплегия, так же как таупатии, такие как прогрессирующий супрануклеарный паралич (PSP), лобно-височная лобарная деменция, связанная с хромосомой 17q21-22, и ее подтипы (FTLD-17/FTLD-Tau), болезнь телец Леви (LBD), боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височная дегенерация (FTD), ALS-FTD и хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ).

Комплекс кора ретромера



A1

202291881

202291881

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574994EA/23

СТАБИЛИЗАЦИЯ РЕТРОМЕРА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ДРУГИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет временных заявок на патент США No. 62/943999, поданной 5 декабря 2019 г., и 63/074578, поданной 4 сентября 2020 г., полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для увеличения уровня и стабилизации ретромера для лечения и/или профилактики болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных нарушений.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Болезнь Альцгеймера (AD) была охарактеризована как заболевание неправильно свернутых белков и нейровоспаления. Однако терапевтические средства против AD, нацеленные на амилоид, tau, ингибиторы холинэстеразы, противовоспалительные соединения и альтернативные способы терапии, такие как мемантин и пищевые добавки, потерпели неудачу, и заболевание остается значительным источником смертности, заболеваемости и финансовой нагрузки. Неудачные клинические исследования AD побудила исследователей дополнительно исследовать этиологическую обусловленность заболевания. В многочисленных доклинических исследованиях проверялись новые ассоциированные с AD гены, внутриклеточные пути гомеостаза белка, взаимодействие нейронов с их микроокружением и с глиальными клетками. Несколько исследований все еще продолжаются.

Недавние открытия в области генетики и клеточной биологии при болезни Альцгеймера подразумевают «эндосомальный транспорт», как играющий центральную роль в патофизиологии заболевания. Современная литература поддерживает, что четыре класса генов вовлечены в AD. Эти классы генов представляют собой: 1) эндосомальный транспорт; 2) метаболизм холестерина; 3) иммунный ответ; и 4) процессинг белка-предшественника амилоида (APP). Все четыре из этих классов генов связаны с дефектами эндосомального транспорта; напрямую или опосредованно. Дефекты эндосомального транспорта также были вовлечены в другие нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона (PD), трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (TSE или прионные заболевания) и нейрональный цероидный липофусциноз (NCL).

Ретромер представляет собой белковый комплекс, ассоциированный с эндосомальными органеллами, и контролирует транспорт конкретных клеточных молекул содержимого внутри трубчатых везикулярных носителей в сеть транс-Гольджи. Дефекты этого транспорта были связаны с различными нейродегенеративными заболеваниями (Small and Petsko 2015; Anderson et al. 2014). Нейродегенерация является обобщающим термином для прогрессирующей потери структуры или функции нейронов, включая

гибель нейронов. Многие нейродегенеративные заболевания, включая боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Паркинсона (PD), болезнь Альцгеймера (AD) и хорею Хантингтона, возникают в результате нейродегенеративных процессов.

Описано использование малых молекул для улучшения функции комплекса ретромера. Однако, разработка успешного лекарственного средства, которое может проявлять положительную фармакологическую динамику *in vivo*, будет сложной и может занять много лет. Существует неотложная необходимость в эффективных видах лечения этих нейродегенеративных заболеваний, и в настоящее время не существует видов терапии на основе генов, которые могут обеспечивать длительные преимущества.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, которые можно использовать для лечения субъекта (например, субъекта-млекопитающего, такого как субъект-человек), который имеет, или подвержен риску развития нейродегенеративного заболевания, включая, но без ограничения, болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона (PD), нейрональный цероидный липофусциноз (NCL), трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (TSE или прионное заболевание), синдром Дауна, наследственную спастическую параплегию (HSP) и множественную системную атрофию (MSA), так же как таупатии, такие как прогрессирующий супрануклеарный паралич (PSP), лобно-височная лобарная деменция, связанная с хромосомой 17q21-22, и ее подтипы (FTLD-17/FTLD-Tau), болезнь телец Леви (LBD), боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височная дегенерация (FTD), ALS-FTD и хроническая травматическая энцефалопатия (CTE).

С использованием композиций и способов по настоящему изобретению, субъекту (например, субъекту-млекопитающему, такому как субъект-человек), который имеет или подвержен риску развития заболевания, описанного выше, можно вводить композицию, содержащую трансген, кодирующий один или более из белков ретромера, описанных в настоящем описании. Композиция может содержать вектор, например, вирусный вектор, такой как аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят вторую композицию, содержащую трансген, кодирующий один или более из белков ретромера, описанных в настоящем описании. Вторая композиция может содержать вектор, например, вирусный вектор, такой как AAV вектор. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят третью композицию, содержащую трансген, кодирующий один или более из белков ретромера, описанных в настоящем описании. Третья композиция может содержать вектор, например, вирусный вектор, такой как AAV вектор.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или VPS26a, и/или VPS26b. В вариантах осуществления, трансген кодирует VPS35. В вариантах осуществления, трансген кодирует VPS26a и/или VPS26b. В вариантах осуществления, трансген кодирует VPS35 и либо VPS26a, либо VPS26b. В вариантах осуществления, трансген кодирует

VPS35 и VPS26a. В вариантах осуществления, трансген кодирует VPS35 и VPS26b. В вариантах осуществления, трансген кодирует VPS26a и VPS26b. В других аспектах, композиция содержит два трансгена, где один из трансгенов кодирует VPS35, и другой кодирует VPS26a или VPS26b. В других аспектах, композиция содержит два трансгена, где один из трансгенов кодирует VPS26a, и другой кодирует VPS26b. В других аспектах композиция содержит три трансгена, где один из трансгенов кодирует VPS35, другой кодирует VPS26a, и другой кодирует VPS26b.

В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует коровый белок ретромера VPS35. В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS35 белок является человеческим. Коровый белок ретромера VPS35, кодируемый трансгеном, может иметь аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 85% идентичной аминокислотной последовательности VPS35 (например, аминокислотную последовательность, которая является на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности VPS35). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS35, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности VPS35 (например, аминокислотную последовательность, которая является на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности VPS35). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS35, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 95% идентичной аминокислотной последовательности VPS35 (например, аминокислотную последовательность, которая является на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной аминокислотной последовательности VPS35). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS35, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от VPS35 посредством одной или более замен, вставок и/или делеций аминокислот, например, посредством от 1 до 10, 1-15, 1-20, 1-25, или более, замен, вставок и/или делеций аминокислот (например, посредством 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более консервативных аминокислотных замен). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS35, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от VPS35 посредством одной или более консервативных аминокислотных замен, например, посредством от 1 до 10, 1-15, 1-20, 1-25 или более консервативных аминокислотных замен (например, посредством 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более консервативных аминокислотных замен).

В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, содержит человеческий VPS35 (ID гена 55737). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, имеет

последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35 (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 85% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35 (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35 (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 95% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35 (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, является оптимизированным по кодонному составу.

В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует коровый белок ретромера VPS26a. В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26a является человеческим. Коровый белок ретромера VPS26a, кодируемый трансгеном, может иметь аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 85% идентичной аминокислотной последовательности VPS26a (например, аминокислотную последовательность, которая является на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной аминокислотной последовательности VPS26a). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26a, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности VPS26a (например, аминокислотную последовательность, которая является на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной аминокислотной последовательности VPS26a). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26a, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 95%

идентичной аминокислотной последовательности VPS26a (например, аминокислотную последовательность, которая является на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной аминокислотной последовательности VPS26a). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26a, кодируемый трансеном, имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от VPS26a посредством одной или более замен, вставок и/или делеций аминокислот, например, посредством от 1 до 10, 1-15, 1-20, 1-25, или более, замен, вставок и/или делеций аминокислот (например, посредством 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более консервативных аминокислотных замен). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26a имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от VPS26a посредством одной или более консервативных аминокислотных замен, например, посредством от 1 до 10, 1-15, 1-20, 1-25 или более консервативных аминокислотных замен (например, посредством 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более консервативных аминокислотных замен).

В дополнительных вариантах осуществления, трансен, кодирующий коровый белок ретромера VPS26a, содержит человеческий VPS26a (ID гена 9559). В некоторых вариантах осуществления, трансен, кодирующий коровый белок ретромера VPS26a, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a). В некоторых вариантах осуществления, трансен, кодирующий коровый белок ретромера VPS26a, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 85% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a). В некоторых вариантах осуществления, трансен, кодирующий коровый белок ретромера VPS26a, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a). В некоторых вариантах осуществления, трансен, кодирующий коровый белок ретромера VPS26a, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 95% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a). В некоторых вариантах

осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS26a, является оптимизированным по кодонному составу.

В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует коровый белок ретромера VPS26b. В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26b является человеческим. Коровый белок ретромера VPS26b, кодируемый трансгеном, может иметь аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 85% идентичной аминокислотной последовательности VPS26b (например, аминокислотную последовательность, которая является на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной аминокислотной последовательности VPS26b). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26b, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности VPS26b (например, аминокислотную последовательность, которая является на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности VPS26b). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26b, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 95% идентичной аминокислотной последовательности VPS26b (например, аминокислотную последовательность, которая является на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной аминокислотной последовательности VPS26b). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26b, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от VPS26b посредством одной или более замен, вставок и/или делеций аминокислот, например, посредством от 1 до 10, 1-15, 1-20, 1-25 или более замен, вставок и/или делеций аминокислот (например, посредством 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более консервативных аминокислотных замен). В некоторых вариантах осуществления, коровый белок ретромера VPS26b, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая отличается от VPS26b посредством одной или более консервативных аминокислотных замен, например, посредством от 1 до 10, 1-15, 1-20, 1-25 или более консервативных аминокислотных замен (например, посредством 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более консервативных аминокислотных замен).

В дополнительных вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS26b, содержит человеческий VPS26b (ID гена 112936). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS26b, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 70% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной

последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS26b, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 85% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS26b, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 90% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS26b, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере на 95% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b). В некоторых вариантах осуществления, трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS26b, является оптимизированным по кодонному составу.

В некоторых вариантах осуществления предшествующего аспекта, композиция содержит вектор, такой как вирусный вектор. Вирусный вектор может представлять собой, например, AAV вектор, аденовирусный вектор, лентивирусный вектор, ретровирусный вектор, поксвирусный вектор, бакуловирусный вектор, вектор на основе вируса простого герпеса, вектор на основе вируса осповакцины или синтетический вирусный вектор (например, химерный вирус, мозаичный вирус или псевдотипированный вирус и/или вирус, содержащий чужеродный белок, синтетический полимер, наночастицу или малую молекулу).

В некоторых вариантах осуществления предшествующего аспекта, вирусный вектор представляет собой AAV вектор, такой как AAV1 (т.е., AAV, содержащий инвертированные концевые повторы (ITR) AAV1 и капсидные белки AAV1), AAV2 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV2 и капсидные белки AAV2), AAV3 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV3 и капсидные белки AAV3), AAV4 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV4 и капсидные белки AAV4), AAV5 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV5 и капсидные белки AAV5), AAV6 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV6 и капсидные белки AAV6), AAV7 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV7 и капсидные белки AAV7), AAV8 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV8 и капсидные белки AAV8), AAV9 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV9 и капсидные белки AAV9), AAVrh74 (т.е., AAV, содержащий ITR AAVrh74 и капсидные белки AAVrh74), AAVrh.8 (т.е., AAV, содержащий ITR AAVrh.8 и капсидные белки

AAVrh.8) или AAVrh.10 (т.е., AAV, содержащий ITR AAVrh.10 и капсидные белки AAVrh.10).

В некоторых вариантах осуществления предшествующего аспекта, вирусный вектор представляет собой псевдотипированный AAV вектор, содержащий ITR из одного серотипа AAV и капсидные белки из другого серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления, псевдотипированный AAV представляет собой AAV2/9 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV2 и капсидные белки AAV9). В некоторых вариантах осуществления, псевдотипированный AAV представляет собой AAV2/10 (т.е., AAV, содержащий ITR AAV2 и капсидные белки AAV10).

В некоторых вариантах осуществления предшествующего аспекта, AAV вектор содержит рекомбинантный капсидный белок, такой как капсидный белок, содержащий химеру из одного или более из капсидных белков из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAVrh74, AAVrh.8 или AAVrh.10. В вариантах осуществления, капсид представляет собой вариант капсида AAV, такой как вариант AAV2 rAAV2-retro (SEQ ID NO:44 из WO 2017/218842, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки).

В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой AAV10. Например, композиция может содержать AAV10, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b.

В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой AAV9. Например, композиция может содержать AAV9, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b.

В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой AAV2/10. Например, композиция может содержать AAV2/10, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b.

В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой AAV2/9. Например, композиция может содержать AAV2/9, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b.

В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой AAV вектор, и трансген кодирует коровый белок ретромера VPS35. Например, композиция может содержать рекомбинантный AAV (rAAV), такой как AAV10, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный коровый белок ретромера VPS35. Например, композиция

может содержать рекомбинантный AAV (rAAV), такой как AAV9, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный коровый белок ретромера VPS35. Например, композиция может содержать рекомбинантный AAV (rAAV), такой как AAV2/9 или AAV2/10, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный коровый белок VPS35 ретромера.

В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой AAV вектор, и трансген кодирует коровый белок ретромера VPS26a. Например, композиция может содержать рекомбинантный AAV (rAAV), такой как AAV10, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный коровый белок ретромера VPS26a. Например, композиция может содержать рекомбинантный AAV (rAAV), такой как AAV9, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный коровый белок ретромера VPS26a. Например, композиция может содержать рекомбинантный AAV (rAAV), такой как AAV2/9 или AAV2/10, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный коровый белок ретромера VPS26a.

В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой AAV вектор, и трансген кодирует коровый белок ретромера VPS26b. Например, композиция может содержать рекомбинантный AAV (rAAV), такой как AAV10, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный коровый белок ретромера VPS26b. Например, композиция может содержать рекомбинантный AAV (rAAV), такой как AAV9, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный коровый белок ретромера VPS26b. Например, композиция может содержать рекомбинантный AAV (rAAV), такой как AAV2/9 или AAV2/10, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный коровый белок ретромера VPS26b.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов изобретения, композиция содержит липосому, везикулу, синтетическую везикулу, экзосому, синтетическую экзосому, дендример или наночастицу.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов изобретения, трансген является функционально связанным с промотором, который индуцирует экспрессию трансгена в нейроне. Промотор может представлять собой, например, промотор бета-актина курицы, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор легкой цепи-2 миозина, промотор альфа-актина, промотор тропонина 1, промотор $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника, промотор дистрофина, промотор креатинкиназы, промотор альфа7-интегрина, промотор натрийуретического пептида головного мозга, промотор альфа В-кристаллина/малого белка теплового шока, промотор тяжелой цепи альфа-миозина или промотор предсердного натрийуретического фактора.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов изобретения, трансген является функционально связанным с энхансером, который индуцирует экспрессию трансгена в нейроне. Иллюстративные энхансеры, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами по настоящему изобретению, представляют собой энхансер CMV, энхансер фактора 2 миоцитов (MEF2) и энхансер MyoD.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения дегенеративного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта посредством введения одной или более композиций, содержащих один или более вирусных векторов, в соответствии со следующими далее вариантами осуществления. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят субъекту настолько быстро, как только возможно, или немедленно после того, как у субъекта диагностировано наличие дегенеративного заболевания или нарушения. В вариантах осуществления, дегенеративное заболевание или нарушение представляет собой нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона, нейрональный цероидный липофусциноз (NCL), трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (TSE или прионное заболевание), множественная системная атрофия (MSA), синдром Дауна и наследственная спастическая параплегия (HSP), так же как таупатии, такие как прогрессирующий супрануклеарный паралич (PSP), лобно-височная лобарная деменция, связанная с хромосомой 17q21-22, и ее подтипы (FTLD-17/FTLD-Tau), болезнь телец Леви (LBD), боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височная дегенерация (FTD), ALS-FTD и хроническая травматическая энцефалопатия (CTE).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения дегенеративного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта посредством введения одной или более композиций, содержащих трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или VPS26a, и/или VPS26b, как описано в предшествующих разделах. В вариантах осуществления, композиция содержит трансген, кодирующий VPS35, и трансген, кодирующий VPS26a. В вариантах осуществления, композиция содержит трансген, кодирующий VPS35, и трансген, кодирующий VPS26b. В вариантах осуществления, композиция содержит трансген, кодирующий VPS26a, и трансген, кодирующий VPS26b. В вариантах осуществления, композиция содержит трансген, кодирующий VPS35, трансген, кодирующий VPS26a, и трансген, кодирующий VPS26b. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят субъекту настолько быстро, как только возможно, или немедленно после того, как у субъекта диагностировано наличие дегенеративного заболевания или нарушения. В вариантах осуществления, дегенеративное заболевание или нарушение представляет собой нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона, нейрональный цероидный липофусциноз (NCL), трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (TSE или прионное заболевание), синдром Дауна, наследственная спастическая параплегия (HSP) и множественная системная атрофия

(MSA), так же как таупатии, такие как прогрессирующий супрануклеарный паралич (PSP), лобно-височная лобарная деменция, связанная с хромосомой 17q21-22, и ее подтипы (FTLD-17/FTLD-Tau), болезнь телец Леви (LBD), боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височная дегенерация (FTD), ALS-FTD и хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ).

В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества первой композиции, содержащей трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или VPS26a, и/или VPS26b, как описано в предшествующих разделах. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение субъекту терапевтически эффективного количества второй композиции, содержащей трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или VPS26a, и/или VPS26b, как описано в предшествующих разделах. В вариантах осуществления, способ включает введение первой композиции, содержащей трансген, кодирующий VPS35, и введение второй композиции, содержащей трансген, кодирующий VPS26a или VPS26b. В вариантах осуществления, способ включает введение первой композиции, содержащей трансген, кодирующий VPS26a или VPS26b, и введение второй композиции, содержащей трансген, кодирующий VPS35. В вариантах осуществления, способ включает введение первой композиции, содержащей трансген, кодирующий VPS26a, и введение второй композиции, содержащей трансген, кодирующий VPS26b. В вариантах осуществления, способ включает введение первой композиции, содержащей трансген, кодирующий VPS26b и введение второй композиции, содержащей трансген, кодирующий VPS26a.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение субъекту терапевтически эффективного количества третьей композиции, содержащей трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или VPS26a, и/или VPS26b, как описано в предшествующих разделах. В вариантах осуществления, первая, вторая и третья композиции содержат трансген, кодирующий VPS35, VPS26a или VPS26b, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую композиции вводят субъекту в одно и то же время. В некоторых вариантах осуществления, первую, вторую и третью композиции вводят субъекту в одно и то же время.

В некоторых вариантах осуществления, вторую композицию вводят субъекту после введения первой композиции субъекту. Вторую композицию можно вводить субъекту, например, в пределах одних или нескольких суток или недель от введения первой композиции субъекту. В некоторых вариантах осуществления, вторую композицию вводят субъекту по меньшей мере через один месяц после введения первой композиции субъекту. В некоторых вариантах осуществления, введение первой композиции продолжают, в то время как вторую композицию вводят субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, третью композицию вводят субъекту после введения первой и второй композиции субъекту. Третью композицию можно вводить

субъекту, например, в пределах одних или нескольких суток или недель от введения первой и второй композиции субъекту. В некоторых вариантах осуществления, третью композицию вводят субъекту по меньшей мере через один месяц после введения первой и второй композиции субъекту. В некоторых вариантах осуществления, введение первой и второй композиции продолжают, в то время как третью композицию вводят субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, первую композицию вводят субъекту посредством внутривенного, интратекального, внутрикожного, чрескожного, парентерального, внутримышечного, интраназального, подкожного, чрескожного, интратрахеального, внутрибрюшинного, внутриартериального, внутрисосудистого введения, ингаляции, перфузии, лаважа и/или перорального введения.

В некоторых вариантах осуществления, вторую композицию вводят субъекту посредством внутривенного, интратекального, внутрикожного, чрескожного, парентерального, внутримышечного, интраназального, подкожного, чрескожного, интратрахеального, внутрибрюшинного, внутриартериального, внутрисосудистого введения, ингаляции, перфузии, лаважа и/или перорального введения.

В некоторых вариантах осуществления, третью композицию вводят субъекту посредством внутривенного, интратекального, внутрикожного, чрескожного, парентерального, внутримышечного, интраназального, подкожного, чрескожного, интратрахеального, внутрибрюшинного, внутриартериального, внутрисосудистого введения, ингаляции, перфузии, лаважа и/или перорального введения.

В следующем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения, предотвращения и/или излечения нейродегенеративного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции или композиций, содержащих трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b.

В дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к способу облегчения одного или более симптомов, ассоциированных с нейродегенеративным заболеванием или нарушением, у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции или композиций, содержащих трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b.

В качестве части вышеуказанных аспектов, настоящее изобретение относится также к одной или нескольким композициям, как описано в настоящем описании, для использования в способе, как описано в настоящем описании. Настоящее изобретение относится также к применению одной или более композиций, как описано в настоящем описании, для изготовления одного или более лекарственных средств для способа, как описано в настоящем описании. Трансген может кодировать коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b.

В качестве части вышеуказанных аспектов, настоящее изобретение, таким образом, относится также к композиции, содержащей один или более трансгенов, кодирующих коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b, для использования в лечении, предотвращении и/или лечении нейродегенеративного заболевания или нарушения. Кроме того, настоящее изобретение относится к одной или нескольким композициям, содержащим один или более трансгенов, кодирующих коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b для использования в облегчении одного или более симптомов, ассоциированных с нейродегенеративным заболеванием или нарушением.

В качестве части вышеуказанных аспектов, настоящее изобретение относится также к применению одной или более композиций, содержащих один или более трансгенов, кодирующих коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b, для изготовления одного или более лекарственных средств для лечения, предотвращения и/или излечения нейродегенеративного заболевания или нарушения. Кроме того, настоящее изобретение относится к применению одной или более композиций, содержащих один или более трансгенов, кодирующих коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b, для изготовления одного или более лекарственных средств для облегчения одного или более симптомов, ассоциированных с нейродегенеративным заболеванием или нарушением.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой нейродегенеративное заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера (AD). В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой болезнь Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой нейрональный цероидный липофусциноз (NCL). В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (TSE или прионное заболевание). В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой множественную системную атрофию (MSA). В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой прогрессирующий супрануклеарный паралич (PSP). В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой лобно-височную лобарную деменцию, связанную с хромосомой 17q21-22, и ее подтипы (FTLD-17/FTLD-Тau). В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой хроническую травматическую

энцефалопатию (СТЕ). В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой синдром Дауна. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой HSP. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой LBD. в некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой ALS. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, заболевание или нарушение представляет собой FTD или ALS-FTD.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к набору, содержащему композицию из предшествующего аспекта. Набор может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, такой как вкладыш в упаковку с инструкциями для пользователя набора, для введения композиции субъекту, в соответствии со способом из любого из вышеуказанных аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

С целью иллюстрации изобретения, на чертежах изображены конкретные варианты осуществления изобретения. Однако, изобретение не является ограниченным точными аранжировками и инструментарием вариантов осуществления, изображенных на чертежах.

На фигуре 1 показано отображение остова (PyMOL, Schroedinger, Inc.) трехмерной структуры узнающего нагрузку кора ретромера, с выделением взаимодействия VPS35 (оранжевый) с VPS29 (красный) и VPS26a (зеленый). Vps26b связывает Vps35 фактически идентичным образом (Collins et al. 2008; Shi et al. 2006). Атомные координаты (файл PDB 6vac) взяты из структуры cryoEM мышинового гетеротримера (Kendall et al. 2020).

На фигуре 2 показано, что экспрессия только VPS35 является недостаточной для усиления образования тримера и функции ретромера. Фигура 2А представляет собой репрезентативные иммуноблоты, показывающие уровни экспрессии ретромера и Sor11 после AAV9-VPS35-НА. AAV9-GFP и AAV9-EV (пустой вектор) использовали в качестве контроля. Фигура 2В представляет собой столбчатую диаграмму, показывающие средние уровни компонентов ретромера и Sor11, нормализовано по актину; Контроль (левые столбцы, темно-серый, n=23), сверхэкспрессия VPS35 (правые столбцы, красный, n=16). ***P < 0,001, ns=не значимо.

На фигуре 3 показаны карты плазмид, используемых в примерах. На фигуре 3А показана карта контрольной плазмиды с пустым каркасом. На фигуре 3В показана карта контрольной плазмиды с GFP. На фигуре 3С показана карта плазмиды с VPS35. На фигуре 3D показана карта плазмиды с VPS26a. На фигуре 3Е показана карта плазмиды с VPS26b.

