

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390327 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.30

(51) Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.08.10

(54) ВИДЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ

(31) 63/063,852

(32) 2020.08.10

(33) US

(86) PCT/US2021/045443

(87) WO 2022/035900 2022.02.17

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

(72) Изобретатель:
Абелиович Аса (US), Севины
Джеффри (CH), Льюис Трэвис (US),
Успенская Ольга (FR)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям и способам для лечения нейродегенеративных нарушений, таких как лобно-височная деменция (FTD). В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения FTD путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, экспрессионных конструкций, содержащих трансген, кодирующий програнулин или его часть.

A1

202390327

202390327

A1

ВИДЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] В настоящей заявке заявляется преимущество предварительной заявки на патент США № 63/063852, поданной 10 августа 2020 г., описание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[2] Содержание текстового файла, представленного в электронном виде, включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Копия перечня последовательностей представлена в машиночитаемом формате (название файла: PRVL_016_01WO_SeqList.txt, дата регистрации: 10 августа 2021 г., размер файла: ~ 612834 байта).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Болезнь Гоше представляет собой редкую врожденную ошибку метаболизма гликофинголипидов вследствие дефицита лизосомальной кислой β -глюкоцереброзидазы (GCase, «GBA»). Пациенты страдают симптомами и патологиями, не связанными с ЦНС, включая гепатоспленомегалию, недостаточность костного мозга, приводящую к панцитопении, нарушения со стороны легких и фиброз, а также дефекты костей. Кроме того, значительное число пациентов страдает неврологическими проявлениями, включая расстройства саккадических движений глаз и взгляда, судороги, когнитивные расстройства, задержку развития и двигательные нарушения, включая болезнь Паркинсона. Существует несколько терапевтических средств, которые воздействуют на периферическое заболевание и основные клинические проявления в гемопоэтическом костном мозге и внутренних органах, в том числе средства ферментной заместительной терапии, описанные ниже, шапероноподобные низкомолекулярные лекарственные средства, которые связываются с дефектной GCase и улучшают стабильность, и средство субстрат-

редуцирующей терапии, которое блокирует продуцирование субстратов, которые накапливаются при болезни Гоше, приводя к симптомам и патологиям. Однако другие аспекты болезни Гоше (в частности те, которые поражают скелет и головной мозг), по-видимому, являются рефрактерными к лечению.

[5] Програнулин (PGRN) представляет собой дополнительный белок, связанный с лизосомальной функцией. PGRN кодируется геном *GRN*. Гаплонедостаточность *GRN* у людей приводит к примерно 90% риску развития FTD-GRN (лобно-височной деменции с мутацией *GRN*) — нейродегенеративного заболевания, характеризующегося нарушением исполнительной функции, изменениями в поведении и речевыми трудностями, сопровождающимися атрофией лобной и височной долей. Виды терапии, модифицирующие течение заболевания, недоступны для пациентов с FTD.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] В данном документе предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

[7] Дополнительно в данном документе предусмотрен способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с

мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

[8] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, промотор представляет собой промотор гена бета-актина курицы (CBA). В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, вектор на основе rAAV дополнительно содержит энхансер цитомегаловируса (CMV). В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, вектор на основе rAAV дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE). В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, вектор на основе rAAV дополнительно содержит сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста.

[9] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, нуклеиновая кислота содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса, фланкирующие экспрессионную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, каждая последовательность ITR представляет собой последовательность ITR AAV2.

[10] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, вектор на основе гAAV дополнительно содержит область TRY между 5'-ITR и экспрессионной конструкцией, где область TRY содержит SEQ ID NO: 28.

[11] В данном документе предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего:

(i) вектор на основе гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' - к 3'-концу:

(a) ITR аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 2;

(b) энхансер цитомегаловируса (CMV);

(c) промотор гена бета-актина курицы (CBA);

(d) трансгенную вставку, кодирующую белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68;

(e) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE);

(f) сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста и

(g) инвертированный концевой повтор (ITR) AAV2; и

(ii) капсидный белок AAV9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

[12] Дополнительно в данном документе предусмотрен способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' - к 3'-концу:

(a) ITR аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 2;

(b) энхансер цитомегаловируса (CMV);

(c) промотор гена бета-актина курицы (CBA);

(d) трансгенную вставку, кодирующую белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68;

(e) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE);

(f) сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста и

(g) инвертированный концевой повтор (ITR) AAV2; и

(ii) капсидный белок AAV9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

[13] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, rAAV вводят посредством инъекции в большую цистерну.

[14] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, rAAV вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 1×10^{13} геномов векторов (vg) до приблизительно 7×10^{14} vg. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, rAAV вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg.

[15] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, rAAV вводят в составе, содержащем приблизительно 20 mM Tris,

pH 8,0, приблизительно 1 mM MgCl₂, приблизительно 200 mM NaCl и приблизительно 0,001% вес/об. полоксамера 188.