На фигуре 4 показана оптимизация комбинированной экспрессии VPS35 и VPS26 в клетках нейробластомы. Фигура 4А представляет собой репрезентативные иммуноблоты, показывающие уровни экспрессии ретромера после трансфекции с использованием плазмид, содержащих только VPS35, VPS26a и VPS26b, или двойной трансфекции VPS35

вместе с VPS26a или VPS26b. Плазмиды с GFP или пустым остовом использовали в качестве контроля. Для надлежащего контроля количества комплексов плазмидной ДНК/липофектамина, вводимых в каждой условиях, контрольную плазмиду (GFP или пустой остов) включали во всех случаях, когда проводили трансфекцию только одного компонента ретромера. Для VPS29 показаны две отдельные полосы, представляющие две различные изоформы этого белка в этих клетках N2a. Фигуры 4B - 4E представляют собой графики средних уровней корового белка ретромера (VPS35, VPS26a, VPS26b, VPS29) в клетках нейробластомы, нормализованных по актину, при трансфекции с использованием вирусных векторов, содержащих пустой вектор (EV) и GFP в качестве контроля (EV+GFP), только VPS35, только VPS26a, только VPS26b, вектор VPS35+вектор VPS26a, и вектор VPS35+вектор VPS26b. На фигуре 4B показан VPS35. На фигуре 4C показан VPS26a. На фигуре 4D показан VPS26b. На фигуре 4E показан VPS29. Контроль (темно-серый, $n=15$), сверхэкспрессия только VPS35 ($n=30$), VPS26a ($n=30$), и VPS26b ($n=15$) (синий), комбинации VPS35+VPS26 (красный, $n=15$). *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, ! $P=0,07$, ns=не значимо.

На фигуре 5 показано, что комбинированная экспрессия VPS35 и VPS26 действует синергически с функцией ретромера в нейронах. Фигура 5A представляет собой репрезентативные иммуноблоты, показывающие уровни экспрессии ретромера после трансдукции с использованием векторов AAV9, содержащих VPS35, VPS26a и VPS26b. AAV9-GFP и AAV9-EV (AAV9, содержащий пустой остов плазмиды) использовали в качестве контроля. Экспериментальные векторы AAV9 экспрессировали в нейронах во всех возможных комбинациях: экспрессия одиночного белка (только VPS35, только VPS26a, только VPS26b); двойная экспрессия белка (VPS35+VPS26a, VPS35+VPS26b, VPS26b+VPS26a); и тройная экспрессия белка (VPS35+VPS26a+VPS26b). Для надлежащего контроля количества ДНК и AAV9, вводимых в каждой условиях, контрольный AAV9 (GFP или EV) включали во всех случаях, когда проводили трансдукцию только одного компонента ретромера. Фигуры 5B - 5E представляют собой столбчатые диаграммы средних уровней корового белка ретромера (VPS35, VPS26a, VPS26b) в клетках нейробластомы, нормализованных по актину, при трансфекции с использованием одного или более из пяти вирусных векторов (AAV9), содержащих пустой вектор (EV), GFP, VPS35, VPS26a или VPS26b. Результаты показаны для пустого вектора (EV)+GFP в качестве контроля, вектора только с VPS35, вектора только с VPS26a, вектора только с VPS26b, вектора VPS35+вектор VPS26a, вектора VPS35+вектор VPS26b, вектора VPS35+вектора VPS26a+вектор VPS26b и вектора VPS26a+вектор VPS26b. На фигуре 5B показан VPS35. На фигуре 5C показан VPS29. На фигуре 5D показан VPS26a. На фигуре 5E показан VPS26b. Контроль (темно-серый, $n=9$), одиночная сверхэкспрессия VPS35, VPS26a или VPS26b (синий, $n=18$), VPS35+VPS26a или VPS26b комбинации (красный, $n=9$), VPS35+VPS26a+VPS26b (темно-красный, $n=9$), VPS26a+VPS26b (розовый, $n=9$). *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, ns=не значимо.

На фигуре 6 показано, что комбинированная экспрессия VPS35 и VPS26 действует синергически с функцией ретромера в нейронах. Фигура 6А представляет собой репрезентативные иммуноблоты, показывающие уровни экспрессии Sorl1 после трансдукции с использованием векторов AAV9, содержащих VPS35, VPS26a и VPS26b. AAV9-GFP и AAV9-EV (AAV9, содержащий пустой остов плазмиды) использовали в качестве контроля. Экспериментальные векторы AAV9 экспрессировали в нейронах во всех возможных комбинациях: экспрессия одиночного белка (только VPS35, только VPS26a, только VPS26b); двойная экспрессия белка (VPS35+VPS26a, VPS35+VPS26b, VPS26b+VPS26a); и тройная экспрессия белка (VPS35+VPS26a+VPS26b). Для надлежащего контроля количества ДНК и AAV9, вводимых в каждом условии, контрольный AAV9 (GFP или EV) включали во всех случаях, когда проводили трансдукцию только одного компонента ретромера. Фигура 6В представляет собой столбчатую диаграмму уровней Sorl1 в нейронах, нормализованных по актину, при трансфекции с использованием одного или более из пяти вирусных векторов (AAV9), содержащих пустой вектор (EV), GFP, VPS35, VPS26a или VPS26b. Результаты показаны для пустого вектора (EV)+GFP в качестве контроля, вектора только с VPS35, вектора только с VPS26a, вектора только с VPS26b, вектора VPS35+вектор VPS26a, вектора VPS35+вектор VPS26b, вектора VPS35+вектор VPS26a+вектор VPS26b и вектора VPS26a+вектор VPS26b. Контроль (темно-серый, n=9), одиночная сверхэкспрессия VPS35, VPS26a или VPS26b (синий, n=18), комбинации VPS35+VPS26a или VPS26b (красный, n=9), VPS35+VPS26a+VPS26b (темно-красный, n=9), VPS26a+VPS26b (розовый, n=9). ***P < 0,001, ns=не значимо. Фигуры 6С и 6D представляют собой графики рассеяния, полученные с использованием многофакторной регрессии, показывающие, что VPS26a (t=5,6, p=1,4E-7) и VPS26b (F=7,2, p=3,2E-11) независимо коррелируют с уровнями Sorl1. На фигуре 6С показан VPS26a. На фигуре 6D показан VPS26b.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

Термины, использованные в настоящем описании, в общем имеют свои обычные значения в данной области, в контексте настоящего изобретения и в конкретном контексте, в котором использован каждый из терминов. Конкретные термины обсуждают ниже, или в другом месте в настоящем описании, для обеспечения специалиста-практика описанием способов по изобретению и того, как использовать их. Кроме того, следует иметь в виду, что одно и то же можно сказать более чем одним способом. Следовательно, альтернативную формулировку и синонимы можно использовать для любого одного или более из терминов, обсуждаемых в настоящем описании, не следует придавать особое значение тому, поясняют или нет, или обсуждают или нет термин в настоящем описании. Для определенных терминов представлены синонимы. Перечисление одного или более синонимов не исключает использования других синонимов. Использование примеров где-либо в описании, включая примеры любых терминов, обсуждаемых в настоящем

описании, является только иллюстративным, и никаким образом не ограничивает объем и значение изобретения или любого проиллюстрированного термина. Подобным образом, изобретение не является ограниченным предпочтительными вариантами его осуществления.

Термин «около» или «приблизительно» означает находящийся в пределах приемлемого диапазона ошибки для конкретного значения, как определено специалистом в данной области, который может частично зависеть от того, каким образом значение измеряют или определяют, т.е., ограничений системы измерения, т.е., степени точности, необходимой для конкретного назначения, такого как фармацевтический состав. Например, «приблизительно» может означать в пределах 1 или более чем 1 стандартного отклонения, по общепринятой в данной области практике. Альтернативно, «приблизительно» может обозначать диапазон вплоть до 20%, предпочтительно, вплоть до 10%, более предпочтительно, вплоть до 5%, и еще более предпочтительно, вплоть до 1% данного значения. Альтернативно, в частности, применительно к биологическим системам или процессам, термин может означать в пределах одного порядка величины, предпочтительно, в пределах 5-кратного, и более предпочтительно, в пределах 2-кратного значения. Когда конкретные значения описаны в настоящем описании и формуле изобретения, если не указано иное, следует принимать значение термина «приблизительно», как находящийся в пределах приемлемого диапазона ошибки для конкретного значения.

Термин «субъект», в рамках изобретения, относится к животным, нуждающимся в терапевтическом или профилактическом лечении. Субъекты включают млекопитающих, таких как собачьи, кошачьи, грызуны, бычьи, лошадиные, свиные, овечьи и приматы. Таким образом, композиции и способы можно использовать в ветеринарной медицине, например, для лечения животных-компаньонов, сельскохозяйственных животных, лабораторных животных, животных в зоологических парках и животных в дикой природе. Композиции и способы, описанные в настоящем описании, являются особенно желательными для медицинских применений для человека.

Термин «пациент», в рамках изобретения, означает субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления, «пациент», как известно, или как подозревают, имеет нейродегенеративное заболевание или нарушение включая, но без ограничения, болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона, нейрональный цероидный липофусциноз (NCL), трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (TSE или прионное заболевание), множественную системную атрофию, синдром Дауна и наследственную спастическую параплегию (HSP), (MSA), так же как таупатии, такие как прогрессирующий супрануклеарный паралич (PSP), лобно-височная лобарная деменция, связанная с хромосомой 17q21-22, и ее подтипы (FTLD-17/FTLD-Tau), болезнь телец Леви (LBD), боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височная дегенерация (FTD), ALS-FTD и хроническая травматическая энцефалопатия (CTE). В некоторых вариантах осуществления, «пациент», как известно, или как подозревают, имеет нарушение или

заболевание, ассоциированное с эндосомальным транспортом, например, дисфункцией ретромера.

Фраза «терапевтически эффективное количество» использована в настоящем описании для обозначения количества, которое является достаточным для вызова улучшения клинически значимого состояния у субъекта, или задерживает или минимизирует, или смягчает один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, или приводит к желательному обеспечивающему преимуществу изменение физиологии у субъекта.

Термины «лечить», «лечение» и т.п. относятся к способам для замедления, уменьшения, облегчения или смягчения по меньшей мере одного из симптомов заболевания или нарушения, или обращения заболевания или нарушения после его начала.

Термины «предотвращать», «профилактика» и т.п. относятся к действию до проявления начала заболевания или нарушения, для предотвращения развития заболевания или нарушения, или минимизации степени заболевания или нарушения, или замедления хода его развития.

Термин «излечение» и т.п. означает исцеление, придание хорошего состояния или восстановление хорошего здоровья, или обеспечение некоторого периода времени без рецидива заболевания, так что риск рецидива является небольшим.

Термин «нуждающийся в этом» может представлять собой субъекта, как известно, или как подозревают, имеющего, или подверженного риску иметь нейродегенеративное заболевание или нарушение, включая, но без ограничения, болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона, нейрональный цероидный липофусциноз (NCL), трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (TSE или прионное заболевание), множественную системную атрофию, синдром Дауна и наследственную спастическую параплегию (HSP), (MSA), так же как таупатии, такие как прогрессирующий супрануклеарный паралич (PSP), лобно-височная лобарная деменция, связанная с хромосомой 17q21-22, и ее подтипы (FTLD-17/FTLD-Tau), болезнь телец Леви (LBD), боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височная дегенерация (FTD), ALS-FTD и хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ).

Термин «средство» в рамках изобретения, обозначает вещество, которое оказывает или является способным оказывать эффект, и может включать, но без ограничения, векторы, химические средства, фармацевтические средства, биологические средства, малые органические молекулы, антитела, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки.

В рамках изобретения, термин «носитель» обозначает разбавитель, адъювант, наполнитель или носитель, с которым вводят терапевтическое средство, и включает все без исключения растворители, диспергирующие среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, буферы, растворы носителя, суспензии, коллоиды и т.п.. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области.

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным объектам и композициям, которые не приводят к аллергической или сходной неблагоприятной реакции при введении хозяину, такой как расстройство желудка, головокружение и т.п., при введении человеку, и одобрены регулирующим органом федерального или регионального правительства, или перечислены в фармакопее США или другой общепринятой фармакопее для использования у животных, и более конкретно, у человека.

«Выделенная молекула нуклеиновой кислоты» обозначает ДНК или РНК геномного происхождения, происхождения из мРНК, кДНК или синтетического происхождения, или некоторую их комбинацию, которая не является ассоциированной со всем или частью полинуклеотида, с которым выделенный полинуклеотид обнаружен в природе, или является связанной с полинуклеотидом, с которым она не является связанной в природе. Для целей по настоящему изобретению, следует понимать, что «молекула нуклеиновой кислоты, содержащая» конкретную нуклеотидную последовательность, не включает интактные хромосомы. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, «содержащие» указанные последовательности нуклеиновой кислоты, могут включать, в дополнение к указанным последовательностям, кодирующие последовательности для вплоть до десяти или даже вплоть до двадцати или более других белков, или их частей или фрагментов, или могут включать функционально связанные регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию кодирующей области перечисленных последовательностей нуклеиновой кислоты, и/или могут включать векторные последовательности.

Фраза «контрольные последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Контрольные последовательности, которые являются пригодными для прокариот, например, включают промотор, необязательно, последовательность оператора и участок связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она помещена в функциональную взаимосвязь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК для предпоследовательности или секреторного лидера является функционально связанной с ДНК для полипептида, если она экспрессируется в форме пребелка, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер является функционально связанным с кодирующей последовательностью если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосомы является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы облегчать трансляцию. Как правило, «функционально связанный» означает, что связанные последовательности ДНК являются непрерывными, и, в случае секреторного лидера, непрерывными и находящимися в фазе считывания. Однако, энхансеры не обязательно должны являться непрерывными. Связывание осуществляют

посредством лигирования в удобных участках рестрикции. Если таких участков не существует, синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры используют в соответствии с общепринятой практикой.

В рамках изобретения, выражения «клетка», «линия клеток» и «культура клеток» использованы взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают потомство. Таким образом, слова «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичные клетки субъекта и культуры, происходящие из них, независимо от количества переносов. Понятно также, что не все потомство будет иметь точно идентичное содержание ДНК, из-за преднамеренных или самопроизвольных мутаций. Включено мутантное потомство, имеющее такую же функцию или биологическую активность, как та, по которой скринировали исходно трансформированную клетку. Когда предусмотрены отличные определения, это ясно из контекста.

В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к выделенным аденоассоциированным вирусным векторам (AAV). В рамках изобретения, применительно к AAV, термин «выделенный» относится к AAV, который был выделен из его природного окружения (например, из клетки-хозяина, ткани или субъекта) или получен искусственно. Выделенные AAV можно получать с использованием рекомбинантных способов. Такие AAV обозначены в настоящем описании как «рекомбинантные AAV». Рекомбинантные AAV (rAAV), предпочтительно, имеют способности к тканеспецифическому нацеливанию, так что трансген из rAAV можно доставлять специфически в одну или более predetermined ткань(и). Капсид AAV является важным элементом в определении этих способностей к тканеспецифическому нацеливанию.

Способы получения рекомбинантных AAV, имеющих желательный капсидный белок, описаны (см., например, Патент США No. 7906111). Описан ряд различных капсидных белков AAV, например, белки, описанные в Gao, et al., J. Virology 78(12):6381-6388 (June 2004); Gao, et al., Proc Natl Acad Sci USA 100(10):6081-6086 (May 13, 2003); и Патенте США No. 7906111; Патенте США No. 8999678. В вариантах осуществления желательной упаковки для описанных в настоящее время конструкций и способов, рекомбинантный AAV может представлять собой вектор и капсид AAV9 или AAV10. Однако, следует отметить, что другие пригодные AAV, такие как rAAVrh.8 и rAAVrh.10, или другие сходные векторы можно адаптировать для использования в способах и композициях по настоящему изобретению. Как правило, способы включают культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок AAV или фрагмент; функциональный ген гер; рекомбинантный AAV вектор, состоящий из инвертированных концевых повторов (ITR) AAV и трансгена; и имеет достаточные функции помощника, чтобы позволять упаковку рекомбинантного AAV вектора в капсидные белки AAV.

Компоненты, подлежащие культивированию в клетке-хозяине для упаковки rAAV вектора в капсид AAV, могут быть предоставлены клетке-хозяину в транс-

Альтернативно, любой один или более из требуемых компонентов (например, рекомбинантный AAV вектор, последовательности гер, последовательности сар и/или функции помощника) можно предоставлять посредством стабильной клетки-хозяина, которая была модифицирована для содержания одного или более из необходимых компонентов с использованием способов, известных специалисту в данной области. Более подходящим образом, такая стабильная клетка-хозяин может содержать необходимый компонент(ы) под контролем индуцируемого промотора. Однако, необходимый компонент(ы) могут находиться под контролем конститутивного промотора. В качестве другой альтернативы, выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный компонент(ы) под контролем конститутивного промотора и другой выбранный компонент(ы) под контролем одного или более индуцируемых промоторов. Например, можно получать стабильную клетку-хозяина, которая происходит из клеток 293 (содержащих функции помощника E1 под контролем конститутивного промотора), но которая содержит белки гер и/или сар под контролем индуцируемых промоторов.

Рекомбинантный AAV вектор, последовательности гер, последовательности сар и функции помощника для продукции гAAV можно доставлять в упаковывающую клетку-хозяина с использованием любого подходящего генетического элемента (вектора). Выбранный генетический элемент можно доставлять посредством любого подходящего способа, включая способы, описанные в настоящем описании. См., например, Fisher et al, J. Virology 70:520-532 (1993) и Патент США No. 5478745.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные AAV можно получать с использованием способа тройной трансфекции (например, как подробно описано в Патенте США No. 6001650). Как правило, рекомбинантные AAV получают посредством трансфекции клетки-хозяина с использованием рекомбинантного AAV вектора (содержащего трансген), подлежащего упаковке в частицы AAV, вектора с функцией помощника AAV и вектора с вспомогательной функцией. Вектор с функцией помощника AAV кодирует последовательности «функции помощника AAV» (т.е., гер и сар), которые функционируют в транс- для продуктивной репликации и капсидирования AAV. Предпочтительно, вектор с функцией помощника AAV поддерживает эффективную продукцию AAV вектора без образования каких-либо поддающихся детекции вирионов AAV дикого типа (т.е., вирионов AAV, содержащих функциональные гены гер и сар). Неограничивающие примеры векторов, пригодных для применения, включают pHLP19, описанный в Патенте США No. 6001650, и вектор pRepбсар6, описанный в Патенте США No. 6156303, полное содержание обоих приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Вектор с вспомогательной функцией кодирует нуклеотидные последовательности для не происходящих из AAV вирусных и/или клеточных функций, от которых AAV зависит для репликации (т.е., «вспомогательных функций»). Вспомогательные функции включают функции, необходимые для репликации AAV, включая, без ограничения, группы, вовлеченные в активацию транскрипции генов AAV, специфический для стадии сплайсинг мРНК AAV, репликацию ДНК AAV, синтез продуктов экспрессии сар и сборку

капсида AAV. Вспомогательные функции на основе вирусов могут происходить из любого из известных вирусов-помощников, таких как аденовирус, вирус герпеса (отличный от вируса простого герпеса типа 1) и вирус осповакцины.

В рамках изобретения, термины «AAV1», «AAV2», «AAV3», «AAV4» и т.п. относятся к AAV векторам, содержащим ITR из AAV1, AAV2, AAV3 или AAV4, соответственно, так же как к капсидным белкам из AAV1, AAV2, AAV3 или AAV4, соответственно. Термины «AAV2/1», «AAV2/8», «AAV2/9» и т.п. относятся к псевдотипированным AAV векторам, содержащим ITR из AAV2 и капсидные белки из AAV1, AAV8 или AAV9, соответственно.

Применительно к трансфицированным клеткам-хозяевам, термин «трансфекция» использован для обозначения поглощения чужеродной ДНК клеткой, и клетка была «трансфицирована», когда экзогенная ДНК введена внутрь клеточной мембраны. Ряд способов трансфекции, в общем, известны в данной области. См., например, Graham et al., *Virology* 52:456 (1973), Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989), Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986), и Chu et al., *Gene* 13:197 (1981). Такие способы можно использовать для введения одной или более экзогенных нуклеиновых кислот, таких как вектор для интеграции нуклеотида и другие молекулы нуклеиновой кислоты, в подходящие клетки-хозяева.

«Клетка-хозяин» относится к любой клетке, которая несет, или является способной нести, представляющее интерес вещество. Часто клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Клетку-хозяина можно использовать в качестве реципиента конструкции-помощника AAV, плазмиды с минигеном AAV, вектора с вспомогательной функцией или другой переносимой ДНК, ассоциированной с продукцией рекомбинантных AAV векторов. Термин включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, «клетка-хозяин», в рамках изобретения, может относиться к клетке, которая была трансфицирована с использованием экзогенной последовательности ДНК. Понятно, что потомство одной родительской клетки может необязательно являться полностью идентичным по морфологии или по геномной или тотальной комплементарной ДНК исходному родителю, из-за природной, случайной или преднамеренной мутации.

Применительно к клеткам, термин «выделенный» относится к клетке, которая была выделена из ее природного окружения (например, из ткани или субъекта). Термин «линия клеток» относится к популяции клеток, способной к постоянному или длительному росту и делению *in vitro*. Часто, линии клеток представляют собой клональные популяции, происходящие из одной клетки-предшественника. Кроме того, в данной области известно, что спонтанные или индуцированные изменения могут возникать в кариотипе в ходе хранения или переноса таких клональных популяций. Таким образом, клетки, происходящие из упомянутой линии клеток, могут не являться точно идентичными предковым клеткам или культурам, и упомянутая линия клеток включает такие варианты.

В рамках изобретения, термины «рекомбинантная клетка» относятся к клетке, в которую введен экзогенный фрагмент ДНК, такой как фрагмент ДНК, который приводит к транскрипции биологически активного полипептида или продукции биологически активной нуклеиновой кислоты, такой как РНК.

Термин «вектор» включает любой генетический элемент, такой как плазмида, фаг, транспозон, космида, хромосома, искусственная хромосома, вирус или вирион, который является способным к репликации, когда ассоциирован с надлежащими контрольными элементами, и который может переносить последовательности генов между клетками. Таким образом, термин включает клонирующие и экспрессирующие векторы, так же как вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления, предусматривают, что векторы, которые можно использовать, представляют собой векторы, в которых фрагмент нуклеиновой кислоты, подлежащий транскрипции, находится под транскрипционным контролем промотора. «Промотор» относится к последовательности ДНК, узнаваемой синтетическим аппаратом клетки, или введенным синтетическим аппаратом, необходимой для инициации специфической транскрипции гена. Фразы «функционально расположенный», «функционально связанный», «под контролем» или «под транскрипционным контролем» означают, что промотор находится в правильной локализации и ориентации в отношении нуклеиновой кислоты для контроля инициации РНК-полимеразы и экспрессии гена.

Термин «экспрессирующий вектор» или «экспрессирующая конструкция», или «конструкция» означает любой тип генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, в которой часть или вся из кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты является способной подвергаться транскрипции. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия включает транскрипцию нуклеиновой кислоты, например, для получения биологически активного полипептидного продукта или ингибирующей РНК с транскрибируемого гена.

Стандартные способы молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch and Maniatis *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition); Sambrook and Russell *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Wu *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA) (1993). Стандартные способы также приведены в Ausbel, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY (2001).

Ретромеры и нейродегенеративные заболевания

Генетика, цитопатология и клеточная биология болезни Альцгеймера (AD) сходятся на эндосомальном транспорте как ключевом дефекте в патогенезе AD. Три линии доказательств вовлекают дисфункцию ретромера при AD. Во-первых и в наибольшей степени, генетические исследования и исследования экспрессии генов идентифицировали растущее количество родственных ретромеру молекул, ассоциированных с AD, включая полноценные мутации потери функции. Во-вторых,

дисфункция ретромера воспроизводит цитопатологию AD, характеризующуюся увеличенными и дисфункциональными эндосомами, в которых накапливаются фрагменты белка-предшественника амилоида (APP). В-третьих, дисфункция ретромера приводит к неправильному транспорту ряда связанных с AD молекул, включая APP в нейронах и фагоцитарные рецепторы в микроглии.