[16] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, метилпреднизолон вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, за один день до введения гAAV либо в тот же день с ним.

[17] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, преднизон вводят перорально (A) в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения приблизительно 1000 мг метилпреднизолонa; и (B) постепенно снижают его дозу в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из (A).

[18] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, ритуксимаб вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, в любой отдельный день между 14 днями до и 1 днем до введения гAAV.

[19] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, метилпреднизолон вводят до введения ритуксимаба. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, метилпреднизолон вводят за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения ритуксимаба. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, как метилпреднизолон, так и ритуксимаб вводят за день до введения гAAV; и метилпреднизолон вводят за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения ритуксимаба. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, ритуксимаб вводят в любой отдельный день между 14 днями до и 2 днями до введения гAAV; и метилпреднизолон вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения ритуксимаба в тот же день, в который вводят ритуксимаб.

[20] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, сиролимус вводят перорально (A) в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV и (B) в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания

остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV; где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, вводимую дозу сиролимуса постепенно снижают в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода после введения гAAV.

[21] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг;

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение гAAV посредством инъекции в большую цистерну на следующий день после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iv) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (i), и

(v) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (iv);

(vi) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV на стадии (iii);

(vii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV на стадии (iii); где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(viii) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (vii).

[22] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, в любой отдельный день между 14 днями до и 2 днями до введения гAAV на стадии (iv);

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, за один день до введения гAAV на стадии (iv) либо в тот же день с ним;

(iv) введение гAAV посредством инъекции в большую цистерну;

(v) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (iii), и

(vi) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (v);

(vii) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV на стадии (iv);

(viii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV на стадии (iii); где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(ix) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (viii).

[23] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, иммунный ответ представляет собой иммунный ответ на гAAV. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, иммунный ответ представляет собой Т-клеточный ответ. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, иммунный ответ представляет собой В-клеточный ответ. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, иммунный ответ представляет собой ответ с образованием антител. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, иммунный ответ представляет собой плеоцитоз. В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, плеоцитоз представляет собой плеоцитоз в цереброспинальной жидкости (CSF). В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, иммунный ответ представляет собой аномальный уровень белка CSF.

[24] В некоторых вариантах осуществления способов, предусмотренных в данном документе, субъекту дополнительно вводят дополнительный иммунодепрессант, который не представляет собой сиролимус, метилпреднизолон, ритуксимаб или преднизон.

[25] В данном документе предусмотрена терапевтическая комбинация рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего:

(i) вектор на основе гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона,

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

[26] Дополнительно в данном документе предусмотрена терапевтическая комбинация

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона,

для применения в способе подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие.

[27] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая комбинация, предусмотренная в данном документе, содержит от приблизительно 1×10^{13} vg до приблизительно 7×10^{14} vg rAAV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая комбинация, предусмотренная в данном документе, содержит приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg rAAV.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[28] На фиг. 1 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (например, *GBA1* или его часть).

[29] На фиг. 2 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую

ГСаду (*например, GBA1* или его часть) и LIMP2 (SCARB2) или его часть. Последовательности, кодирующие ГСаду и LIMP2, разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

[30] На фиг. 3 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую ГСаду (*например, GBA1* или его часть) и LIMP2 (SCARB2) или его часть. Экспрессия каждой из последовательностей, кодирующих ГСаду и LIMP2, управляется отдельным промотором.

[31] На фиг. 4 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую ГСаду (*например, GBA1* или его часть), LIMP2 (SCARB2) или его часть и интерферирующую РНК для α -Syn.

[32] На фиг. 5 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую ГСаду (*например, GBA1* или его часть), просапозин (*например, PSAP* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

[33] На фиг. 6 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую ГСаду (*например, GBA1* или его часть) и просапозин (*например, PSAP* или его часть). Последовательности, кодирующие ГСаду и просапозин, разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

[34] На фиг. 7 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую ГСаду (*например, GBA1* или его часть). В данном варианте осуществления вектор содержит промоторный элемент СВА (CBA), состоящий из четырех частей: энхансера CMV (CMVe), промотора СВАр (CBAp), экзона 1 и интрона (int) для конститутивной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности *GBA1* человека. 3'-область также содержит регуляторный элемент WPRE, за которым расположен поли(А)-хвост bGH. В 5'-конец промоторной области включены три регуляторных сайта активации транскрипции: TATA, RBS и YY1. Фланкирующие ITR обеспечивают правильную упаковку вставочных последовательностей.

Оценивали два варианта последовательности 5'-ITR (блок-вставка); они имеют несколько нуклеотидных различий в пределах 20-нуклеотидной области «D» ITR AAV2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит нуклеотидную последовательность домена «D», показанную в верхней строке. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV содержит мутантный домен «D» (*например*, домен «S» с нуклеотидными изменениями, показанными в нижней строке).

[35] На фиг. 8 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, описанного на фиг. 6.