Ретромер представляет собой мультибелковый комплекс, который является «главным проводником» эндосомального транспорта. Кор ретромера представляет собой тример из трех различных белков, что технически делает его гетеротримером. Все белки являются членами семейства белков «вакуолярной сортировки белков» (VPS). VPS35 является центральным белком тримера кора, с которым связываются VPS29 и VPS26. VPS26 является единственным коровым белком, который имеет два паралога, называемые VPS26a и VPS26b. Таким образом, нейроны имеют два отдельных кора ретромера: VPS29-VPS35-VPS26a и VPS29-VPS35-VPS26b. См. фигуру 1.

Эти коровые белки, при сверхэкспрессии, связываются с эндогенными компонентами ретромера и могут приводить к усиленной функции ретромера. Эти белки подвергаются очень строгой ауторегуляции внутри клеток. Для преодоления этого барьера, два белка ретромера совместно экспрессируют в одно и то же время, как описано в настоящем описании.

Увеличение уровней VPS35, либо посредством фармакологических шаперонов, либо посредством вирусных векторов, усиливает функцию ретромера. По сравнению либо с VPS35, либо с VPS26, белок VPS29 может существовать в избытке. Как показано в настоящем описании, совместная экспрессия как VPS35, так и VPS26a, или как VPS35, так и VPS26b, имеет синергический эффект на клеточные уровни VPS35 и VPS26a или VPS35 и VPS26b, соответственно.

Доказательство функции ретромера показано также посредством увеличения уровней Sorl1 на приблизительно 34%, величину эффекта, которая отражает степень недостаточности Sorl1, наблюдаемой при болезни Альцгеймера (Sager et al. 2007; Scherzer et al. 2004; Dodson et al. 2006). Более широкое сравнение эффекта на Sorl1 среди исследований информирует о функциональности ретромера. В первом нейронном исследовании, когда сверхэкспрессировали только VPS35, уровни двух из трех коровых белков ретромера были сильно увеличены, но без эффекта на функцию ретромера. Во втором нейронном исследовании, когда благодаря синергизму уровни всех трех из тримерных белков были сильно увеличены, это привело к усилению функции ретромера. Этот результат предоставляет первичное эмпирическое доказательство того, что уровень всех трех коровых белков ретромера необходимо совместно увеличивать для повышающей регуляции общей функции ретромера. Исследования в настоящем описании показали, что посредством использования стехиометрии ретромера и белок-белковых взаимодействий, нет необходимости экзогенно экспрессировать все три белка. Экзогенная экспрессия VPS35 и VPS26 является достаточной также для повышающей регуляции

уровня VPS29 и усиления функции ретромера рециркуляции эндосомального содержимого.

В настоящем описании показано также, что важно, что уровни VPS26a и VPS26b являются независимыми друг от друга, и таким образом, соответствующий выбор комбинаций позволяет избирательное увеличение уровня одного гетеротримера ретромера, по сравнению с другим.

Настоящее изобретение относится к способу на биологической основе для увеличения уровней и функции ретромера *in vivo*: сверхэкспрессии ретромера посредством использования технологии рекомбинантного AAV (аденоассоциированного аденовируса). Разработка новых инструментов ретромер-AAV для применения для терапевтических средств на основе ретромера может оказывать сильное влияние, поскольку эта система для вирусной доставки - недавно одобренная для клинических применений - может обходить препятствия, с которыми малая молекула может столкнуться внутри организма (т.е., низкие скорости абсорбции, деградация, токсичность, отсутствие специфичности для мишени/органа, проницаемость гематоэнцефалического барьера). Композиции, содержащие AAV векторы и трансген(ы) ретромера, имеют множество преимуществ, включая увеличенную экспрессию лекарственного средства, обход строгой ауторегуляции белка, потенциал для длительной экспрессии стабилизированных белков и увеличение времени полужизни стабилизированных белков.

Способы лечения, профилактики и/или излечения нейродегенеративных заболеваний

Пациенты, которые могут получать преимущество от подвергания описанной генотерапии, включают пациентов, у которых диагностировано нейродегенеративное заболевание или нарушение, в которое вовлечены дефекты эндосомального транспорта, включая, но без ограничения, болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона, нейрональный цероидный липофусциноз (NCL), трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (TSE или прионное заболевание), множественную системную атрофию (MSA), синдром Дауна и наследственную спастическую параплегию (HSP), так же как таупатии, такие как прогрессирующий супрануклеарный паралич (PSP), лобно-височная лобарная деменция, связанная с хромосомой 17q21-22, и ее подтипы (FTLD-17/FTLD-Tau), болезнь телец Леви (LBD), боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височная дегенерация (FTD), ALS-FTD и хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ).

У этих пациентов, композиции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более из коровых белков ретромера (например, вирусные векторы, такие как AAV векторы, содержащих такие нуклеиновые кислоты), можно вводить пациенту. Эти композиции можно вводить отдельно или в комбинации с другими средствами для лечения нейродегенеративных заболеваний или нарушений.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения, профилактики, излечения и/или уменьшения тяжести или степени

нейродегенеративного заболевания или нарушения, посредством введения нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества композиции или композиций, таких как вирусный вектор (например, AAV), содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26, и/или коровый белок ретромера VPS26b. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой AAV, такой как rAAV2-retro, AAV10, AAV2/10, AAV9 или AAV2/9. В некоторых вариантах осуществления, композиция или композиции (например, вирусный вектор, такой как AAV), содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b, вводят как только нейродегенеративное заболевание или нарушение диагностируют или подозревают. В вариантах осуществления, вводимая композиция содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую VPS35 и либо VPS26a, либо VPS26b. В вариантах осуществления, способ включает введение одной или более композиций, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую VPS35, и нуклеиновую кислоту, кодирующую либо VPS26a, либо VPS26b; либо одновременно, либо последовательно. В вариантах осуществления, способ включает введение одной или более композиций, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую VPS35, нуклеиновую кислоту, кодирующую VPS26a, и нуклеиновую кислоту, кодирующую VPS26b; либо одновременно, либо последовательно. В вариантах осуществления, способ включает введение одной или более композиций, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую VPS26a и нуклеиновую кислоту, кодирующую VPS26b; либо одновременно, либо последовательно.

В некоторых вариантах осуществления, вводимое количество AAV вектора, содержащего трансген, составляет приблизительно $4,2 \times 10^{11}$ или $4,2 \times 10^{10}$ геномов или векторов, или копий вектора.

Настоящее изобретение относится также к способам лечения, профилактики, излечения и/или уменьшения тяжести или степени нейродегенеративного заболевания или нарушения посредством введения нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества первой композиции (например, вирусного вектора, такого как AAV), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b, и дополнительно включающим введение субъекту терапевтически эффективного количества второй композиции (например, вирусного вектора, такого как AAV), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b. В вариантах осуществления, способ включает введение терапевтически эффективного количества первой композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35, и терапевтически эффективное количество второй композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS26a или VPS26b. В вариантах осуществления, способ включает введение терапевтически

эффективного количества первой композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS26a или VPS26b, и терапевтически эффективного количества второй композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35.

Настоящее изобретение относится также к способам лечения, профилактики, излечения, и/или уменьшения тяжести или степени нейродегенеративного заболевания или нарушения посредством введения нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества первой композиции (например, вирусного вектора, такого как AAV), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b, и дополнительно включающим введение субъекту терапевтически эффективного количества второй композиции (например, вирусного вектора, такого как AAV), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b, и дополнительно включающим введение субъекту терапевтически эффективного количества третьей композиции (например, вирусного вектора, такого как AAV), содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b. В вариантах осуществления, первая, вторая и третья композиции содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35, VPS26a или VPS26b, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, каждый из первого и второго, и третьего AAV векторов независимо представляет собой вектор AAV9, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b. В некоторых вариантах осуществления, первый AAV вектор и второй AAV вектор, и третий AAV вектор вводят в одно и то же время. В некоторых вариантах осуществления, первый AAV вектор вводят до второго AAV вектора. В некоторых вариантах осуществления, второй AAV вектор вводят до третьего AAV вектора.

В некоторых вариантах осуществления, первую композицию (например, AAV вектор) вводят, как только нейродегенеративное заболевание или нарушение диагностируют или подозревают, и вторую композицию (например, AAV вектор) вводят в некоторой временной точке после первой композиции. В некоторых вариантах осуществления, вторую композицию (например, AAV вектор) вводят в пределах нескольких часов от первой композиции (например, AAV вектора). В некоторых вариантах осуществления, вторую композицию (например, AAV вектор) вводят в пределах нескольких суток от первой композиции (например, AAV вектора). В некоторых вариантах осуществления, вторую композицию (например, AAV вектор) вводят в пределах нескольких недель после первой композиции (например, AAV вектора). В некоторых вариантах осуществления, первую композицию (например, AAV вектор) и вторую композицию (например, AAV вектор) вводят одновременно в любой данной временной точке.

В некоторых вариантах осуществления, третью композицию (например, AAV вектор) вводят в некоторой временной точке после второй композиции. В некоторых вариантах осуществления, третью композицию (например, AAV вектор) вводят в пределах нескольких часов от второй композиции (например, AAV вектора). В некоторых вариантах осуществления, третью композицию (например, AAV вектор) вводят в пределах нескольких суток от второй композиции (например, AAV вектора). В некоторых вариантах осуществления, третью композицию (например, AAV вектор) вводят в пределах нескольких недель после второй композиции (например, AAV вектора).

В некоторых вариантах осуществления, первую композицию (например, AAV вектор) и вторую композицию (например, AAV вектор), и третью композицию (например, AAV вектор) вводят одновременно в любой данной временной точке, включая временную точку, когда, или после того как, нейродегенеративное заболевание или нарушение диагностируют или подозревают. В некоторых вариантах осуществления, три композиции (например, AAV векторы) присутствуют в рамках одной и той же более крупной композиции, и в некоторых вариантах осуществления, три композиции представляют собой отдельные композиции.

В вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, одну или более композиций, содержащих одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих VPS35 и VPS26b (которые предпочтительно экспрессируются в коре головного мозга), вводят субъекту, который имеет нарушение, или подвержен риску развития нарушения, при котором дефекты эндосомального транспорта возникают в первую очередь в коре головного мозга, и при котором VPS35 не затронут. Примеры кортикальных нарушений эндосомального транспорта, при которых VPS35 не затронут, включают отрицательную по биомаркеру спорадическую AD, пациентов с AD с мутациями SORL1, FTD, прионное заболевание и синдром Дауна.

В других вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, одну или более композиций, содержащих одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих VPS35 и VPS26a (который предпочтительно экспрессируется в подкорке), вводят субъекту, который имеет нарушение, или подвержен риску развития нарушения, при котором дефекты эндосомального транспорта возникают в первую очередь в подкорковых областях, такого как отрицательная по биомаркеру спорадическая PD, HSP, прионное заболевание и NCL.

В других вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, одну или более композиций, содержащих одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих VPS35, VPS26a и VPS26b, вводят субъекту, который имеет неврологическое нарушение или подвержен риску развития неврологического нарушения эндосомального транспорта, при котором заболевание является более диффузным, такого как болезнь телец Леви (LBD), прионное заболевание и ALS-FTD.

В дополнение к лечению, профилактике, излечению и/или уменьшению тяжести или степени нейродегенеративного заболевания или нарушения, в вариантах

осуществления, способы и композиции, описанные в настоящем описании, используют для лечения, профилактики, излечения и/или уменьшения тяжести других нарушений или заболеваний, которые ассоциированы с эндосомальным транспортом и дисфункцией ретромера.

Рекомбинантные AAV векторы

«Рекомбинантные AAV (rAAV) векторы», описанные в настоящем описании, как правило, включают трансген (например, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b). Трансген является фланкированным 5'- и 3'-ITR, и может являться функционально связанным с одним или несколькими регуляторными элементами, способом, который позволяет транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию трансгена в клетке из ткани-мишени. Такие регуляторные элементы могут включать промотор или энхансер, такие как промотор бета-актина курицы или энхансер цитомегаловируса, среди прочего, описанные в настоящем описании. Геном рекомбинантного AAV, как правило, инкапсидирован посредством капсидных белков (например, из такого же серотипа AAV, как тот, из которого происходят ITR, или из серотипа AAV, отличного от того, из которого происходят ITR). Затем AAV вектор можно доставлять в выбранные тип клеток или ткань - мишени. В некоторых вариантах осуществления, трансген представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную для векторных последовательностей, которая кодирует один или более из VPS35, VPS26a и/или VPS26b. Компоненты иллюстративных AAV векторов, которые можно использовать в сочетании с композициями и способами по настоящему изобретению, описаны в настоящем описании.

Любой серотип AAV или комбинацию серотипов AAV можно использовать в способах и композициях по настоящему изобретению. Поскольку способы и композиции по настоящему изобретению предназначены для лечения и излечения нейродегенеративных заболеваний или нарушений, серотипы AAV, нацеленные по меньшей мере на центральную нервную систему, могут быть использованы в некоторых вариантах осуществления и включают, но без ограничения, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAV10.

В некоторых вариантах осуществления, используют серотип AAV9, имеющий широкий тропизм. В некоторых вариантах осуществления, используют AAV2/9.

Компоненты AAV векторов

AAV векторы, описанные в настоящем описании, могут содержать цис-действующие 5'- и 3'-ITR (См., например, Carter, in «Handbook of Parvoviruses», ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). Последовательности ITR, как правило, имеют длину приблизительно 145 п.о. Предпочтительно, по существу полные последовательности, кодирующие ITR, используют в молекуле, хотя некоторая степень незначительной модификации этих последовательностей является допустимой. (См., например, тексты, такие как Sambrook et al, (1989) и Fisher et al., (1996)). Примером такой молекулы является «цис-действующая» плаزمид, содержащая трансген, в которой

выбранная последовательность трансгена и ассоциированные регуляторные элементы фланкированы последовательностями 5'- и 3'-ITR AAV. Последовательности ITR AAV могут быть получены из любого известного AAV, включая идентифицированные в настоящее время типы AAV млекопитающих.

В дополнение к элементам, идентифицированным выше для рекомбинантных AAV векторов, вектор может также включать общепринятые контрольные элементы, которые являются функционально связанными с трансгеном, способом, который позволяет его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированной вирусом. В рамках изобретения, «функционально связанные» последовательности включают как последовательности для контроля экспрессии, которые являются непрерывными с представляющим интерес геном, так и последовательности для контроля экспрессии, которые действуют в транс- или на расстоянии для контроля представляющего интерес гена. Последовательности для контроля экспрессии включают соответствующие последовательности для инициации, терминирования транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые увеличивают эффективность трансляции (т.е., консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые увеличивают стабильность белка; и когда желательно, последовательности, которые увеличивают секрецию кодированного продукта. Большое количество последовательностей для контроля экспрессии, включая промоторы, которые являются природными, конститутивными, индуцируемыми и/или тканеспецифическими, известны в данной области и могут быть использованы.

В рамках изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты (например, кодирующая последовательность) и регуляторные последовательности называют функционально связанными, когда они являются ковалентно связанными таким образом, чтобы помещать экспрессию или транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты под влияние или контроль регуляторных последовательностей. Если является желательным, чтобы последовательности нуклеиновой кислоты были транслированы в функциональный белок, две последовательности ДНК называют функционально связанными, если индукция промотора в регуляторных 5'-последовательностях приводит к транскрипции кодирующей последовательности, и если характер связи между двумя последовательностями ДНК не (1) приводит к введению мутации сдвига рамки считывания, (2) мешает способности промоторной области управлять транскрипцией кодирующих последовательностей или (3) мешает способности соответствующего транскрипта РНК подвергаться трансляции в белок. Таким образом, промоторная область является функционально связанной с последовательностью нуклеиновой кислоты, если промоторная область является способной осуществлять транскрипцию этой последовательности ДНК таким образом, что полученный транскрипт может быть

транслирован в желательный белок или полипептид. Подобным образом, две или более кодирующие области являются функционально связанными, когда они являются связанными таким образом, что их транскрипция с общего промотора приводит к экспрессии двух или более белков. В некоторых вариантах осуществления, функционально связанные кодирующие последовательности приводят к получению слитого белка. В некоторых вариантах осуществления, функционально связанные кодирующие последовательности приводят к получению функциональной РНК (например, кшРНК, мкРНК). В некоторых вариантах осуществления, функционально связанные кодирующие последовательности приводят к получению двух или более отдельных функциональных белков (например, VPS35 и VPS26a или VPS26b).

Для нуклеиновых кислот, кодирующих белки, последовательность для полиаденилирования, как правило, вставляют после последовательностей трансгена и до 3'-ITR AAV. Конструкция гAAV по настоящему изобретению может также содержать интрон, желательно, локализованный между промоторной/энхансерной последовательностью и трансгеном. Одна из возможных последовательностей интрона происходит из SV-40 и обозначена как последовательность интрона Т SV-40.

Другой элемент вектора, который можно использовать, представляет собой внутренний участок связывания рибосомы (IRES). Последовательность IRES используют для получения более одного полипептида или белка с одного транскрипта. Элемент IRES можно использовать, например, для экспрессии VPS35 и VPS26a, VPS35 и VPS26b, или VPS26a и VPS26b с одного и того же AAV вектора.

Точный характер регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии гена в клетках-хозяевах, может изменяться между видами, тканями или типами клеток, но может, как правило, включать, по необходимости, 5'-нетранскрибируемые и 5'-нетранслируемые последовательности, вовлеченные в инициацию транскрипции и трансляции, соответственно, такие как ТАТА-бокс, кэпирующая последовательность, последовательность СААТ, энхансерные элементы и т.п.. Конкретно, такие 5'-нетранскрибируемые регуляторные последовательности могут включать промоторную область, которая включает промоторную последовательность для контроля транскрипции функционально связанного гена. Регуляторные последовательности могут также включать энхансерные последовательности или вышележащие активаторные последовательности, как желательно. Векторы могут, необязательно, включать 5'-лидерные или сигнальные последовательности.

Примеры конститутивных промоторов включают, без ограничения, промотор бета-актина курицы, промотор ретровирусного LTR Вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно, с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно, с энхансером CMV), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β -актина, промотор фосфоглицерин-киназы (PGK), и промотор фактора элонгации-1 α (EF1 α) человека (Invitrogen).

Индукцируемые промоторы позволяют регуляцию экспрессии генов и могут подвергаться регуляции посредством экзогенно доставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или присутствия специфического физиологического состояния, например, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки, или только в реплицирующихся клетках. Индуцируемые промоторы и индуцируемые системы доступны из множества коммерческих источников, включая, без ограничения, Invitrogen, Clontech и Ariad. Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых посредством экзогенно доставляемых соединений, включают индуцируемый цинком промотор металлотионеина (MT) овцы, индуцируемый дексаметазоном (Dex) промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), систему промотора полимеразы T7 (WO 98/10088); промотор экдизона насекомых (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3346-3351 (1996)), репресслируемую тетрациклином систему (Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551 (1992)), индуцируемую тетрациклином систему (Gossen et al., Science 268:1766-1769 (1995)), индуцируемую RU486 систему (Wang et al., Nat. Biotech. 15:239-243 (1997) и Wang et al., Gene Ther. 4:432-441 (1997)) и индуцируемую рапамицином систему (Magari et al., J. Clin. Invest. 100:2865-2872 (1997)). Другими типами индуцируемых промоторов, которые могут являться полезными в этом контексте, являются промоторы, регулируемые посредством специфического физиологического состояния, например, температуры, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки, или только в реплицирующихся клетках.

В другом варианте осуществления, нативный промотор, или его фрагмент, можно использовать для трансгена. Нативный промотор может являться предпочтительным, когда является желательным, чтобы экспрессия трансгена имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно использовать, когда экспрессия трансгена должна регулироваться по времени или стадии развития, или тканеспецифическим образом, или в ответ на специфические стимулы транскрипции. В следующем варианте осуществления, другие нативные элементы для контроля экспрессии, такие как энхансерные элементы, участки полиаденилирования или консенсусные последовательности Козак, также можно использовать, чтобы имитировать нативную экспрессию.

В некоторых вариантах осуществления, регуляторные последовательности придают способности тканеспецифической экспрессии гена. В некоторых случаях, тканеспецифические регуляторные последовательности связываются с тканеспецифическими факторами транскрипции, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифическим образом.

В некоторых вариантах осуществления, один или более участков связывания для одной или более мкРНК включают в трансген вектора rAAV, для ингибирования экспрессии трансгена в одной или более тканях субъекта, несущего трансгены. Участки-мишени для мкРНК в мРНК могут находиться в 5'-UTR, 3'-UTR или в кодирующей области. Как правило, участок-мишень находится в 3'-UTR мРНК. Кроме того, трансген можно конструировать таким образом, чтобы множественные мкРНК регулировали мРНК

посредством узнавания одного и того же или множества участков. Присутствие множественных участков связывания мкРНК может приводить к совместному действию множественных RISC и обеспечивать высокую эффективность ингибирования экспрессии. Последовательность участка-мишени может содержать всего 5-100, 10-60 или более нуклеотидов. Последовательность участка-мишени может содержать по меньшей мере 5 нуклеотидов из последовательности участка связывания гена-мишени.

Например, участок 3'-UTR, который может ингибировать экспрессию трансгена в печени, можно включать в трансген. Это может обеспечивать преимущества для трансгенов, кодирующих терапевтические белки, которые являются токсичными для печени, поскольку большее количество введенного вируса (приблизительно 60-90%) в конечном счете обнаруживают в печени. Таким образом, супрессия экспрессии терапевтического гена в печени уменьшает нагрузку на клетки печени.

В некоторых вариантах осуществления, AAV вектор можно модифицировать, чтобы он представлял собой самокомплементарный AAV. Самокомплементарный AAV несет комплементарную последовательность трансгена (т.е., двойную копию трансгена). Самокомплементарность делает ген более стабильным после того, как он входит в клетку.

Кодирующие последовательности трансгенов

Последовательности нуклеиновой кислоты трансгенов, описанные в настоящем описании, можно конструировать на основании знания конкретной композиции (например, вирусного вектора), которая будет экспрессировать трансген. Например, один тип последовательности трансгена включает репортерную последовательность, которая при экспрессии образует поддающийся детекции сигнал. В другом примере, трансген кодирует терапевтический белок или терапевтическую функциональную РНК. В другом примере, трансген кодирует белок или функциональную РНК, предназначенные для применения для исследовательских целей, например, для получения соматической модели трансгенного животного, несущей трансген, например, для исследования функции продукта трансгена. В другом примере, трансген кодирует белок или функциональную РНК, предназначенные для применения для получения модели заболевания на животном. Подходящие кодирующие последовательности трансгенов станут очевидными специалисту в данной области.

В вариантах осуществления, трансгены кодируют функциональный белок, включая, но без ограничения, коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b. В вариантах осуществления, трансген кодирует VPS35 и либо VPS26a, либо VPS26b. В вариантах осуществления, трансген кодирует VPS35, VPS26a и VPS26b. В вариантах осуществления, трансген кодирует VPS26a и VPS26b. В вариантах осуществления, трансген кодирует только один из VPS35, VPS26a и VPS26b.

Информация об аминокислотной последовательности может быть получена из Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и указана ниже.

Ген, кодирующий человеческий коровый белок ретромера VPS35 (ID гена: 55737), можно использовать для получения трансгена, кодирующего функциональный коровый белок ретромера VPS35 (SEQ ID NO: 1):

MPTTQQSPQDEQEKLLEDAIQAVKVQSFQMKRCLDKNKLMDALKHASNMLGE
LRTSMLSPKSYELYMAISDELHYLEVYLTDEFQAKGRKVADLYELVQYAGNIIPRLYLLI
TVGVVYVKSFPQSRKDILKDLVEMCRGVQHPLRGLFLRNYLLQCTRNILPDEGEPTDEE
TTGDISDSMDFVLLNFAEMNKLWVRMQHQGHSRDREKRERERQELRILVGTNLVRLSQ
LEGVNVERYKQIVLTGILEQVVNCRDALAQEYLMECIIQVFPDEFHLQTLNPFLRACAE
HQNVNVKNIIIALIDRLALFAHREDGPGIPADIKLFDIFSQQVATVIQSRQDMPSEDVVSL
QVSLINLAMKCYPDRVDYVDKVLETTVEIFNKLNLNLEHIATSSAVSKELTRLLKIPVDTYN
NILTVLKLKHFHPLFEYFDYESRKSMSCYVLSNVLDYNTIVSQDQVDSIMNLVSTLIQD
QPDQPVEDPDPEDFADEQSLVGRFIHLLRSEDPDQQYLILNTARKHFGAGGNQRIRFTLP
PLVFAAYQLAFRYKENSKVDDKWEKKCQKIFSFAHQTISALIKAELAEPLRLFLQGAL
AAGEIGFENHETVAYEFMSQAFSLYEDEISDSKAQLAAITLIIGTFERMKCFSEENHEPLR
TQCALAASKLLKKPDQGRAVSTCAHLFWSGRNTDKNGEELHGGKRVMECLKKALKIA
NQCMDPSLQVQLFIEILNRYIIFYEKENDAVTIQVLNQLIKIREDLPNLESSEETEQINK
HFHNTLEHLRLRRESPESSEGPYIEGLIL

Ген, кодирующий человеческий коровый белок ретромера VPS26a (ID гена: 9559), можно использовать для получения трансгена, кодирующего функциональный коровый белок ретромера VPS26a (SEQ ID NO: 2):

MSFLGGFFGPICEIDIVLNDGETRKAEMKTEDGKVEKHLYFYDGESVSGKVN
AFKQPGKRLEHQGIRIEFVGQIELFNDKSNTHFVNLVKELALPGELTQSRSYDFEFMQV
EKPYESYIGANVRLRYFLKVTVRRLTDLVKEYDLIVHQLATYPDVNNSIKMEVGIEDCL
HIEFEYNKSKYHLKDVIKGIYFLLVRIKIQHMEQLIKKEITGIGPSTTTTETETIAKYEIM
DGAPVKGESIPRLFLAGYDPTPTMRDVNKKFSVRYFLNLVLVDEEDRRYFKQQEHLWR
KAPEKLRKQRTNFHQRFESPESQASAEQPEM

Ген, кодирующий человеческий коровый белок ретромера VPS26b (ID гена: 112936), можно использовать для получения трансгена, кодирующего функциональный коровый белок ретромера VPS26b (SEQ ID NO: 3):

MSFFGFGQSVEVEILLNDAESRKRAEHKTEDGKKEKYFLFYDGETVSGKVSLAL
KNPNKRLEHQGIKIEFIGQIELYYDRGNHHEFVSLVKDLARPGEITQSQAQDFEFTHVEKP
YESYTGQNVKRLRYFLRATISRRNDVVKEMDIVVHTLSTYPELNSSIKMEVGIEDCLHIE
FEYNKSKYHLKDVIKGIYFLLVRIKIKHMEIDIIKRETTGTGPNVYHENDTIAKYEIMDG
APVRGESIPRLFLAGYELTPTMRDINKKFSVRYFLNLVLIDEDEERRYFKQQEVVLWRKG
DIVRKSMHQAASQRFEGETTSLGEVRTPSQLSDNNCRQ

Относящиеся к мышам дикого типа мышинные последовательности mPHK (т.е., кодирующие последовательности) для коровых белков ретромера получены из Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и указаны ниже.

mVPS35 (SEQ ID NO: 4)

ATGCCTACAACACAGCAGTCACCCCAGGATGAGCAGGAAAAACTTTTGGGA
 TGAAGCCATCCAGGCTGTGAAGGTTTCAGTCATTCCAGATGAAAAGATGCC
 TGGACAAAAACAAGCTGATGGATGCTCTGAAGCATGCCTCCAATATGCTT
 GGAGAGCTCCGGACCTCTATGCTGTCACCAAAGAGTTACTATGAACTTTA
 TATGGCTATTTCTGATGAACTGCACTACTTGGAGGTCTACCTGACTGATG
 AATTTGCTAAAGGAAGAAAGGTGGCAGATCTCTATGAACTTGTACAGTAC
 GCGGGAAACATTATTCCAAGGCTTTATCTCTTGATCACAGTTGGAGTTGT
 ATATGTCAAGTCATTTCCCTCAATCCAGGAAAGATATTTTGAAAGATTTGG
 TAGAAATGTGCCGTGGTGTGCAGCATCCGCTAAGGGGTTTGTTCCTCGA
 AATTACCTTCTTCAGTGTACTAGGAACATTTTACCTGATGAAGGAGAGCC
 AACAGATGAAGAAACAACCTGGTGATATCAGTGATTCCATGGATTTTGTAC
 TACTCAACTTTGCAGAAATGAATAAGCTCTGGGTGCGGATGCAGCATCAA
 GGACATAGTCGAGATAGAGAAAAAAGAGAACGAGAGAGACAAGAAGTGA
 AATTTTAGTGGAACAAATTTGGTGCGCCTTAGTCAGTTGGAAGGTGTAA
 ATGTGGAACGTTACAAACAGATTGTTCTAACAGGCATTCTGGAGCAGGTT
 GTGAATTGTAGGGATGCTCTGGCTCAGGAGTATCTCATGGAGTGCATCAT
 TCAGGTTTTTCTGATGAGTTTCATCTTCAGACTTTGAATCCTTTTCTTA
 GAGCTTGTGCTGAATTACACCAAATGTAAATGTGAAAAACATAATCATT
 GCTTTAATTGACAGATTAGCTTTATTTGCTCATCGTGAAGATGGACCCGG
 AATTCCAGCTGAGATTAACTTTTTGACATATTTTCACAACAGGTGGCTA
 CAGTCATACAGTCCAGACAAGACATGCCATCAGAGGATGTTGTATCTTTA
 CAAGTCTCTCTCATTAATCTTGCTATGAAATGTTACCCTGATCGTGTGGA
 CTACGTCGATAAAGTTCTAGAAACAACAGTGGAGATATTCAATAAGCTTA
 ACCTTGAACATATTGCTACCAGTAGTGCAGTTTCAAAGGAGCTTACCAGA
 CTTTTGAAGATACCTGTTGATACTTACAACAATATCTTAACAGTATTTAA
 GTTAAAGCATTTCACCCACTTTTTGAGTACTTTGACTACGAGTCCAGAA
 AGAGCATGAGCTGTTATGTGCTTAGTAATGTTCTGGATTATAACACAGAA
 ATCGTCTCTCAGGACCAGGTAGATTCCATAATGAATTTGGTGTCCACATT
 GATTTCAGGATCAGCCAGACCAACCTGTAGAAGACCCTGATCCAGAAGACT
 TCGCTGATGAACAGAGCCTTGTTGGCCGATTTATTCATCTGCTACGTTCT
 GATGATCCTGACCAGCAGTATTTGATTTTGAATACGGCACGAAAACATTT
 TGGGGCTGGTGGAAATCAGCGGATTCGCTTCACACTGCCACCTTTGGTAT
 TTGCAGCTTACCAGTTGGCTTTTCGATACAAAGAGAATTCCCAAATGGAT
 GACAAGTGGGAAAAGAAATGCCAGAAGATATTTTCATTTGCTCACCAGAC
 TATCAGTGCTTTGATTAAAGCTGAGCTGGCTGAATTACCACTGAGACTTT
 TTCTTCAAGGAGCATTAGCTGCTGGAGAAATTGGCTTTGAAAATCATGAA
 ACAGTAGCATATGAATTTATGTCCCAGGCATTTTCTCTATATGAAGATGA
 AATCAGTGATTCTAAAGCACAGCTGGCTGCTATCACCTTGATCATCGGTA
 CTTTTGAGAGGATGAAATGCTTCAGTGAAGAGAATCATGAACCTTGAGA
 ACTCAGTGTGCACTTGCTGCATCAAACTTCTGAAAAAACCAGATCAAGG

CCGAGCCGTGAGCACATGTGCGCATCTCTTTTGGTCTGGCCGAAACACAG
 AAAAAATGGGGAAGAGCTTCATGGAGGTAAGGGTCATGGAGTGCCTA
 AAGAAGGCACTAAAAATAGCAAATCAGTGCATGGACCCCTCTCTACAAGT
 TCAGCTCTTTATAGAGATTCTGAACAGGTACATCTATTTCTATGAAAAAG
 AAAATGATGCGGTAACCATTCAAGTCTTGAACCAACTTATTCAAAAAGATT
 CGAGAAGATCTCCCAAATCTTGAGTCCAGTGAAGAAACAGAACAAATAAA
 CAAGCATTTTCAACAACATTGGAGCACTTGCCTCAAGACGGGAATCAC
 CAGAGTCTGAGGGGCCAATCTATGAAGGTCTCATCCTTTAA

Изоформа A mVPS26a (SEQ ID NO: 5)

ATGAGTTTTCTTGGAGGCTTTTTTGGTCCCATTTGTGAGATTGATGTTGCCCTT
 A ATGATGGGGAAACCAGGAAAATGGCAGAAATGAAAAGTGGAGATGGCAAA
 GTAGAAAAACACTATCTCTTCTATGATGGCGAGTCTGTCTCAGGAAAGGT
 AAACCTAGCCTTTAAGCAGCCTGGAAAGAGGCTAGAGCATCAAGGAATTA
 GAATTGAATTTGTAGGTCAAATTGAGCTTTTCAATGACAAGAGTAATACT
 CATGAATTTGTAAACCTAGTGAAGGAACTAGCCTTGCCTGGAGAACTGAC
 TCAGAGCAGAAGCTATGACTTTGAATTTATGCAAGTTGAAAAGCCATATG
 AGTCATACATCGGTGCCAATGTCCGCCTGAGGTATTTTCTTAAGGTGACA
 ATTGTGAGAAGATTGACAGACTTAGTGAAAGAGTACGATCTTATTGTTCA
 TCAGCTAGCCACCTATCCTGATGTCAACAACCTCTATTAATAAGTCCAAGTAT
 GCATTGAAGACTGTCTGCACATAGAGTTTGAATATAATAAGTCCAAGTAT
 CATTTAAAGGATGTAATTGTTGGAAAAATTTACTTCTTATTAGTAAGAAT
 AAAAATACAACACATGGAATTACAGCTGATCAAGAAAGAGATCACAGGAA
 TTGGACCCAGCACCAACAGAGACAGAAACAATCGCTAAGTATGAAATA
 ATGGATGGGGCGCCAGTAAAAGGAGAATCTATTCCGATAAGATTGTTCTT
 AGCAGGGTATGACCCAACCCCCACGATGAGAGATGTGAACAAGAAGTTTT
 CAGTAAGGTACTTTCTAAACCTCGTGCTTGTTGATGAGGAGGACCGAAGG
 TACTTCAAGCAGCAGGAGATCATCCTGTGGAGAAAAGCACCCGAGAACT
 GAGAAAACAGAGGACGAACTTTCACCAGCGGTTTGAATCTCCAGACTCGC
 AGGCCTCTGCGGAGCAGCCTGAGATGTAA

mVPS26b (SEQ ID NO: 6)

ATGAGCTTCTTCGGCTTCGGGCAGAGCGTGGAGGTGGAAATCTTGCTGAATG
 ATGCG
 GAGAGTAGGAAGCGAGCGGAGCACAAGACTGAGGACGGGAAGAAGGAGAAATATT
 TCCTCTTCTACGACGGGGAAACCGTCTCGGGGAAAGTGAGCCTATCACTGAAGAAC
 CCCAACAAGCGACTAGAGCACCAGGGCATCAAGATCGAGTTCATTGGGCAGATCGA
 ACTCTACTATGACCGTGGGAACCACCATGAGTTTGTGTCTTTGGTGAAGGACCTGGC
 TCGGCCAGGAGAGATCACCAATCGCAGGCCTTCGACTTTGAGTTCACCCATGTGGA
 AAAGCCGTATGAATCCTACACAGGACAGAATGTGAAGCTCCGCTATTTCTTCGAGC
 CACCATCAGCCGCCGCCTCAATGATGTTGTTAAAGAGATGGACATTGTAGTTCACAC
 ACTTAGCACATACCCCGAGCTGAACTCATCCATCAAGATGGAAGTTGGCATTGAGG

ATTGCCTGCACATTGAATTTGAGTACAACAAATCCAAATACCACTTGAAAGATGTCA
 TTGTAGGGAAGATATACTTCCTGCTGGTGAGAATCAAGATCAAGCACATGGAGATA
 GACATCATCAAACGAGAGACAACAGGCACGGGTCCCAACGTGTACCACGAGAACG
 ACACAATAGCGAAGTATGAGATCATGGACGGGGCACCAGTCCGAGGTGAGTCCATC
 CCCATCAGGCTCTTCCTGGCAGGGTATGAGCTCACACCCACCATGCGTGACATAAAT
 AAGAAGTTCTCTGTGCGCTATTACCTCAACTTGGTGCTGATAGATGAGGAGGAACGG
 CGCTACTTCAAGCAGCAGGAAGTGGTGTGTGGCGGAAGGGTGACATCGTACGGAA
 GAGCATGTCCCACCAGGCAGCCATTGCCTCACAGCGCTTCGAGGGGCACAACCTCCCT
 GGGTGAGGTGCGGACCCCTGGCCAACGTGTCTGACAACAACAGCAGGCAGTAG

Оптимизация по кодонному составу кодирующих последовательностей трансгенов

Оптимизация по кодонному составу кодирующих последовательностей трансгенов может увеличивать эффективность генотерапии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, используют нуклеиновую кислоту, которая является по меньшей мере на 70% идентичной кодирующей последовательности трансгена, кодирующей терапевтический белок (например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая является на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты).

Инструменты для оптимизации по кодонному составу известны в данной области.

Иллюстративные оптимизированные по кодонному составу нуклеиновые кислоты являются следующими.

mVPS35, оптимизированный по кодонному составу (SEQ ID NO: 7)

ATGCCCACAACACAGCAGAGCCACAGGATGAACAGGAAAAGCTGCTGGAT
 GAGGCCATCCAGGCTGTGAAAGTGCAGTCCTTCCAGATGAAAAGATGTCTGGATAA
 GAATAAGCTGATGGACGCCCTGAAGCATGCCAGCAACATGCTGGGCGAGCTGAGGA
 CCAGCATGCTGTCTCCCAAGTCCTACTACGAGCTGTACATGGCCATTTCTGACGAGC
 TGCACTACCTGGAGGTGTACCTCACAGATGAGTTCGCCAAGGGGAGAAAGGTGGCC
 GATCTGTATGAGCTGGTGCAGTATGCTGGCAACATCATCCCCAGGCTGTACCTGCTG
 ATCACCGTGGGCGTGGTGTATGTGAAGAGCTTCCCCAGTCTAGAAAGGATATCCTG
 AAGGACCTGGTGGAAATGTGCAGGGGAGTGCAGCATCCTCTGAGAGGCCTGTTTCT
 GAGAACTACCTGCTGCAGTGTACCAGGAATATCCTGCCCCGACGAAGGCGAGCCTA
 CTGATGAAGAAACAACCGGCGACATCAGCGACAGCATGGATTTTGTGCTGCTGAAC
 TTCGCCGAGATGAACAACTGTGGGTGAGAATGCAGCACCAGGGACACAGCAGGG
 ACAGAGAGAAGAGAGAGAGGGAGAGACAGGAGCTGAGAATCCTGGTGGGCACCAA
 CCTGGTGAGGCTGTCCCAGCTGGAGGGCGTGAATGTGGAGAGATATAAGCAGATTG
 TGCTGACAGGAATCCTGGAGCAGGTGGTGAACCTGCAGAGATGCCCTGGCCCAGGAG
 TATCTGATGGAATGCATCATTCAGGTGTTCCCAGATGAGTTCCACCTGCAGACACTG
 AACCTTTTCCTGAGGGCCTGCGCCGAGCTGCATCAGAACGTGAACGTCAAGAACAT
 CATCATTGCTCTGATTGACAGGCTGGCCCTGTTTGCCCATAGAGAGGATGGACCTGG

CATCCCAGCCGAGATCAAGCTGTTTGACATTTTCAGCCAGCAGGTGGCCACCGTGAT
 CCAGTCTAGGCAGGACATGCCTTCCGAAGATGTGGTGAGCCTGCAGGTGTCCCTGAT
 CAATCTGGCCATGAAGTGTTACCTTGATAGAGTGGATTACGTGGACAAGGTGCTGG
 AGACCACAGTGGAGATCTTCAACAAGCTGAACCTGGAGCACATCGCCACTTCTTCTG
 CTGTGTCTAAAGAACTGACAAGACTGCTGAAGATCCCTGTGGACACCTACAACAAC
 ATTCTGACCGTGCTGAAGCTGAAACACTTCCATCCACTGTTCGAGTACTTTGATTAT
 GAGAGCAGGAAGTCCATGAGCTGCTACGTGCTGAGCAATGTGCTGGACTACAATAC
 AGAAATCGTGTCCCAGGATCAGGTGGACAGCATCATGAATCTGGTGAGCACACTGA
 TCCAGGACCAGCCTGATCAGCCAGTGGAGGACCCCGACCCTGAGGACTTCGCTGAC
 GAGCAGAGCCTGGTGGGCAGGTTCATCCACCTGCTGAGGTCTGATGATCCAGACCA
 GCAGTACCTGATCCTGAACACCGCCAGGAAGCACTTTGGAGCCGGAGGCAACCAGA
 GGATCAGATTCACCCTGCCTCCCCTGGTGTTTGCCGCCTACCAGCTGGCTTTTCAGAT
 ACAAGGAAAATTCCCAGATGGATGACAAGTGGGAGAAAAAATGCCAGAAGATCTTT
 TCTTTTGCTCACCAGACCATCTCTGCCCTGATCAAAGCTGAGCTGGCTGAACTGCCA
 CTGAGACTGTTCTCCAGGGGGGCCCTGGCTGCCGGGGAGATCGGCTTTGAGAACCAT
 GAGACTGTGGCCTATGAATTCATGTCTCAGGCCTTCTCTCTGTACGAAGATGAGATC
 AGCGACAGCAAGGCTCAGCTGGCTGCTATCACACTGATCATTGGAACATTTGAAAG
 GATGAAGTGCTTCTCCGAGGAAAACCACGAGCCACTGAGAACACAGTGTGCACTGG
 CCGCCTCCAAGCTGCTGAAGAAGCCTGACCAGGGCAGAGCCGTGTCTACCTGTGCC
 CACCTGTTCTGGAGCGGAAGAAACACAGACAAAAATGGAGAGGAGCTGCATGGCG
 GCAAGAGGGTGATGGAGTGCCTGAAGAAAGCCCTGAAGATTGCCAACCAAGTGCATG
 GACCCAAGCCTGCAGGTGCAGCTGTTTCATCGAGATCCTGAACAGGTACATCTACTTC
 TACGAGAAGGAGAATGACGCCGTGACCATTGAGGTGCTGAATCAGCTGATCCAGAA
 AATCAGGGAAGACCTGCCCAACCTGGAGAGCTCTGAAGAGACAGAGCAGATCAAC
 AAGCATTTTCACAACACTCTGGAACATCTGAGGTCCAGGAGGGAGTCCCCAGAGTC
 TGAGGGACCCATCTATGAGGGGCTGATCCTGTGA

mVPS26a, изоформа A, оптимизированная по кодонному составу (SEQ ID NO: 8)

ATGAGCTTCCTGGGCGGCTTCTTCGGCCCCATCTGTGAGATCGACGTGGCCCT
 GAACGACGGCGAGACCAGAAAGATGGCCGAGATGAAGACAGAGGATGGCAAGGTG
 GAGAAGCACTACCTGTTCTACGACGGAGAGTCTGTGTCCGGCAAGGTGAACCTGGC
 CTTCAAGCAGCCTGGGAAGAGGCTGGAGCACCAGGGCATCAGAATCGAGTTCGTGG
 GCCAGATCGAGCTGTTCAACGACAAGAGCAACACCCACGAGTTTGTGAACCTGGTG
 AAGGAGCTGGCTCTGCCTGGCGAGCTGACCCAGAGCAGAAGCTACGACTTCGAGTT
 CATGCAGGTGGAGAAGCCTTACGAGAGCTACATCGGCGCCAACGTGAGACTGAGAT
 ACTTCCTGAAGGTGACCATCGTGAGGAGACTGACCGACCTGGTGAAGGAGTATGAC
 CTGATCGTGCACCAGCTGGCCACCTACCCTGACGTGAACAACAGCATCAAGATGGA
 GGTGGGCATCGAGGACTGCCTGCACATCGAGTTCGAGTACAACAAGTCCAAGTACC
 ACCTGAAGGACGTGATCGTGGGCAAGATCTACTTCCTGCTGGTGAGGATCAAGATC
 CAGCACATGGAGCTGCAGCTGATCAAGAAGGAGATCACCGGCATCGGCCCTTCCAC
 AACCACCGAGACAGAGACAATCGCCAAGTACGAGATCATGGACGGCGCCCCTGTGA

AGGGCGAGAGCATCCCTATCAGGCTGTTCTGGCCGGCTACGACCCTACCCCTACCA
TGAGAGACGTGAACAAGAAGTTCAGCGTGAGGTACTTCCTGAACCTGGTGCTGGTG
GACGAGGAGGACAGAAGATACTTCAAGCAGCAGGAGATCATCCTGTGGAGGAAGG
CCCCTGAGAAGCTGAGGAAGCAGAGGACCAACTTCCACCAGAGATTCGAGTCCCCT
GACAGCCAGGCCAGCGCCGAGCAGCCAGAGATGTGA

mVPS26b, оптимизированный по кодонному составу (SEQ ID NO: 9)

ATGAGTTTTTTTTGGGTTTGGACAGTCAGTGGAGGTGGAGATCCTGCTGAACG
ACGCCGAGAGCAGGAAGAGGGCCGAGCACAAGACAGAGGATGGCAAGAAGGAGA
AGTACTTCCTGTTCTACGACGGAGAGACCGTGAGCGGCAAGGTGTCCCTGAGCCTG
AAGAACCCAAACAAGAGACTGGAGCACCAGGGCATCAAGATCGAGTTCATCGGCCA
GATCGAGCTGTACTACGACAGGGGCAACCACCACGAGTTCGTGAGCCTGGTGAAGG
ACCTGGCCAGACCTGGCGAGATCACCCAGAGCCAGGCCTTCGACTTCGAGTTCACCC
ACGTGGAGAAGCCTTACGAGAGCTACACAGGCCAGAACGTGAAGCTGAGGTACTTC
CTGAGAGCCACCATCAGCAGAAGACTGAACGACGTGGTGAAGGAGATGGACATCGT
GGTGCACACCCTGAGCACCTACCCTGAGCTGAACTCTTCCATCAAGATGGAGGTGG
GCATCGAGGACTGCCTGCACATCGAGTTCGAGTACAACAAGAGCAAGTACCACCTG
AAGGACGTGATCGTGGGCAAGATCTACTTCCTGCTGGTGAAGATCAAGATCAAGCA
CATGGAGATCGACATCATCAAGAGAGAGACCACAGGCACAGGCCCTAACGTGTACC
ACGAGAACGACACCATCGCCAAGTACGAGATCATGGACGGCGCCCCTGTGAGAGGC
GAGAGCATCCCTATCAGGCTGTTCTGGCCGGCTACGAGCTGACCCCTACCATGAGG
GACATCAACAAGAAGTTCAGCGTGAGATACTACCTGAACCTGGTGCTGATCGATGA
GGAGGAGAGAAGATACTTCAAGCAGCAGGAGGTGGTGCTGTGGAGAAAGGGCGAC
ATCGTGAGAAAGAGCATGAGCCACCAGGCCGCCATCGCCAGCCAGAGATTCGAGGG
CACCACCAGCCTGGGCGAGGTGAGGACCCCTGGCCAGCTGAGCGACAACAACAGCA
GACAGTGA

Кодирующая последовательность человеческого VPS35 (с конкретными кодонами, модифицированными для удаления участков рестрикции) (SEQ ID NO: 10)

ATGCCTACAACACAGCAGTCCCCTCAGGATGAGCAGGAAAAGCTCTTGGATG
AAGCCATACAGGCTGTGAAGGTCCAGTCATTCCAAATGAAGAGATGCCTGGACAAA
AACAAGCTCATGGATGCTCTAAAACATGCTTCTAATATGCTTGGTGAACCTCCGGACT
TCTATGTTATCACCAAAGAGTTACTATGAACTTTATATGGCCATTTCTGATGAACTGC
ACTACTTGGAGGTCTACCTGACAGATGAGTTTGCTAAAGGAAGGAAAGTGGCAGAT
CTCTACGAACTTGTACAGTATGCTGGAAACATTATCCCAAGGCTTTACCTTCTGATC
ACAGTTGGAGTTGTATATGTCAAGTCATTTCTCAGTCCAGGAAGGATATTCTGAAA
GATTTGGTAGAAATGTGCCGTGGTGTGCAACATCCCTTGAGGGGTCTGTTTCTTCGA
AATTACCTTCTTCAGTGTACCAGAAATATCTTACCTGATGAAGGAGAGCCAACAGAT
GAAGAAACAACCTGGTGACATCAGTGATTCCATGGATTTCTGTAAGTCAACTTTGCA
GAAATGAACAAGCTCTGGGTGCGAATGCAGCATCAGGGACATAGCCGAGATAGAG
AAAAAAGAGAACGAGAAAGACAAGAACTGAGGATTCTAGTGGGAACAAATTTGGT
GCGCCTCAGTCAGTTGGAAGGTGTAAATGTGGAACGTTACAAACAGATTGTTCTGAC

TGGCATATTGGAGCAAGTTGTAAACTGTAGGGATGCTTTGGCTCAAGAATATCTCAT
 GGAGTGTATTATTCAGGTATTCCCTGATGAATTTACCTCCAGACTTTGAATCCTTTC
 CTTCGGGCTGTGCTGAGTTACACCAGAATGTAAATGTGAAGAACATAATCATTGCT
 TTAATTGATAGATTAGCTTTATTTGCTCACCGTGAAGATGGACCTGGAATCCCAGCG
 GATATTAAACTATTCGATATATTCTCACAGCAGGTGGCTACAGTGATACAGTCAAGA
 CAAGACATGCCTTCAGAGGATGTTGTATCTTTACAAGTATCTCTTATTAATCTTGCCA
 TGAAATGTTACCCTGATCGTGTGGACTATGTTGATAAAGTACTAGAAACAACAGTGG
 AGATATTCAATAAGCTCAACCTTGAACATATTGCTACCAGTAGTGCAGTTTCAAAGG
 AACTCACCAGACTATTGAAAATACCAGTTGACACTTACAACAATATATTAACAGTCT
 TGAAATTAACATTTCCACCCACTCTTTGAGTACTTTGACTACGAGTCCAGAAAGA
 GCATGAGTTGTTATGTGCTTAGTAATGTTCTGGATTATAACACAGAAATTGTATCTC
 AAGACCAGGTGGATTCCATAATGAATTTGGTATCCACGTTGATTCAAGATCAGCCAG
 ATCAACCTGTAGAAGACCCTGATCCAGAAGATTTGCTGATGAGCAGAGCCTTGTG
 GGCCGCTTCATTCATCTGCTGCGCTCTGAGGACCCTGACCAGCAGTACTTGATATTG
 AACACAGCACGAAAACATTTCCGGAGCTGGTGGAAATCAGCGGATTCGCTTCACACT
 GCCACCTTTGGTATTTGCAGCTTACCAGCTGGCATTTCGATATAAAGAGAACTCTAA
 AGTGGATGACAAATGGGAAAAGAAATGCCAGAAGATATTCTCATTTGCCACCAGA
 CTATCAGTGCTTTGATCAAAGCAGAGCTGGCAGAATTGCCGTTAAGACTATTCCTTC
 AAGGAGCACTAGCTGCTGGGGAAATTGGATTTGAAAATCATGAAACAGTCGCATAT
 GAATTCATGTCCCAGGCATTCTCTCTGTATGAAGATGAAATCAGCGATTCCAAAGCA
 CAGCTTGCTGCCATCACCTTGATCATTGGCACATTTGAAAGGATGAAGTGCTTCAGT
 GAAGAGAATCATGAACCTCTGAGGACTCAGTGTGCCCTTGCTGCATCCAAACTTCTA
 AAGAAACCTGATCAGGGCCGAGCTGTGAGCACCTGTGCACATCTCTTCTGGTCTGGC
 AGAAACACGGACAAAAATGGGGAGGAGCTTCACGGAGGCAAGAGGGTAATGGAGT
 GCCTAAAAAAAGCTCTAAAAATAGCAAATCAGTGCATGGACCCCTCTCTACAAGTG
 CAGCTATTCATAGAAATTCTGAACAGATATATCTACTTCTATGAAAAGGAAAATGAT
 GCGGTAACAATTCAGGTATTAACCAGCTTATCCAAAAGATTCGAGAAGACCTCCC
 GAATCTTGAATCCAGTGAAGAAACAGAGCAGATTAACAAACACTTTCATAACACAC
 TGGAGCATTTGCGCTTGCGGCGGGAATCACCAGAATCCGAGGGGCCAATTTATGAA
 GGACTCATCCTTTAA

Способы введения и дозирования

Настоящее изобретение относится к гAAV векторам для применения в способах лечения, профилактики и/или излечения нейродегенеративного заболевания или нарушения, и/или облегчения у субъекта по меньшей мере одного из симптомов, ассоциированного с нейродегенеративным заболеванием и/или нарушением. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение гAAV вектора, кодирующего один или более терапевтических полипептидов или белков, в фармацевтически приемлемом носителе субъекту в количестве и на период времени, достаточные для лечения, предотвращения и/или излечения нейродегенеративного заболевания или нарушения у

субъекта, имеющего или как подозревают, имеющего такое нейродегенеративное заболевание или нарушение.

гAAV векторы можно доставлять субъекту в композициях, в соответствии с любыми подходящими способами, известными в данной области. гAAV вектор, предпочтительно, суспендированный в физиологически совместимом носителе (например, в композиции), можно вводить субъекту. В конкретных вариантах осуществления, композиции могут содержать гAAV вектор отдельно, или в комбинации с одним или более другими векторами (например, вторым гAAV вектором, имеющим один или более отличных трансгенов). В одном варианте осуществления, композиция может содержать вектор гAAV9, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный белок, включая, но без ограничения, коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b. В одном варианте осуществления, композиция может содержать вектор гAAV2/9, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный белок, включая, но без ограничения, коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b. В одном варианте осуществления, композиция может содержать вектор гAAV10 или гAAV2/10, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую трансген, кодирующий функциональный белок, включая, но без ограничения, коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b.

Пригодные носители может легко выбирать специалист в данной области, принимая во внимание показание, на которое нацелен гAAV. Например, один пригодный носитель включает солевой раствор, который можно формулировать с использованием множества забуферивающих растворов (например, фосфатно-солевого буфера). Другие иллюстративные носители включают стерильный солевой раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло и воду. Выбор носителя не является ограничением настоящего изобретения.

Необязательно, композиции, описанные в настоящем описании, могут содержать, в дополнение к гAAV и носителю(ям), другие общепринятые фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы. Пригодные иллюстративные консерванты включают хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновую кислоту, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол и параклорфенол. Пригодные химические стабилизаторы включают желатин и альбумин.

В некоторых вариантах осуществления, композиции гAAV формулируют для уменьшения агрегации частиц AAV в композиции, в частности, когда присутствуют высокие концентрации гAAV (например, когда присутствуют высокие концентрации 10^{13} ГК/мл или более). Способы уменьшения агрегации гAAV хорошо известны в данной области и, включают, например, добавление поверхностно-активных веществ, коррекцию

pH и коррекцию концентрации соли (см., например, Wright, et al., *Molecular Therapy* 12:171-178 (2005)).

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления для немедленного использования стерильных пригодных для инъекции растворов или дисперсий. Дисперсии можно также получать в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и применения, эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Во многих случаях, форма является стерильной и текучей в такой степени, чтобы ее можно было просто вводить с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения, и должна быть защищена против контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытий, таких как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала, и т.п. Во многих случаях, может являться предпочтительным включение изотонических средств, например, сахаров или хлорида натрия. Длительной абсорбции пригодных для инъекции композиций можно достигать посредством использования в композициях средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Для введения пригодного для инъекции водного раствора, например, раствор может быть соответствующим образом забуферен, при необходимости, и жидкий разбавитель сначала делают изотоническим с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы являются особенно подходящими для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим, стерильная водная среда, которую можно использовать, известна специалисту в данной области. Например, одну дозу можно растворять в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлять к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса, либо инъектировать в предложенном участке инфузии. Некоторая изменчивость доз обязательно будет возникать в зависимости от состояния хозяина. Лицо, ответственное за введение, в любом случае, определяет подходящую дозу для индивидуального хозяина.

Стерильные пригодные для инъекции растворы получают посредством введения активного gAAV в необходимом количестве в подходящем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными в настоящем описании, по необходимости, с

последующей стерилизацией посредством фильтрации. Как правило, дисперсии получают посредством введения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, содержащий базовую диспергирующую среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных пригодных для инъекции растворов, предпочтительными способами получения являются способы вакуумной сушки и лиофилизации, посредством которых получают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желательного ингредиента из их предварительно стерилизованного посредством фильтрации раствора.

В дополнение к способам доставки, описанным выше, следующие способы также предусматривают в качестве альтернативных способов доставки композиций гAAV хозяину. Сонофорез (т.е., ультразвук) использован и описан в Патенте США No. 5656016 в качестве устройства для повышения скорости и эффективности проникновения лекарственного средства в и через систему кровообращения. Другие альтернативы доставки лекарственных средств предусматривают внутрикостную инъекцию (Патент США No. 5779708), устройства на основе микрочипов (Патент США No. 5797898), офтальмологические составы, чрескожные матрицы (Патенты США No. 5770219 и 5783208) и управляемую обратной связью доставку (Патент США No. 5697899).

гAAV вводят посредством способа введения и в достаточных количествах для трансфекции клеток желательной ткани и обеспечения достаточных уровней переноса и экспрессии генов без излишних неблагоприятных эффектов. Общепринятые и фармацевтически приемлемые способы введения включают, но без ограничения, прямую доставку в выбранную ткань (например, интрацеребральное введение, интратекальное введение), внутривенное, пероральное, ингаляционное введение (включая интраназальную и интратрахеальную доставку), внутриглазное, внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутрикожное и другие родственные способы введения. Способы введения можно комбинировать, если желательно. Режим введения зависит от нескольких факторов, включая скорость метаболизма терапевтической композиции в сыворотке или ткани, уровень симптомов и доступность клеток-мишеней в биологическом матриксе. Предпочтительно, режим введения доставляет достаточное количество терапевтической композиции для эффекта улучшения целевого состояния заболевания, при этом одновременно минимизируя нежелательные побочные эффекты. Соответственно, количество для биологической доставки частично зависит от конкретной терапевтической композиции и тяжести состояния, подвергаемого лечению.

Настоящее изобретение относится к стабильным фармацевтическим композициям, содержащим вирионы гAAV. Композиции остаются стабильными и активными, даже когда их подвергают воздействию циклов замораживания/оттаивания и когда их хранят в контейнерах, изготовленных из различных материалов, включая стекло.

Соответствующие дозы могут зависеть от подвергаемого лечению субъекта (например, человека или не относящегося к человеку примата или другого млекопитающего), возраста и общего состояния подлежащего лечению субъекта, тяжести

состояния, подвергаемого лечению, способа введения вирионов гAAV, среди прочих факторов. Соответствующее эффективное количество может легко определить специалист в данной области.

Дозу вирионов гAAV, необходимую для достижения желаемого эффекта или «терапевтического эффекта», например, единицы дозы в геномах вектора/на килограмм массы тела (гв/кг), можно менять на основании нескольких факторов, включая, но без ограничения: способ введения гAAV; уровень экспрессии гена или РНК, необходимый для достижения терапевтического эффекта; конкретное заболевание или нарушение, подвергаемое лечению; и стабильность гена или продукта РНК. Специалист в данной области может легко определить диапазон дозы вирионов гAAV для лечения субъекта, имеющего конкретное заболевание или нарушение, на основании вышеупомянутых факторов, так же как других факторов, которые хорошо известны в данной области. эффективное количество гAAV, как правило, лежит в диапазоне от приблизительно 10 мкл до приблизительно 100 мл раствора, содержащего от приблизительно 10^9 до 10^{16} геномных копий, на субъекта. Можно использовать другие объемы раствора. Используемый объем, как правило, зависит, среди прочего, от размеров субъекта, дозы гAAV и способа введения. Например, для интратекального или интрацеребрального введения можно использовать объем в диапазоне 1 мкл - 10 мкл или 10 мкл - 100 мкл. Для внутривенного введения, можно использовать объем в диапазоне 10 мкл - 100 мкл, 100 мкл - 1 мл, 1 мл - 10 мл или более. В некоторых случаях, доза между приблизительно 10^{10} - 10^{12} геномных копий гAAV на субъекта является подходящей. В конкретных вариантах осуществления, 10^{12} геномных копий гAAV на субъекта является эффективной для нацеливания на желательные ткани. В некоторых вариантах осуществления, гAAV вводят в дозе 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} геномных копий на субъекта. В некоторых вариантах осуществления, гAAV вводят в дозе 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} или 10^{14} геномных копий на кг.

Таким образом, «терапевтически эффективное количество» может попадать в относительно широкий диапазон, который может быть определен посредством клинических испытаний. Например, для инъекции *in vivo*, т.е., инъекции непосредственно субъекту, терапевтически эффективная доза может составлять порядка от приблизительно 10^5 до 10^{16} вирионов гAAV, более предпочтительно, 10^8 - 10^{14} вирионов гAAV. Для трансдукции *in vitro*, эффективное количество вирионов гAAV, подлежащее доставке в клетки, может составлять порядка 10^5 - 10^{13} , предпочтительно 10^8 - 10^{13} вирионов гAAV. Если композиция содержит трансдуцированные клетки, подлежащие доставке обратно субъекту, количество трансдуцированных клеток в фармацевтических композициях может составлять от приблизительно 10^4 до 10^{10} клеток, более предпочтительно 10^5 - 10^8 клеток. Доза, разумеется, зависит от эффективности трансдукции, силы промотора, стабильности матричной РНК и кодируемого ею белка. Эффективные дозы может легко установить специалист в данной области, посредством общепринятых исследований, определяющих кривые зависимости ответа от дозы.

Режим дозирования может представлять собой расписание с однократной дозой или расписание с множественными дозами, чтобы в конечном счете доставить указанное выше количество. Кроме того, субъекту можно вводить так много доз, как необходимо. Таким образом, субъекту можно вводить, например, 10^5 - 10^{16} вирионов rAAV в однократной дозе, или в двух, трех, четырех, пяти, шести или более дозах, которые в совокупности обеспечивают доставку, например, 10^5 - 10^{16} вирионов rAAV. Специалист в данной области может легко определить подходящее количество доз для введения.

Фармацевтические композиции могут, таким образом, содержать достаточно генетического материала для продукции терапевтически эффективного количества представляющего интерес белка, т.е., количества, достаточного для уменьшения или облегчения симптомов рассматриваемого состояния заболевания, или количества, достаточного для обеспечения желательного преимущества. Таким образом, вирионы rAAV могут присутствовать в рассматриваемых композициях в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического эффекта при введении в одной или более дозах. Вирионы rAAV можно предоставлять в форме лиофилизированных препаратов и разводить в стабилизирующих вирионы композициях для немедленного или будущего применения. Альтернативно, вирионы rAAV можно предоставлять немедленно после получения и хранить для будущего применения.

Фармацевтические композиции могут также содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители. Такие эксципиенты включают любое фармацевтическое средство, которое само по себе не индуцирует продукцию антител, вредных для индивидуума, подвергаемого введению композиции, и которое можно вводить без излишней токсичности. Фармацевтически приемлемые эксципиенты включают, но без ограничения, жидкости, такие как вода, солевой раствор, глицерин и этанол. В них могут быть включены фармацевтически приемлемые соли, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т.п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Кроме того, в таких носителях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие средства, вещества для забуферивания pH, и т.п. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых наполнителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences и U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Составы терапевтических и диагностических средств можно получать посредством смешивания с приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей водных растворов или суспензий.

Токсичность и терапевтическую эффективность терапевтических композиций, вводимых отдельно или в комбинации с другим средством, можно определять посредством стандартных фармацевтических способов в культурах клеток или у экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной в 50% популяции). Соотношение

доз, оказывающих токсический и терапевтический эффекты, представляет собой терапевтический индекс (LD_{50}/ED_{50}). В конкретных аспектах, терапевтические композиции, имеющие высокие терапевтические индексы, являются желательными. Данные, полученные в результате этих анализов культур клеток и исследований на животных, можно использовать при составлении диапазона доз для применения у человека. Дозы таких соединений предпочтительно находятся в рамках диапазона концентраций в кровотоке, которые включают ED_{50} с небольшой токсичностью или без токсичности. Дозу можно менять в рамках этого диапазона, в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения.

Определение соответствующей дозы проводит медицинский работник, например, с использованием параметров или факторов, влияние которых на лечение известно или подозревается в данной области техники. Дозирование можно начинать с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, и его можно увеличивать с небольшими приращениями до тех пор, пока не будет достигнут желательный или оптимальный эффект, относительно любых отрицательных побочных эффектов. Важные диагностические показатели включают показатели симптомов, например, воспаления, или уровня продуцируемых воспалительных цитокинов. Как правило, является желательным, чтобы биологическое средство, которое будут использовать, происходило из того же вида, что и животное, намеченное для лечения, таким образом, минимизируя любой иммунный ответ на реагент.

Предпочтительным способом введения AAV является внутривенный. Другие способы введения векторов гAAV, описанных в настоящем описании, включают интракраниальный, интрапаренхимальный, интраспинальный.

Предпочтительная доза лежит в диапазоне суммарного введения от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 8×10^{11} , от приблизительно 2×10^{10} до приблизительно 6×10^{11} , от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 4×10^{11} геномов или вирусных копий (вк). Предпочтительная доза представляет собой суммарное введение приблизительно 4×10^{11} геномов или вирусных копий (вк) гAAV.

Если используют более одного гAAV, предпочтительная суммарная доза вектора лежит в диапазоне суммарного введения от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 6×10^{11} , от приблизительно 2×10^{10} до приблизительно 5×10^{11} , от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 4×10^{11} геномов или вирусных копий (вк). Предпочтительная доза суммарного вектора составляет приблизительно 3×10^{11} . AAV можно вводить в равных количествах, например, в соотношении 50/50, или в соотношениях приблизительно 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 25/75, 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10 и 95/5.

Дозы можно корректировать для оптимизации эффектов у субъекта. Кроме того, субъектов можно мониторировать по улучшению их состояния до увеличения дозы. Ответ субъекта на терапевтическое введение гAAV можно мониторировать посредством наблюдения у субъекта силы и контроля мышц, и подвижности, так же как изменений

роста и массы. Если один или более из этих параметров увеличиваются после введения, лечение можно продолжать. Если один или более из этих параметров остается неизменным или уменьшается, дозу можно увеличивать.

Наборы

Настоящее изобретение относится также к наборам, содержащим компоненты комбинаций, описанных в настоящем описании, в форме набора. Набор по настоящему изобретению включает один или более компонентов, включая, но без ограничения, вирусные векторы (например, AAV векторы)), описанные в настоящем описании. Наборы могут дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель, как обсуждают в настоящем описании. Вирусный вектор можно формулировать в форме чистой композиции или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, в фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления, набор включает AAV вектор, содержащий трансген, описанный в настоящем описании, в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

В некоторых вариантах осуществления, набор включает AAV вектор, содержащий трансген, описанный в настоящем описании, в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе) и второй AAV вектор, кодирующий трансген, описанный в настоящем описании, в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе), и третий AAV вектор, кодирующий трансген, описанный в настоящем описании, в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

В некоторых вариантах осуществления, набор включает AAV вектор, кодирующий коровый белок ретромера VPS35 и/или коровый белок ретромера VPS26a, и/или коровый белок ретромера VPS26b, или его фармацевтическую композицию, в одном или нескольких контейнерах (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

Если набор включает одну или более фармацевтических композиций для парентерального введения субъекту, набор может включать устройство для проведения такого введения. Например, набор может включать одну или более игл для подкожного введения, или других инъекционных устройств, как обсуждают выше.

Набор может включать вкладыш в упаковку, содержащий информацию, касающуюся фармацевтических композиций и лекарственных форм в наборе. Как правило, такая информация помогает пациентам и терапевтам эффективно и безопасно использовать вложенные фармацевтические композиции и лекарственные формы. Например, следующая информация, касающаяся комбинации, может быть предоставлена на вкладыше: фармакокинетика, фармакодинамика, клинические исследования, параметры эффективности, показания и применение, противопоказания, предупреждения, меры предосторожности, неблагоприятные реакции, передозировка, надлежащие дозы и введение, способ поставки, надлежащие условия хранения, ссылки, информация о производителе/распространителе и патентная информация.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение можно лучше понять со ссылкой на следующие неограничивающие примеры, которые представлены, чтобы более полно проиллюстрировать предпочтительные варианты осуществления изобретения. Их никаким образом не следует рассматривать для ограничения широкого объема настоящего изобретения.

Пример 1- Материалы и способы

Получение плазмид

Последовательности мРНК для VPS35, VPS26a и VPS26b получали из Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Последовательности подвергали оптимизации по кодонному составу и затем синтезировали заново. Синтезированную конструкцию субклонировали в плазмиду для переноса AAV с инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV2 и широко распространенным промотором бета-актина курицы дикого типа. За трансгеном следовал сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста. Контроль пустого каркаса вектора получали посредством делеции последовательности VPS35. Контроль GFP конструировали для имитации рационального дизайна целевых конструкций VPS. Он содержал улучшенный зеленый флуоресцентный белок, такой же полиА бычьего гормона роста (BgH) и промотор бета-актина курицы дикого типа, как конструкции VPS. Полученные плазмиды показаны на фигуре 3.

Получение AAV9

Каждую из конструкций, описанных выше, индивидуально упаковывали в рекомбинантный аденоассоциированный вирусный вектор 9 (AAV9), с использованием капсида и ДНК плазмиды-помощника из MeiraGTx. Кратко, плазмидой для переноса, плазмидой гер-сар и плазмидами-помощниками совместно трансфицировали клетки НЕК 293. Собранную суспензию, содержащую вирус и клеточный дебрис, осветляли с использованием фильтра millipore SHC XL150 (140 см²). Затем осветленную суспензию очищали с использованием колонки с сефарозой AVB, 20 мл, элюции в 3 объемах колонки. Концентрирование и диафильтрацию проводили с использованием пустотелого волокна 100 кДа mPES (Spectrum MicroKros кат. # C02-E100-05-S). Дополнительное концентрирование выполняли с использованием Фильтра для центрифугирования Amicon Ultra-4 30 кДа (кат. # UFC8030).

Культура N2A

Клетки нейробластомы мыши (N2a) культивировали в 50% DMEM (с высоким содержанием глюкозы) и 50% Opti-MEM+10% FBS и глутамин (2 mM) с пенициллином и стрептомицином для предотвращения контаминации микроорганизмами.

Трансфекция

Использовали протоколы трансфекции с липофектамином с некоторыми модификациями. Кратко, липофектамин LTX использовали для совместной трансфекции плазмидами Vps35 и Vps26 (Vps26a или Vps26b) нейроноподобных клеток, Neuro2a (N2a)

в 6-луночном формате. 100000 клеток рассеивали в каждую лунку, уже содержащую среду с комплексами ДНК-липофектамин. Пустой каркас и GFP использовали в качестве контрольных плазмид. Количество копий ДНК, вводимое на лунку, составляло $2,81E+11$. Клетки собирали через 48 часов после трансфекции с использованием буфера RIPA, как описано ранее (Qureshi et al. 2019).

Культивирование и трансдукция нейронов

Первичные культуры нейронов коры головного мозга и гиппокампа осуществляли, как описано ранее (Bhalla et al. 2012). Нейроны (450000 клеток на лунку) трансдуцировали с использованием ретромера AAV9 ($2,27E+10$ геномов вектора на условие на лунку), через 7 суток после посева в 12-луночный планшет. Пустой каркас AAV9 и GFP AAV9 использовали в качестве контроля. Культуры поддерживали в течение 3 недель после трансдукции (всего 4 недели). На сутки 28 нейроны лизировали с использованием буфера RIPA с ингибиторами протеазы и фосфатазы.

Вестерн-блоты

Клетки из культур N2A и нейронов лизировали в RIPA, и белок выделяли, как описано ранее (Qureshi et al. 2019; Kirby et al. 2015)). Лизаты образцов разделяли в бис-Трис 4-12% гелях NuPAGE®, переносили на нитроцеллюлозные мембраны с использованием устройства iblot и анализировали с использованием антител в качестве зондов.

Использовали первичные антитела, нацеленные на следующие белки: VPS35 (ab57632, Abcam, 1:1000); VPS26a (ab211530, Abcam, 1:500); VPS26b (NBP1-92575, Novus, 1:500 или 15915-1-AP, Proteintech, 1:500); VPS29 (sab2501105, Sigma-Aldrich, 1:500); Sorl1 (611861, BD-biosciences, 1:2000 и 79322, Cell Signaling, 1:500); и β -актин (ab6276, Abcam, 1:5000). Антитела IRDye® 800 или 680 (LI-COR) использовали в качестве вторичных с разведениями для антитела 1:10000 для 800CW, 1:15000 для 680RD и 1:25000 680LT. Вестерн-блоты сканировали с использованием системы визуализации Odyssey, как описано ранее (Eaton et al. 2013).

Для Sorl1 (BD-611861), антитело осли против IgG (H+L) мыши с пероксидазой AffiniPure использовали в качестве вторичного антитела (Jackson Immuno Research labs, 1:2000), и блоты сканировали в устройстве для визуализации Fujifilm LAS-3000.

Статистика

Статистический анализ проводили с использованием Microsoft Excel и SPSS. t-критерий Стьюдента для двух независимых выборок, подразумевающий одинаковые дисперсии, с двусторонним распределением, использовали для всех экспериментов, если не указано иное. Все данные представлены как средние, планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего. Все столбчатые диаграммы получали в GraphPad Prism 8. Графики рассеяния получали в SPSS.

Пример 2 - Экспрессия только VPS35 является недостаточной для усиления образования тримера и функции ретромера

Для определения эффекта, который сверхэкспрессия экзогенного VPS35 оказывает на коровые белки ретромера и на функцию ретромера в состоянии без недостаточности, культивированные нейроны мыши дикого типа трансдуцировали с использованием AAV9-VPS35-НА и использовали либо AAV9-GFP, либо AAV9-пустой вектор (EV) в качестве контрольных условий, и собирали через 3 недели.

Уровни всех коровых белков ретромера определяли посредством иммуноблоттинга (Фигура. 2A). По сравнению с контролем, 90% сверхэкспрессия VPS35-НА приводит к сильному 67% увеличению уровня эндогенного VPS29 ($p=9E-09$), небольшому 22% увеличению уровня VPS26a ($p=2E-08$) и отсутствию увеличения уровня VPS26b ($p=0,62$) (Фигура 2B).

Уровни Sorl1 также определяли посредством иммуноблоттинга. По сравнению с контролем, сверхэкспрессия только VPS35 приводила к слабому (11%) и статистически ненадежному ($p=0,06$) увеличению уровня Sorl1 (Фигура 2B).

Посредством демонстрации того, что сверхэкспрессия VPS35, приводящая к сильной сверхэкспрессии VPS29, но либо к отсутствию увеличения, либо к умеренному увеличению уровня паралога VPS26, не оказывает явного эффекта на функцию ретромера, эти результаты оправдывают исследование эффекта совместной экспрессии VPS35 и VPS26.

Пример 3 - Результаты использования клеток нейробластомы, и плазмид и конструкций AAV9

Клетки нейробластомы (N2A) трансфицировали с использованием плазмид, экспрессирующих одиночные белки (VPS35, VPS26a или VPS26b), или комбинацию белков (VPS35+VPS26a или VPS35+VPS26b). Плазмиду, экспрессирующую GFP, или пустую плазмиду использовали в качестве контроля.

Условия для одиночных белков приводили к сверхэкспрессии каждого белка выше контрольных уровней: только для VPS35 (80%, $p=3,4E-09$), только для VPS26a (550%; $p=2,2E-06$), и только для VPS26b (362%; $p=0,0002$). При сравнении с условиями для одиночных белков, экспрессия VPS35+VPS26a приводила к значимому увеличению уровня VPS35 (31%; $p=0,0003$), VPS29 (17%; $p=0,0007$) и VPS26a (52%; $p=0,015$), но к минимальному изменению уровня VPS26b. Экспрессия VPS35+VPS26b приводила к незначимому увеличению уровня VPS35 (15%; $p=0,07$) и VPS26b (56%; $p=0,14$), значимому увеличению уровня VPS29 (22%; $p=0,0005$), но к отсутствию увеличения уровня VPS26a. См. фигуру 4.

Пример 4 - Результаты использования нейронов и конструкций AAV9

Для тестирования эффекта комбинаций VPS35 и VPS26 в культивируемых нейронах, получали пять экспериментальных векторов AAV9, экспрессирующих VPS35, VPS26a, VPS26b мыши, и два контрольных вектора AAV9, один, экспрессирующий GFP, и другой - пустой вектор. Экспериментальные векторы экспрессировали в нейронах во всех возможных комбинациях: экспрессия одиночного белка (только VPS35, только

VPS26a, только VPS26b); двойная экспрессия белка (VPS35+VPS26a, VPS35+VPS26b, VPS26b+VPS26a); и тройная экспрессия белка (VPS35+VPS26a+VPS26b).

Дозу каждого вирусного вектора оптимизировали в поисковых исследованиях, и при использовании в конечном комбинаторном исследовании, средняя сверхэкспрессия AAV9-VPS35 составляла 11% (диапазон: 1%-23%), среднее для AAV9-VPS26a составляло 218% (диапазон: 154%-354%) и среднее для AAV9-VPS26b составляло 80% (диапазон: 50%-107%) (Фигура 5B, синие столбцы). Этот профиль оказался особенно полезным для тестирования взаимодействий.

Сначала тестировали, присутствовало ли взаимодействие VPS35-VPS26 при экспрессии корового белка ретромера, посредством сравнения уровней, детектированных в условиях одиночного белка, с уровнями, детектированными в комбинаторных экспериментах. По сравнению с экспрессией одиночного белка, экспрессия VPS35+VPS26a приводила к значимому увеличению уровня VPS35 (70%; $p=4,4E-18$), VPS26a (53%; $p=2,1E-05$), VPS29 (~42%; $p<1,22E-05$), но не VPS26b. Экспрессия VPS35+VPS26b приводила к значимому увеличению уровня VPS35 (64%; $p=3,6E-09$), VPS26b (15%; $p=0,003$), VPS29 (~18%; $p<0,013$), но не VPS26a.

Наконец, экспрессия VPS35+VPS26a+VPS26b приводила к значимому увеличению уровней всех четырех белков ретромера, по сравнению с контролем (EV+GFP) - VPS35 (81%; $p=5,6E-15$), VPS29 (51%; $p<1,8E-07$), VPS26a (220%; $p=1,7E-08$) и VPS26b (51%; $p=9,8E-10$).

См. фигуру 5.

Эти результаты снова документировали синергический эффект совместной экспрессии VPS35+VPS26 на экспрессию VPS35, так же как на VPS26a и VPS26b.

В то время как основной целью этих исчерпывающих серий экспериментов являлось тестирование синергических взаимодействий, тот факт, что VPS35+VPS26a не оказывали эффекта на VPS26b, и что VPS35+VPS26b не оказывали эффекта на VPS26a, позволяет предполагать, что в нейронах каждый паралог VPS26 существует в биохимически отдельных тримерах.

Пример 5 - Комбинированная экспрессия VPS35 и VPS26 действует синергически на функцию ретромера в нейронах

Затем авторы настоящего изобретения тестировали, оказывают ли комбинации VPS35 и VPS26 синергический эффект на функцию ретромера, посредством сравнения уровней Sorl1, измеренных среди всех условий, поскольку мутации потери функции в SORL1 являются этиологическими при болезни Альцгеймера (Holstege et al. 2017), и приблизительно 30% уменьшение уровня белка Sorl1 обнаружено даже на ранних стадиях спорадического заболевания (Sager et al. 2007); Scherzer et al. 2004; Dodson et al. 2006).

Использовали одномерный ANOVA, в котором контрольные условия, одиночные условия и комбинаторные условия включали в качестве фиксированного фактора, и Sorl1 включали в качестве зависимой переменной. Результаты выявили групповой эффект ($F=19,3$, $p=9,3E-8$) при простом сравнении, показывающий, что, в то время как не

присутствовало различий между контролем и одиночными условиями (оценка контраста=0,1, $p=0,9$), присутствовало значимое различие между одиночными и комбинированными условиями (оценка контраста=0,4, $p=2,2 \times 10^{-7}$). Апостериорные сравнения выявили, что каждое комбинированное условие являлось значимо отличными от одиночных условий (Фигура 6B).

Интересно, что наблюдали также значимый эффект сверхэкспрессии VPS26a+VPS26b на Sorl1 (34%; $p=0,006$) (Фигура 6B), даже несмотря на то, что это комбинированное условие не увеличивало уровни VPS35 или VPS29 (Фигура 5B). Обнаружено, что Sorl1 взаимодействует с кором ретромера посредством VPS26 (Suzuki et al. (2019), и это наблюдение позволяет предполагать, что оба паралога могли независимо взаимодействовать с Sorl1.

Использовали крупномасштабный набор данных набор данных, который был получен, в котором присутствуют более 140 экспериментальных или контрольных условий, и в котором четыре коровых белка ретромера и Sorl1 измеряли на протяжении широкого динамического диапазона. Использовали модель множественной линейной регрессии, в которой уровни Sorl1 включали в качестве зависимой переменной, и уровни VPS35, VPS26, VPS26a и VPS26b одновременно вводили в качестве независимых переменных. Обнаружена значимая взаимосвязь с уровнями Sorl1 ($F=19,5$, $p=1,1 \times 10^{-12}$), где только паралоги VPS26 вносили значимый вклад в модель. Модель, таким образом, была усечена для включения обоих паралогов, подтверждая, что как VPS26a ($t=5,6$, $p=1,4 \times 10^{-7}$), так и VPS26b ($F=7,2$, $p=3,2 \times 10^{-11}$) независимо коррелируют с уровнями Sorl1 (Фигуры 6C и 6D). Этот результат согласован с интерпретацией, что нейроны имеют два тримера (VPS26b-VPS35-VPS29 и VPS26a-VPS35-VPS29), которые являются не только биохимически отдельными, но также функционально отдельными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Andersen, et al. Securing the future of drug discovery for central nervous system disorders. *Nature reviews. Drug discovery*. 2014;13(12):871-872.

Bhalla et al. The location and trafficking routes of the neuronal retromer and its role in amyloid precursor protein transport. *Neurobiol Dis*. 2012;47(1):126-34.

Collins et al. Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex. *Traffic* 2008;9(3):366-79.

Dodson et al. LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006;65(9): 866-72.

Eaton et al. Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PloS one*. 2013;8(8):e72457.

Holstege et al. Characterization of pathogenic SORL1 genetic variants for association with Alzheimer's disease: a clinical interpretation strategy. *Eur J Hum Genet*. 2017.

Kendall et al. Mammalian Retromer Is an Adaptable Scaffold for Cargo Sorting from Endosomes. *Structure*. 2020;28(4):393-405.e4.

Kirby et al. Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. PNAS USA. 2015;112(13):4128-33. Epub 2015/03/17.

Qureshi et al. Retromer repletion with AAV9-VPS35 restores endosomal function in the mouse hippocampus. bioRxiv. 2019:618496.

Sager et al., Neuronal LR11/sorLA expression is reduced in mild cognitive impairment. Ann Neurol. 2007;62(6):640-7.

Scherzer et al. Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. Arch Neurol. 2004;61(8):1200-5.

Shi et al. The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. Nat Struct Mol Biol. 2006;13(6):540-8.

Small and Petsko Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. Nature reviews. Neuroscience. 2015;16(3):126-132.

Suzuki et al. A bipartite sorting signal ensures specificity of retromer complex in membrane protein recycling. J Cell Biol. 2019;218(9):2876-2886.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения, профилактики и/или излечения нейродегенеративного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества одного или более вирусных векторов, содержащих трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, и по меньшей мере один трансген, кодирующий коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

2. Способ лечения, профилактики и/или излечения нейродегенеративного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества одной или более композиций, содержащих по меньшей мере один вирусный вектор, содержащий трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, и по меньшей мере один трансген, кодирующий коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

3. Способ лечения, профилактики и/или излечения нейродегенеративного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества одной или более композиций, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35, и по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

4. Способ облегчения одного или более симптомов нейродегенеративного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества одного или более вирусных векторов, содержащих трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, и по меньшей мере один трансген, кодирующий коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

5. Способ облегчения одного или более симптомов нейродегенеративного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества одной или более композиций, содержащих по меньшей мере один вирусный вектор, содержащий трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, и по меньшей мере один трансген, кодирующий коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

6. Способ облегчения одного или более симптомов нейродегенеративного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества одной или более композиций, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера VPS35, и по меньшей мере нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

7. Способ по любому из пп. 2 и 5, где терапевтически эффективное количество первой композиции, содержащей по меньшей мере один вирусный вектор, содержащий трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, вводят субъекту, и терапевтически эффективное количество второй композиции, содержащей по меньшей мере один вирусный вектор, содержащий трансген, кодирующий коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций, вводят субъекту.

8. Способ по п.7, где терапевтически эффективное количество третьей композиции, содержащей по меньшей мере один вирусный вектор, содержащий трансген, кодирующий коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций, вводят субъекту.

9. Способ по п.7, где первую и вторую композицию вводят последовательно.

10. Способ по п.7, где первую и вторую композицию вводят одновременно.

11. Способ по п.8, где первую, вторую и третью композицию вводят последовательно.

12. Способ по п.8, где первую, вторую и третью композицию вводят одновременно.

13. Способ по любому из пп. 2, 3, 5 и 6, где композиция дополнительно содержит фармацевтический носитель.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где нейродегенеративное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона, нейронального цероидного липофуциноза (NCL), трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (TSE или прионного заболевания), множественной системной атрофии (MSA), прогрессирующего супрануклеарного паралича (PSP), лобно-височной лобарной деменции, связанной с хромосомой 17q21-22, и ее подтипов (FTLD-17/FTLD-Тau), болезни телец Леви (LBD), бокового амиотрофического склероза (ALS), лобно-височной дегенерации (FTD), ALS-FTD и хронической травматической энцефалопатии (СТЕ).

15. Вирусный вектор, содержащий по меньшей мере один трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, и кодирующий коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

16. Вектор по п.15, где коровый белок ретромера VPS35, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности VPS35 (SEQ ID NO: 1).

17. Вектор по п.15, где коровый белок ретромера VPS35, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность VPS35 (SEQ ID NO: 1).

18. Вектор по п.15, где трансген, кодирующий коровый белок ретромера Vps35, содержит человеческий Vps35 (SEQ ID NO: 1).

19. Вектор по п.15, где трансген имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35 (SEQ ID NO: 1).

20. Вектор по п.15, где трансген имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10.

21. Вектор по п.15, где коровый белок ретромера VPS26a, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности VPS26a (SEQ ID NO: 2).

22. Вектор по п.15, где коровый белок ретромера Vps26a, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность VPS26a (SEQ ID NO: 2).

23. Вектор по п.15, где трансген, кодирующий коровый белок ретромера Vps35, содержит человеческий VPS26a (SEQ ID NO: 2).

24. Вектор по п.15, где трансген имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a (SEQ ID NO: 2).

25. Вектор по п.15, где коровый белок ретромера VPS26b, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности VPS26b (SEQ ID NO: 3).

26. Вектор по п.15, где коровый белок ретромера VPS26b, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность VPS26b (SEQ ID NO: 3).

27. Вектор по п.15, где трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, содержит человеческий VPS26b (SEQ ID NO: 3).

28. Вектор по п.15, где трансген имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b (SEQ ID NO: 3).

29. Вектор по любому из пп. 1-28, где вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, лентивируса, ретровируса, поксвируса, бакуловируса, вируса простого герпеса, вируса осповакцины и синтетического вируса.

30. Вектор по п.29, где вирусный вектор представляет собой AAV.

31. Вектор по п.30, где AAV представляет собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 и AAVrh10.

32. Вектор по п.30, где AAV выбран из группы, состоящей из AAV9 и AAV2/9.

33. Вектор по любому из пп. 1-32, где трансген функционально связан с промотором, который индуцирует экспрессию трансгена в нервной клетке.

34. Вектор по любому из пп. 1-33, где трансген функционально связан с энхансером, который индуцирует экспрессию трансгена в нервной клетке.

35. Композиция, содержащая по меньшей мере один вирусный вектор, содержащий трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, и трансген, кодирующий коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

36. Композиция по п.35, где коровый белок ретромера VPS35, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности VPS35 (SEQ ID NO: 1).

37. Композиция по п.35, где коровый белок ретромера VPS35, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность VPS35 (SEQ ID NO: 1).

38. Композиция по п.35, где трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, содержит человеческий VPS35 (SEQ ID NO: 1).

39. Композиция по п.35, где трансген имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS35 (SEQ ID NO: 1).

40. Композиция по п.35, где трансген имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10.

41. Композиция по п.35, где коровый белок ретромера VPS26a, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности VPS26a (SEQ ID NO: 2).

42. Композиция по п.35, где коровый белок ретромера Vps26a, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность VPS26a (SEQ ID NO: 2).

43. Композиция по п.35, где трансген, кодирующий коровый белок ретромера Vps35, содержит человеческий VPS26a (SEQ ID NO: 2).

44. Композиция по п.35, где трансген имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26a (SEQ ID NO: 2).

45. Композиция по п.35, где коровый белок ретромера VPS26b, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности VPS26b (SEQ ID NO: 3).

46. Композиция по п.35, где коровый белок ретромера VPS26b, кодируемый трансгеном, имеет аминокислотную последовательность VPS26b (SEQ ID NO: 3).

47. Композиция по п.35, где трансген, кодирующий коровый белок ретромера VPS35, содержит человеческий VPS26b (SEQ ID NO: 3).

48. Композиция по п.35, где трансген имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VPS26b (SEQ ID NO: 3).

49. Композиция по п.35, где вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, лентивируса, ретровируса, поксвируса, бакуловируса, вируса простого герпеса, вируса осповакцины и синтетического вируса.

50. Композиция по п.49, где вирусный вектор представляет собой AAV.

51. Композиция по п.50, где AAV представляет собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 и AAVrh10.

52. Композиция по п.50, где AAV выбран из группы, состоящей из AAV9 и AAV2/9.

53. Композиция по любому из пп. 35-52, где трансген функционально связан с промотором, который индуцирует экспрессию трансгена в нервной клетке.

54. Композиция по любому из пп. 35-52, где трансген функционально связан с энхансером, который индуцирует экспрессию трансгена в нервной клетке.

55. Композиция по п.35, дополнительно содержащая фармацевтический носитель.

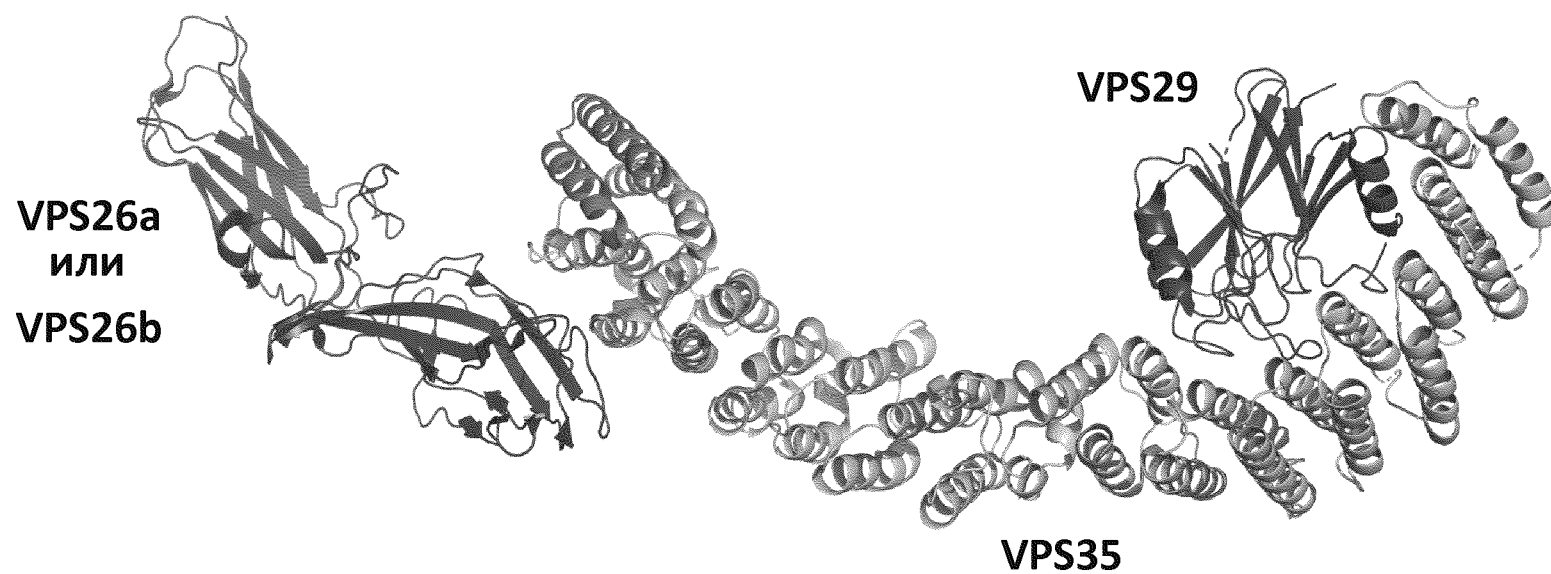
56. Композиция, содержащая по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую VPS35 и коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

57. Композиция по п.56, содержащая первую нуклеиновую кислоту, кодирующую VPS35, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую коровый белок ретромера, выбранный из группы, состоящей из VPS26a, VPS26b и их комбинаций.

58. Набор, содержащий композицию по любому из пп. 35-57.

ФИГ.1

Комплекс кора ретромера

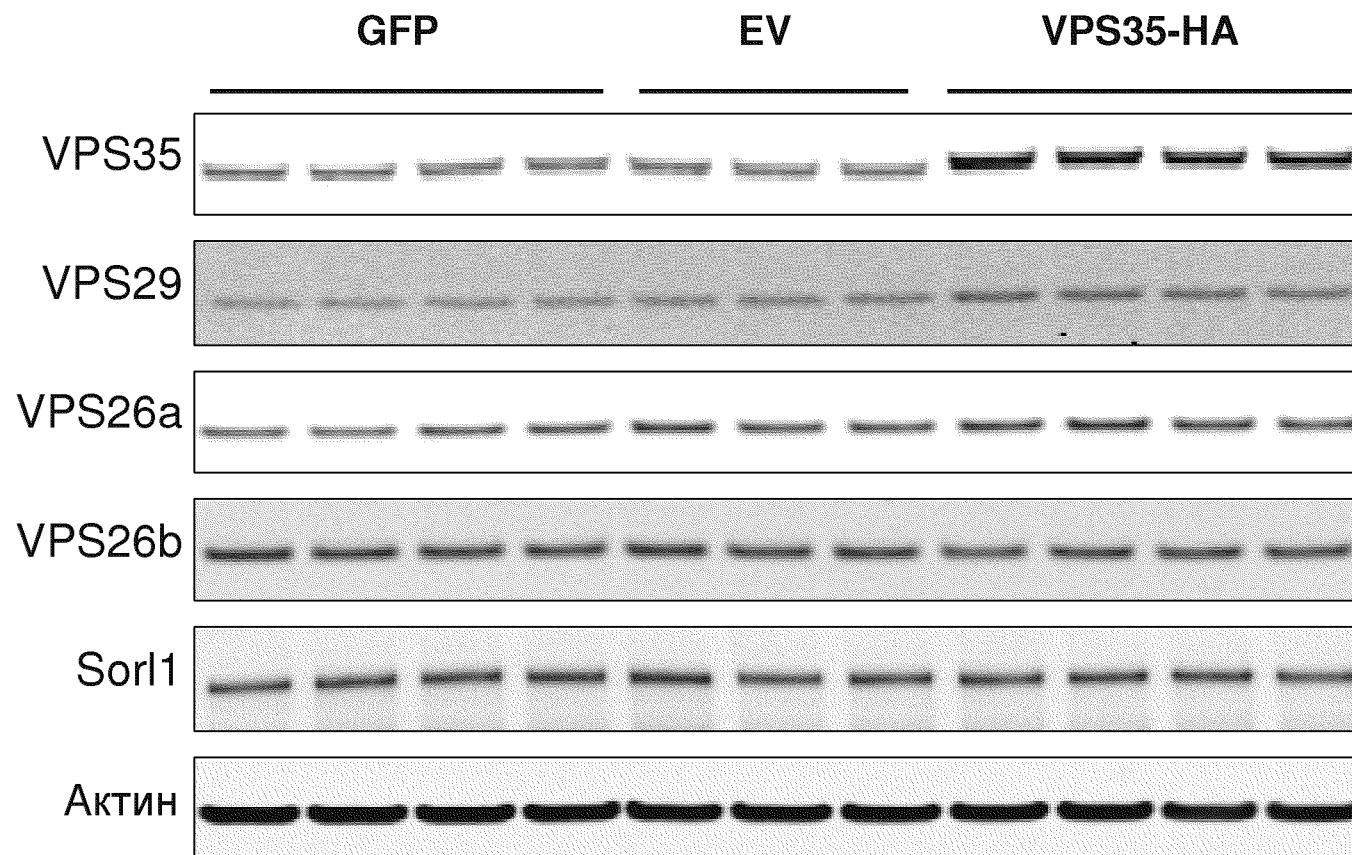


1/18

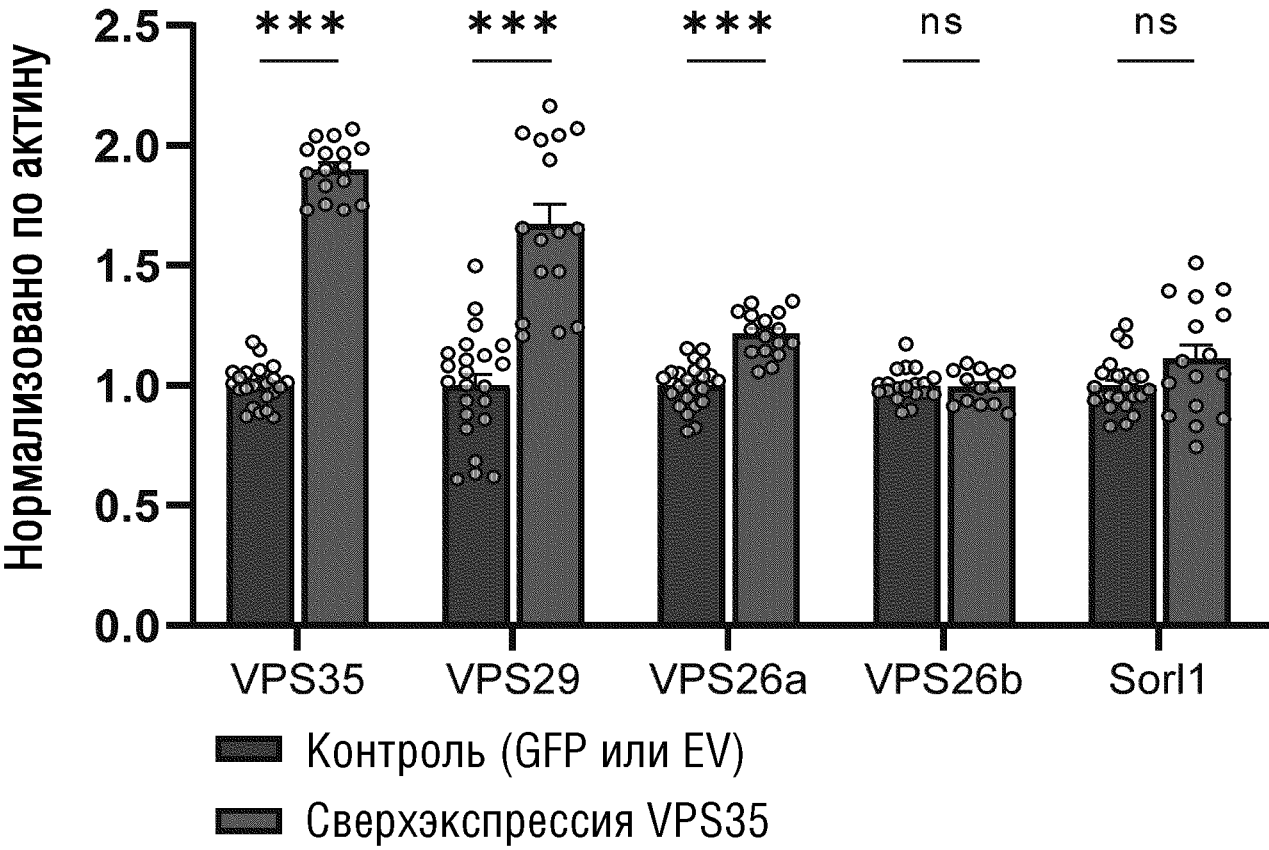
574994

ФИГ.2

ФИГ.2А



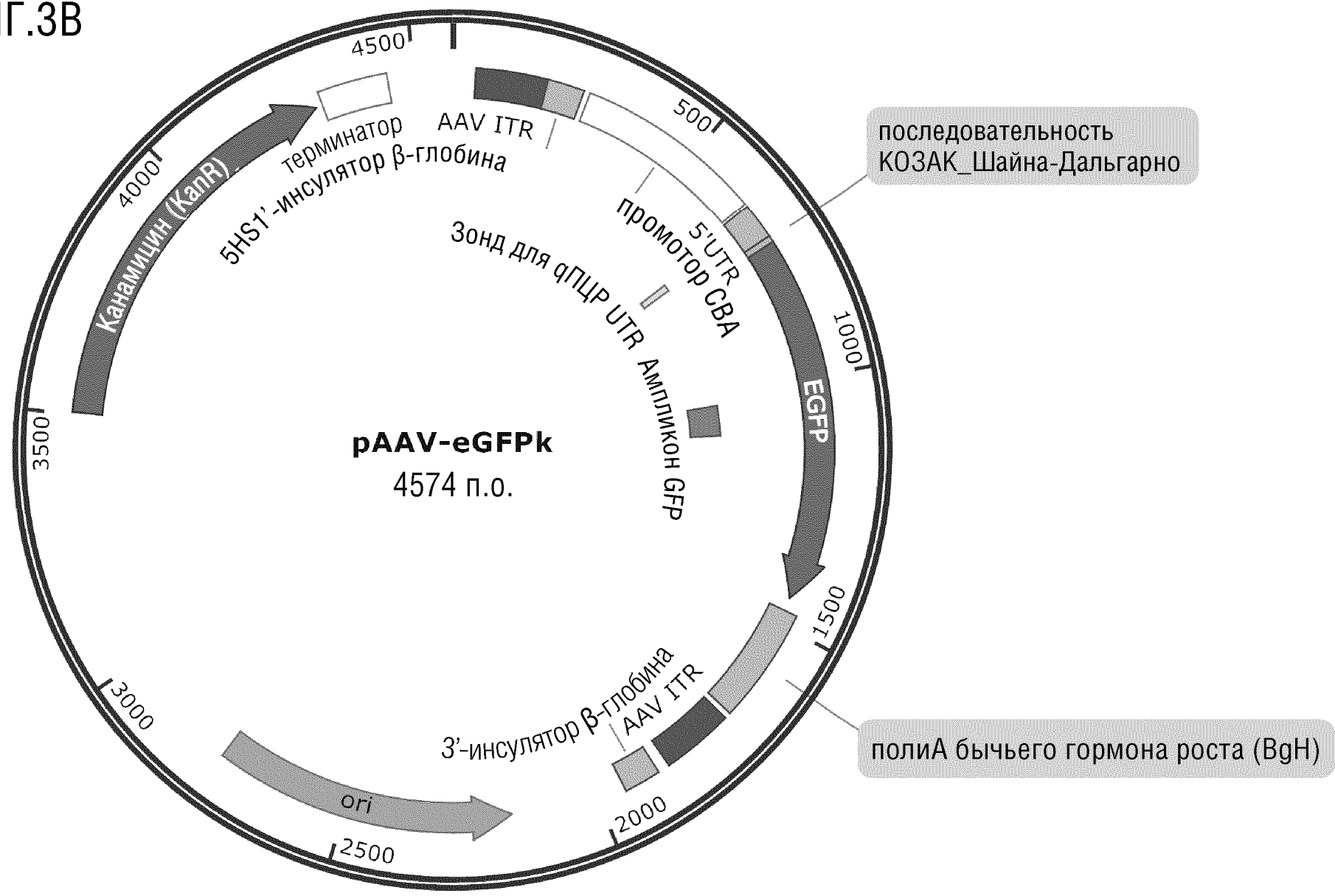
ФИГ.2В



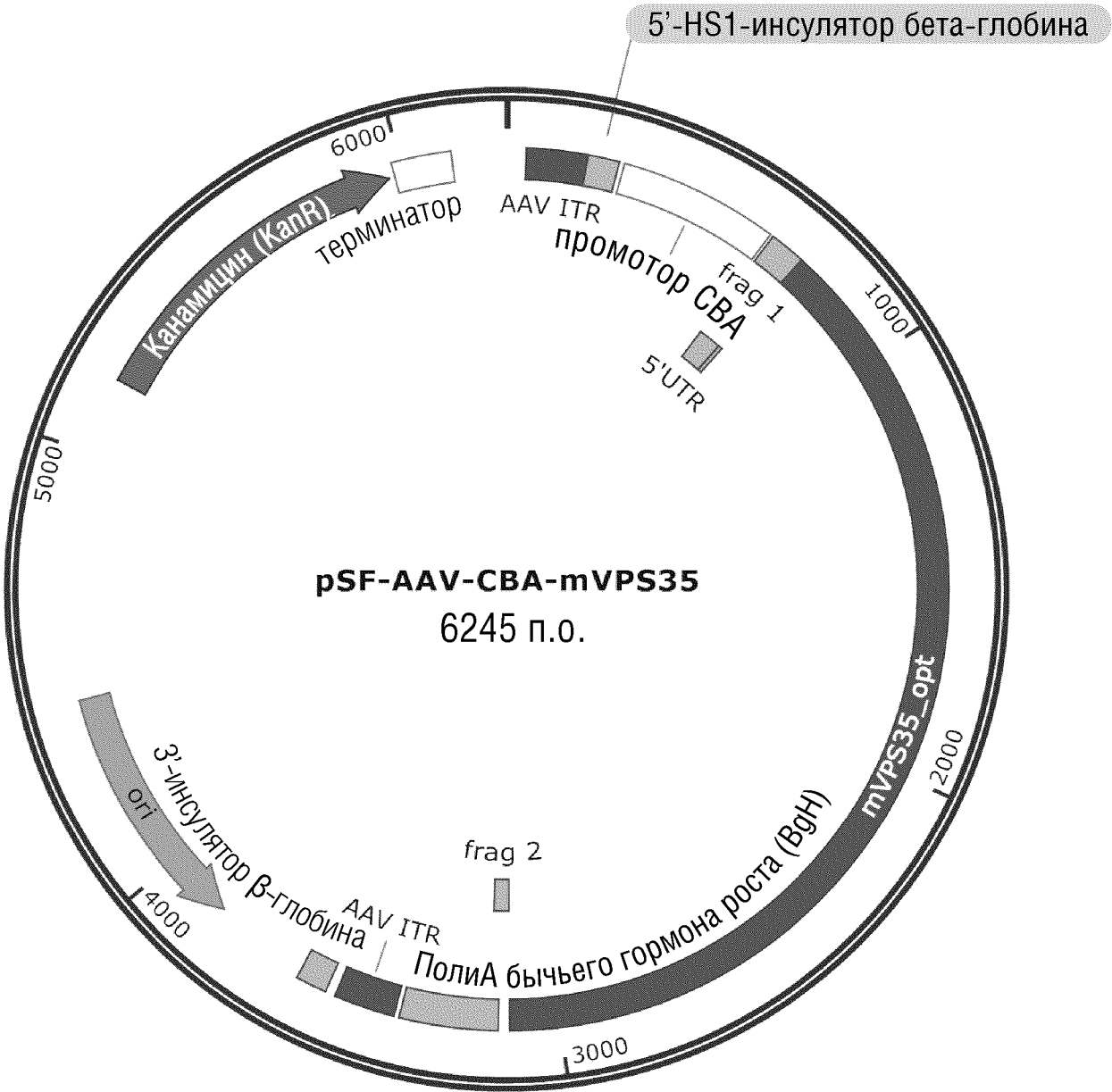
ФИГ.3А



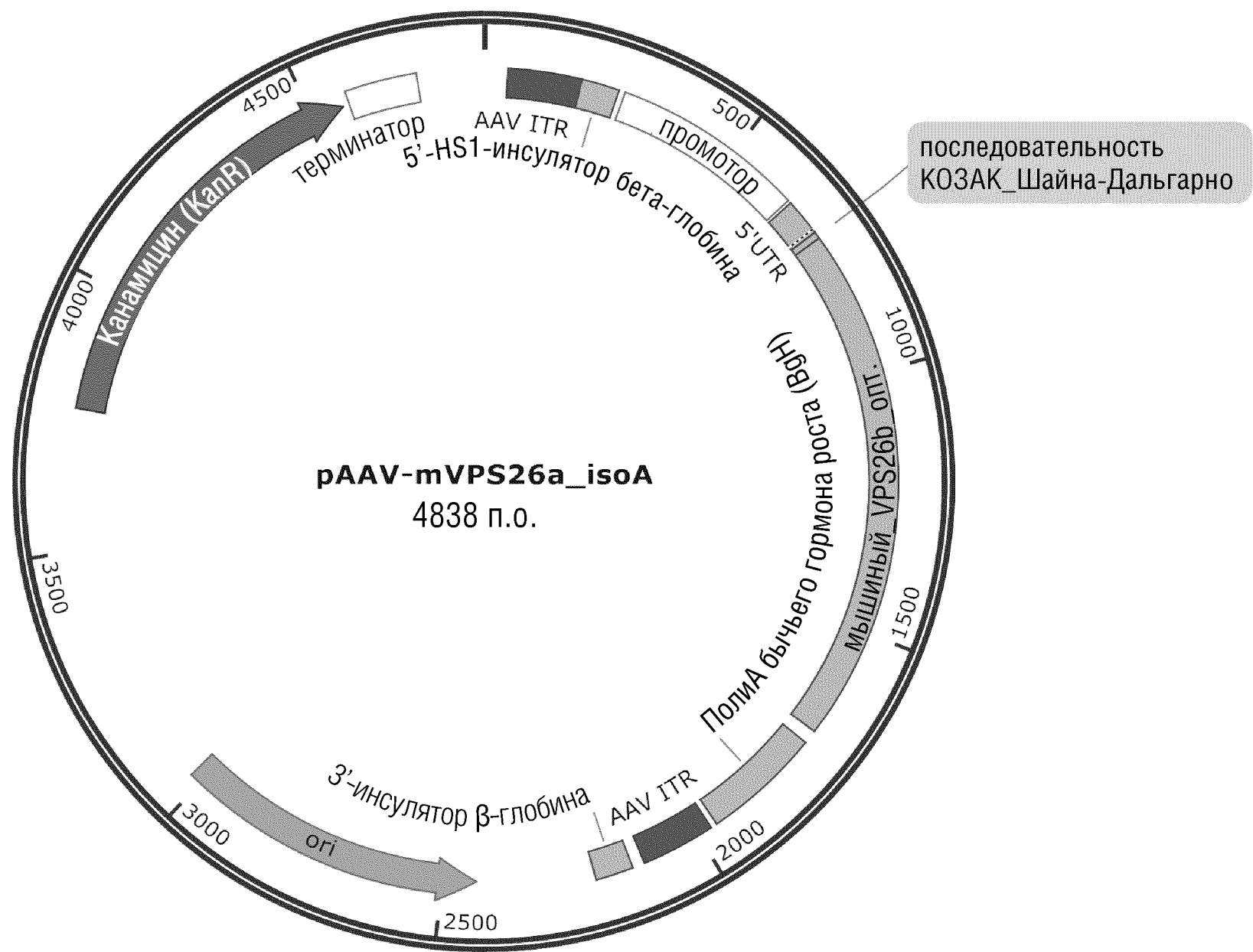
ФИГ.3В



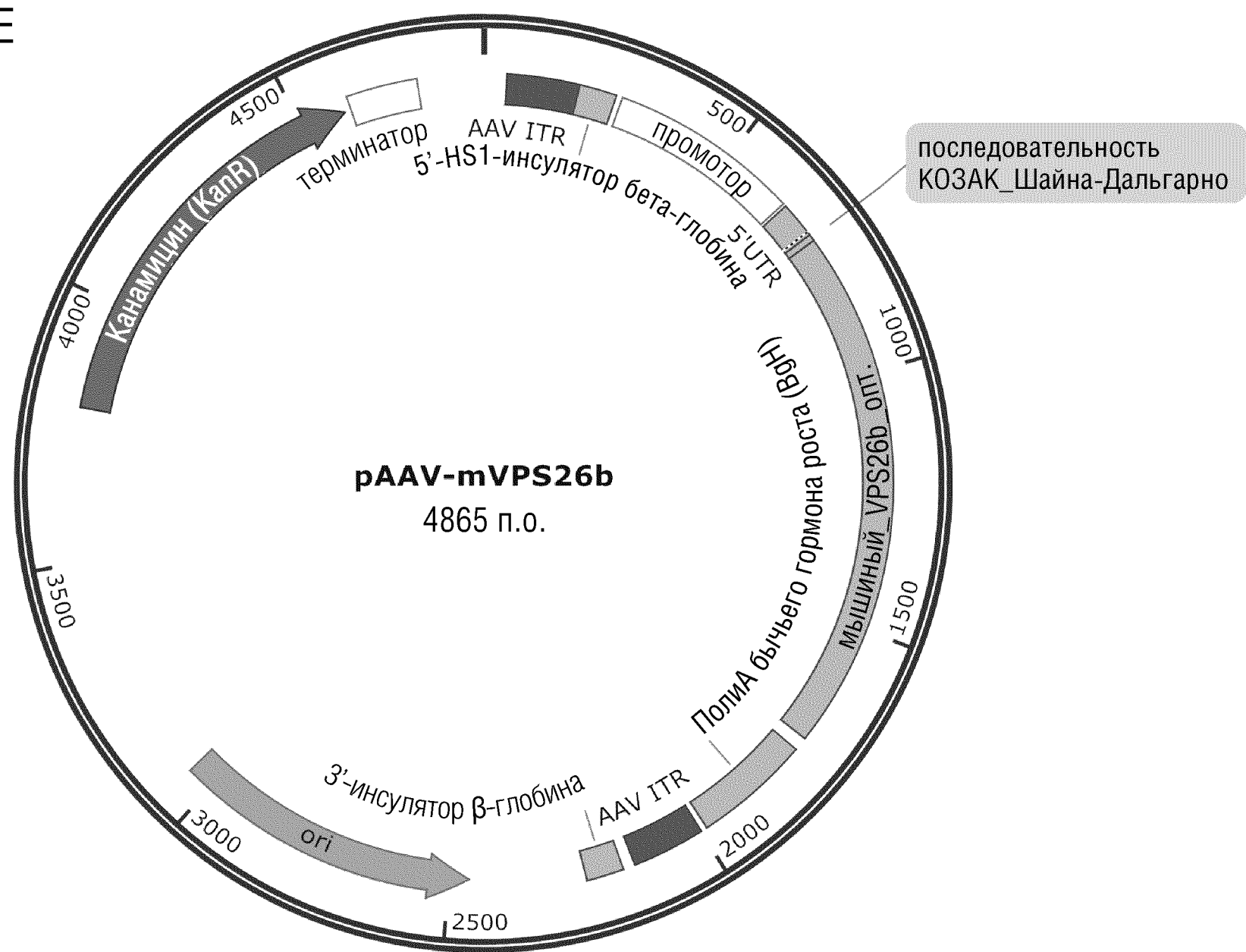
ФИГ.3С



ФИГ.3D

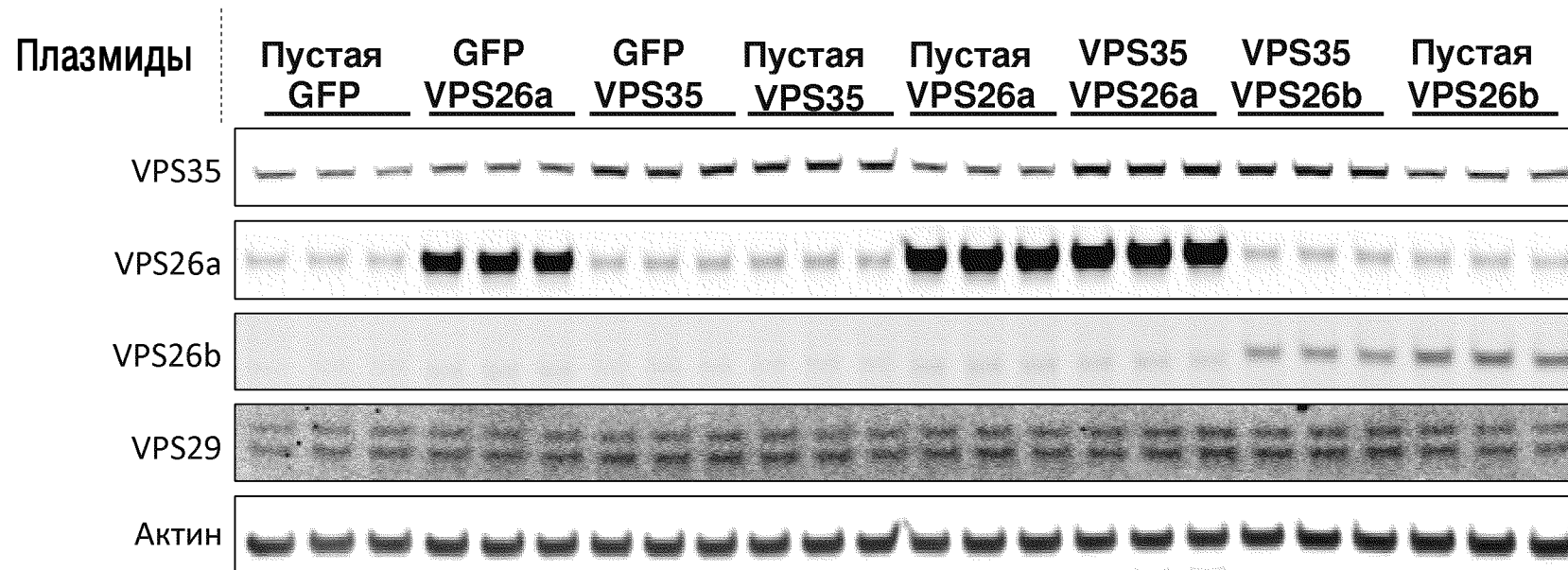


ФИГ.3Е

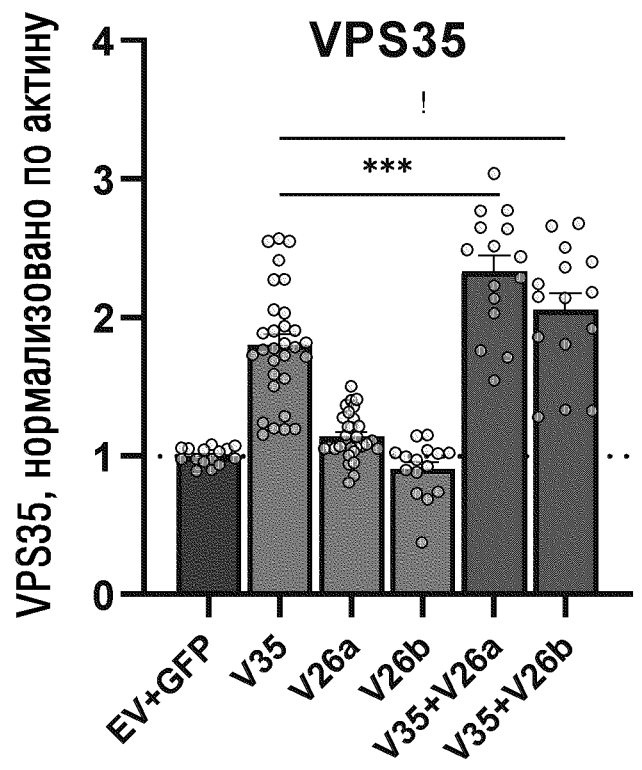


ФИГ.4

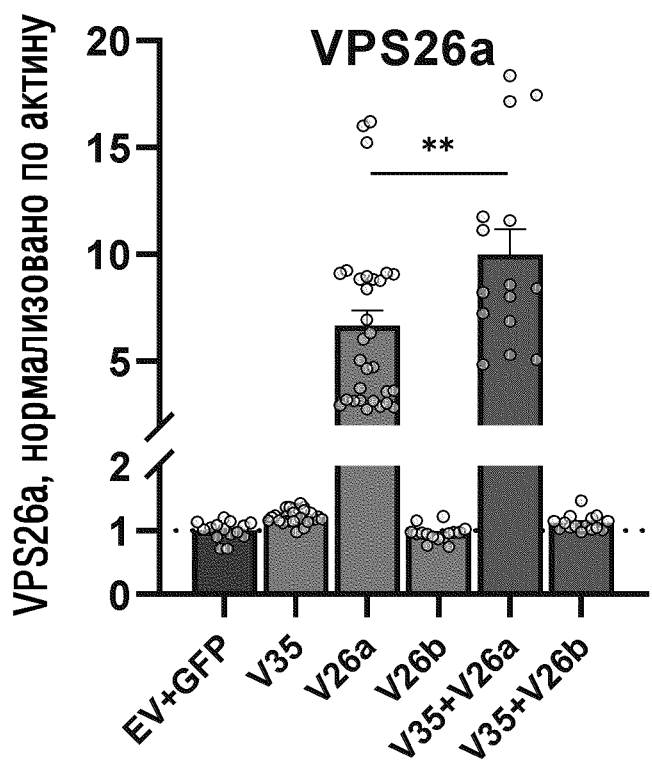
ФИГ.4А



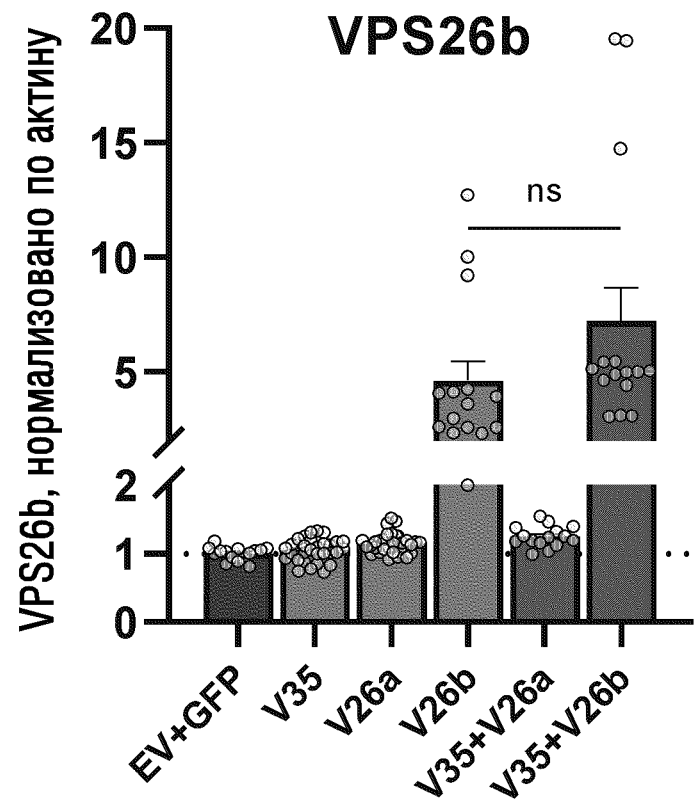
ФИГ.4В



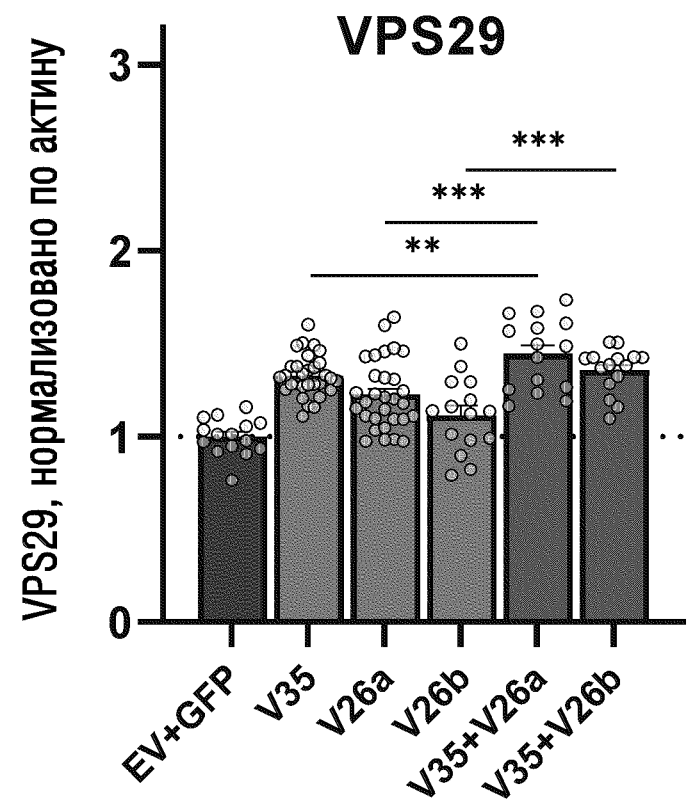
ФИГ.4С



ФИГ.4D

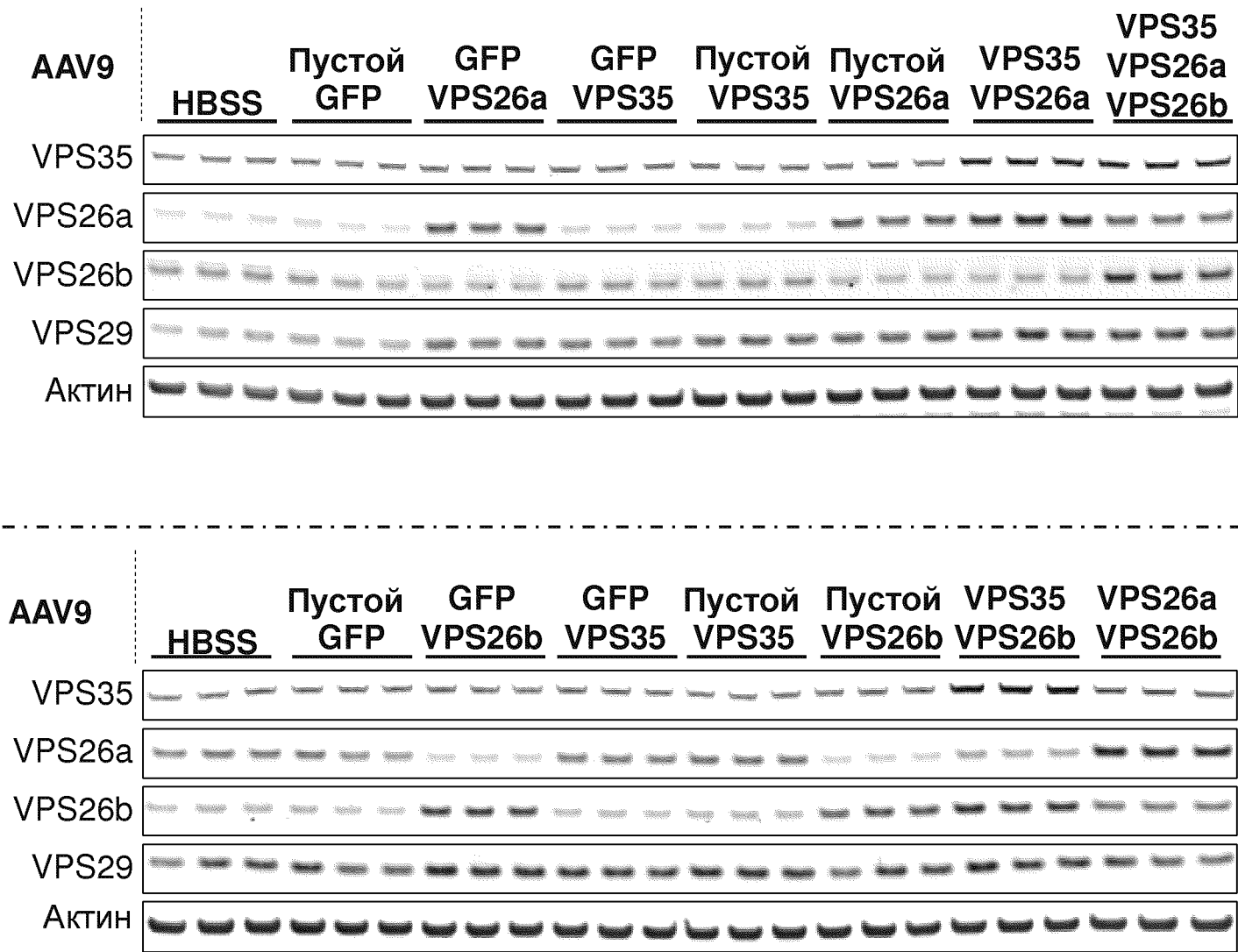


ФИГ.4Е

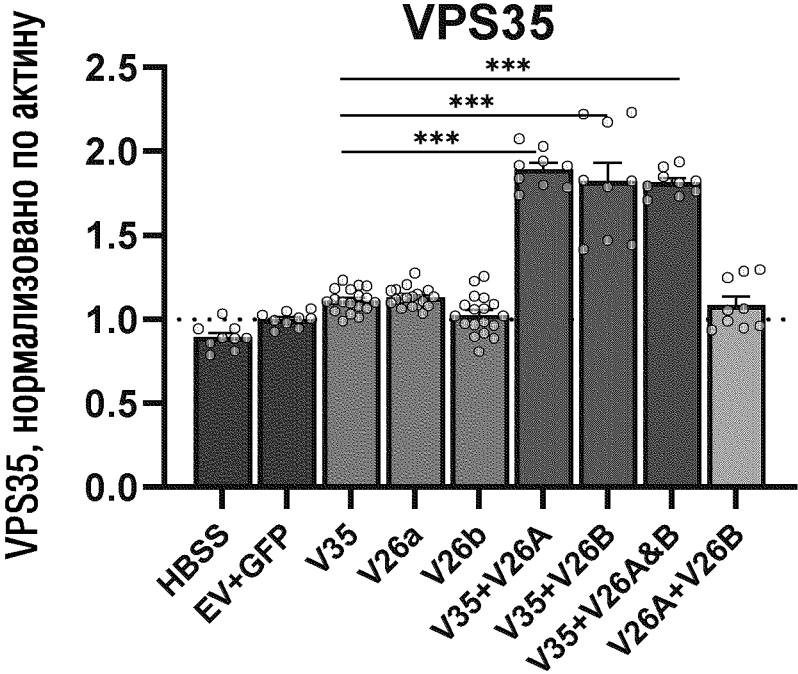


ФИГ.5А

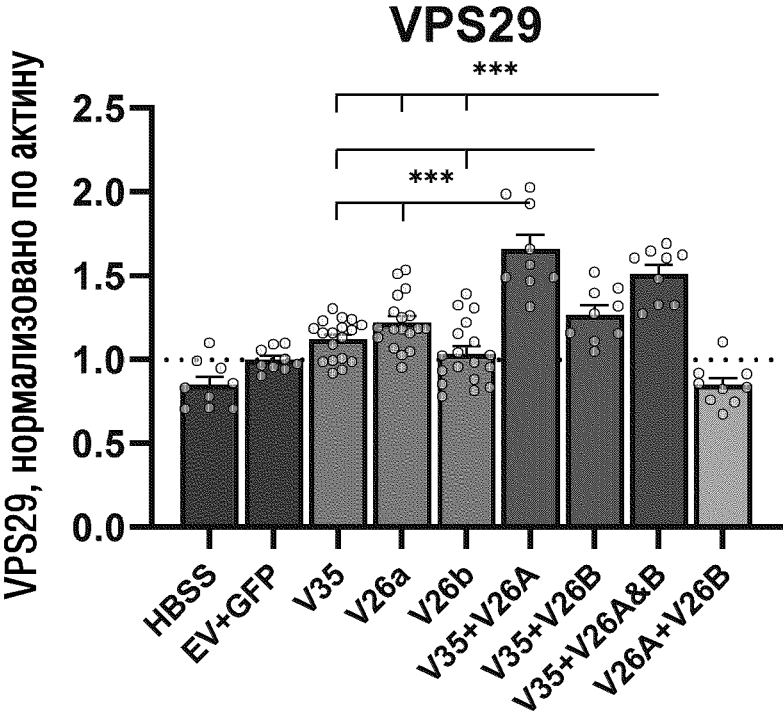
ФИГ.5



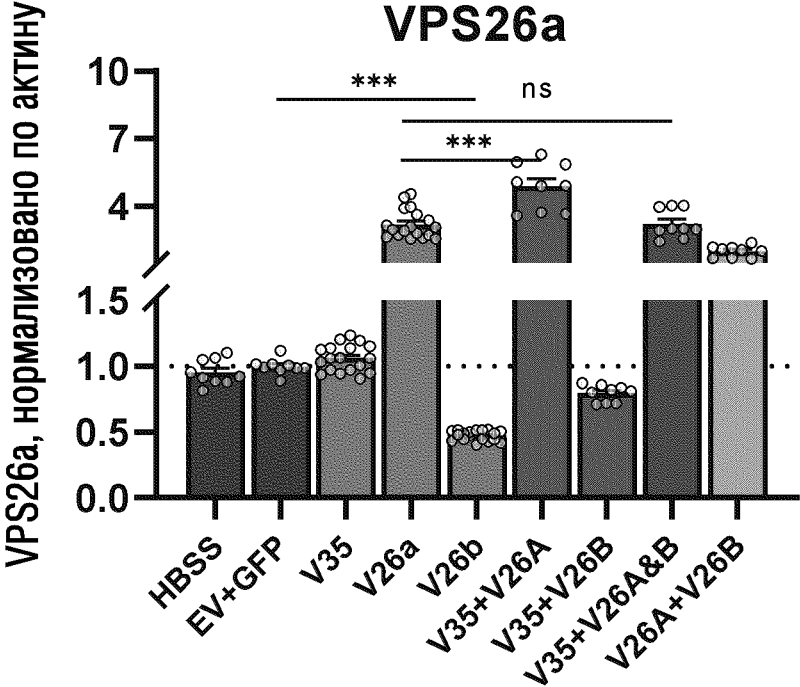
ФИГ.5В



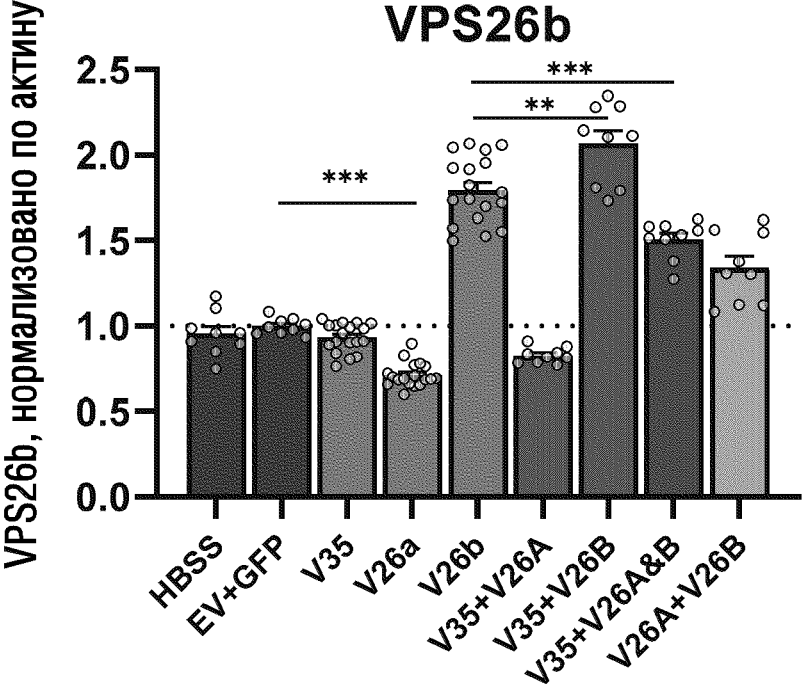
ФИГ.5С



ФИГ.5D

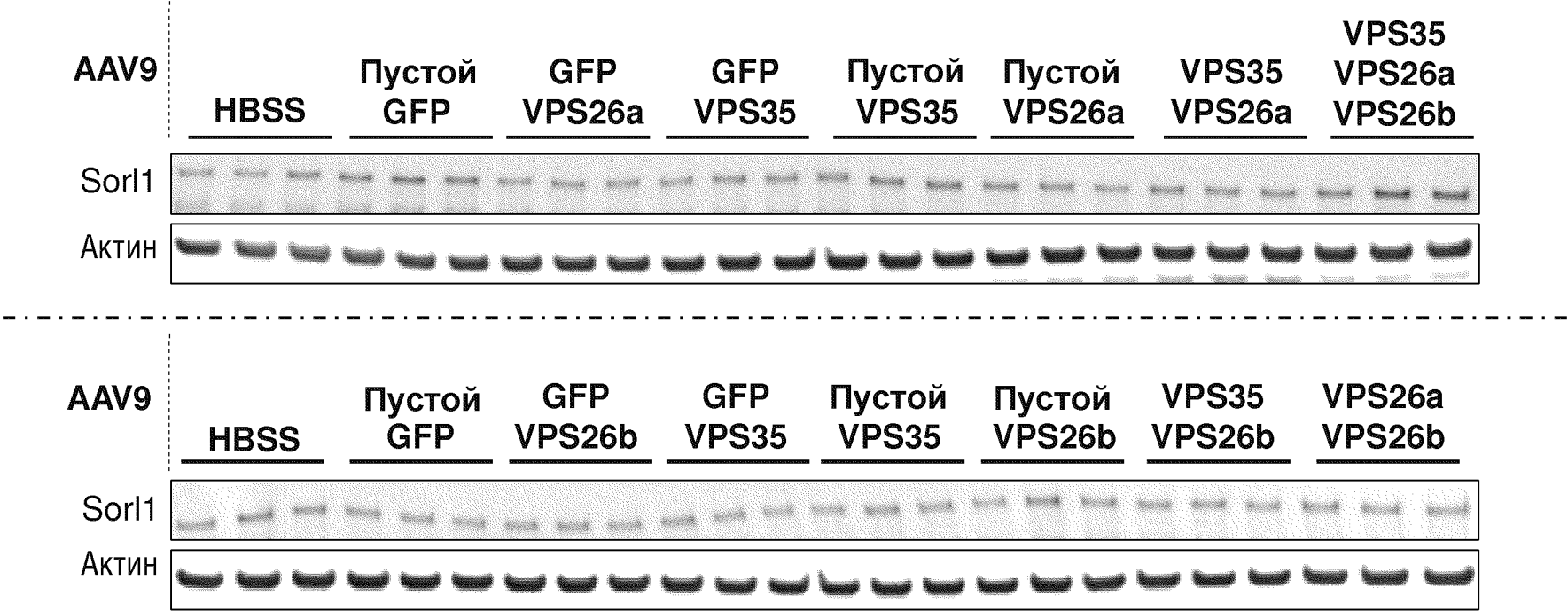


ФИГ.5E

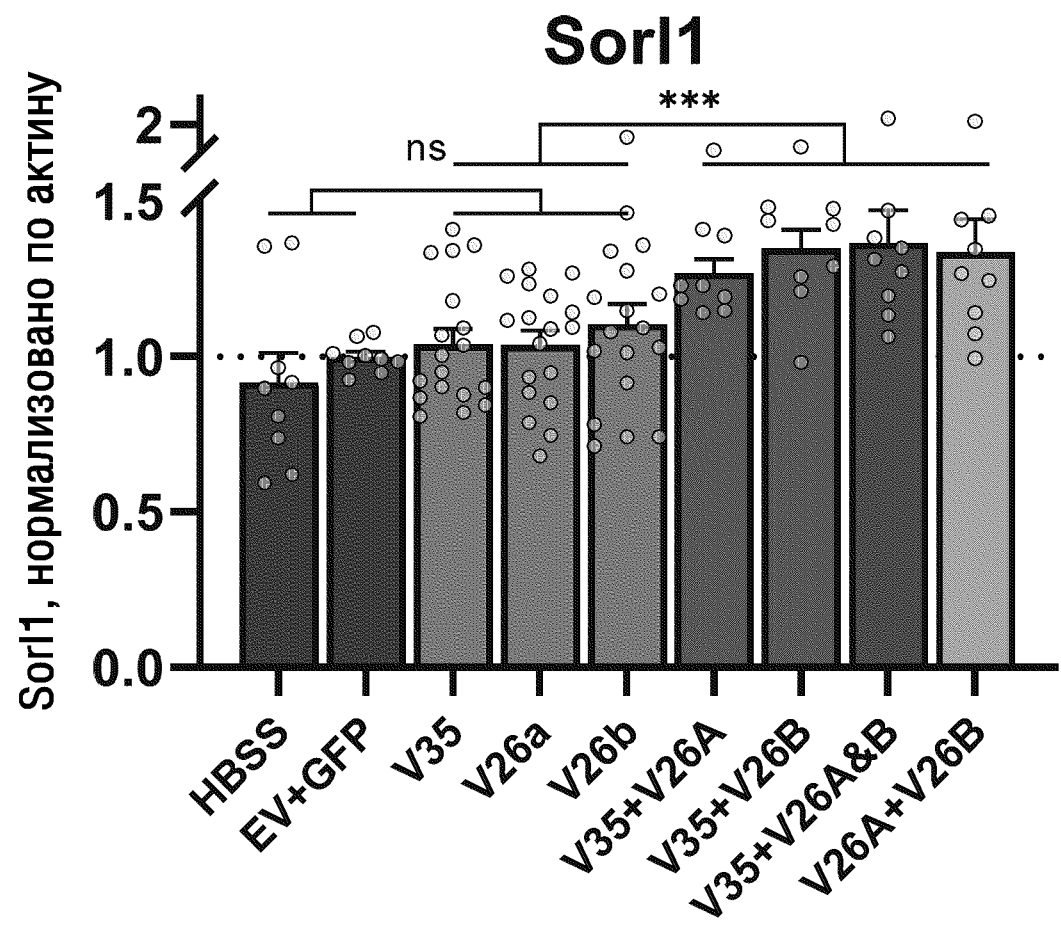


ФИГ.6

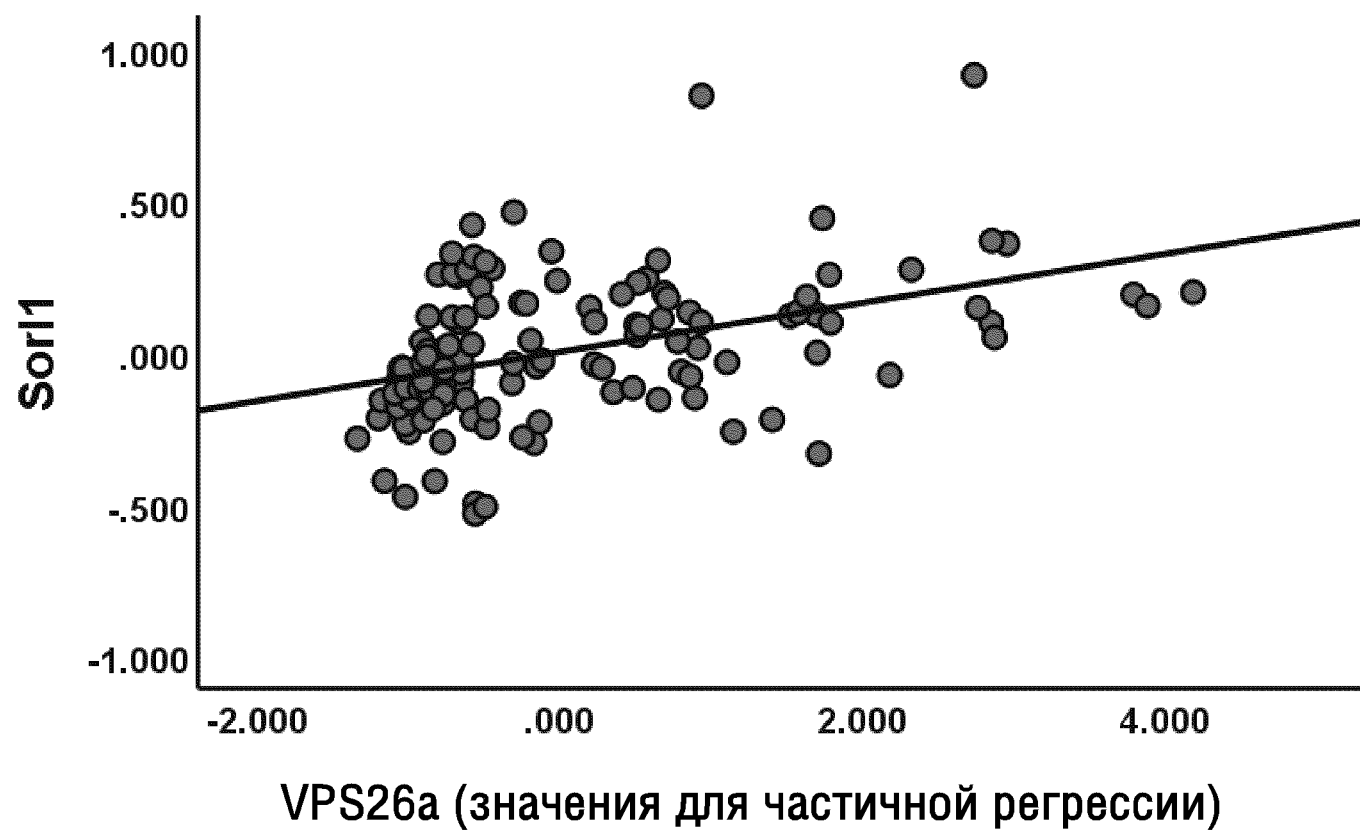
ФИГ.6А



ФИГ.6В



ФИГ.6С



ФИГ.6D