[36] На фиг. 9 показаны иллюстративные данные о доставке гAAV, содержащего трансген, кодирующий GСазу (*например*, *GBA1* или его часть), в мышинной модели болезни Паркинсона с СВЕ. Ежедневную IP доставку среды-носителя PBS, 25 мг/кг СВЕ, 37,5 мг/кг СВЕ или 50 мг/кг СВЕ (слева направо) начинали в Р8. Выживаемость (вверху слева) проверяли два раза в день, и вес (вверху справа) проверяли ежедневно. Все группы начинались с $n = 8$. Поведение оценивали по общему пройденному расстоянию в тесте «открытое поле» (внизу слева) в Р23 и по задержке падения в тесте с вращающимся стержнем (внизу посередине) в Р24. Уровни субстратов GСазы анализировали в коре головного мозга мышей в группах обработки PBS и 25 мг/кг СВЕ как с отменой СВЕ (день 3), так и без нее (день 1). Совокупные уровни GluSph и GalSph (внизу справа) показаны в виде пмоль на мг сырого веса ткани. Представлены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ — номинальные p -значения для групп обработки согласно линейной регрессии.

[37] На фиг. 10 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления плана исследования для максимальной дозы гAAV в мышинной модели с СВЕ. Вкратце, гAAV доставляли посредством ICV инъекции в Р3, и ежедневную обработку с помощью СВЕ начинали в Р8. Поведение оценивали посредством анализов с использованием теста «открытое поле» и теста с вращающимся стержнем в Р24-25, и уровни субстрата измеряли в Р36 и Р38.

[38] На фиг. 11 показаны иллюстративные данные в отношении прижизненной оценки максимальной дозы гAAV в мышинной модели с СВЕ. В Р3

мышей обрабатывали с помощью вспомогательного вещества либо $8,8 \times 10^9$ vg rAAV-GBA1 посредством ICV доставки. Ежедневную IP доставку PBS либо 25 мг/кг CBE начинали в P8. В конце исследования половину мышей умерщвляли через день после их последней дозы CBE в P36 (день 1), тогда как оставшуюся половину подвергали 3-дневной отмене CBE перед умерщвлением в P38 (день 3). Во всех группах обработки (вспомогательное вещество + PBS, $n = 8$, rAAV-GBA1 + PBS, $n = 7$, вспомогательное вещество + CBE, $n = 8$ и вариант + CBE, $n = 9$) проводили взвешивание ежедневно (вверху слева), и вес анализировали в P36 (вверху справа). Поведение оценивали по общему пройденному расстоянию в тесте «открытое поле» в P23 (внизу слева) и по задержке падения в тесте с вращающимся стержнем в P24 (внизу справа), оцениваемым для каждого животного как медиана из 3 испытаний. Вследствие летальности для группы, получавшей вспомогательное вещество + CBE, для поведенческих анализов $n = 7$, тогда как для всех других групп $n = 8$. Представлены средние значения для животных. Планки погрешностей представляют собой SEM. $*p < 0,05$; $***p < 0,001$ — номинальные p -значения для групп обработки согласно линейной регрессии у животных, обработанных с помощью CBE.

[39] На фиг. 12 показаны иллюстративные данные в отношении биохимической оценки максимальной дозы rAAV в мышинной модели с CBE. Кору головного мозга из всех групп обработки (вспомогательное вещество + PBS, $n = 8$, вариант + PBS, $n = 7$, вспомогательное вещество + CBE, $n = 7$ и вариант + CBE, $n = 9$) использовали для измерения активности GCазы (вверху слева), уровней GluSph (вверху справа), уровней GluCer (внизу слева) и количества геномов векторов (внизу справа) в группах перед отменой CBE (день 1) или после нее (день 3). Биораспределение показано в виде количества геномов векторов на 1 мкг геномной ДНК. Представлены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. $(*)p < 0,1$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ — номинальные p -значения для групп обработки согласно линейной регрессии у животных, обработанных с помощью CBE, с поправкой на дни сбора и пол в качестве ковариат.

[40] На фиг. 13 показаны иллюстративные данные в отношении поведенческих и биохимических корреляций в мышинной модели с CBE после введения в группах обработки вспомогательное вещество + PBS, вспомогательное вещество + CBE и вариант + CBE. Во всех группах обработки эффективность в тесте

с вращающимся стержнем отрицательно коррелировала с накоплением GluCer (А, $p = 0,0012$ согласно линейной регрессии), и накопление GluSph отрицательно коррелировало с увеличенной активностью GСазы (В, $p = 0,0086$ согласно линейной регрессии).

[41] На фиг. 14 показаны иллюстративные данные в отношении биораспределения варианта в мышинной модели с CBE. Присутствие геномов векторов оценивали в печени, селезенке, почке и гонадах для всех групп обработки (вспомогательное вещество + PBS, $n = 8$, вариант + PBS, $n = 7$, вспомогательное вещество + CBE, $n = 7$ и вариант + CBE, $n = 9$). Биораспределение показано в виде количества геномов векторов на 1 мкг геномной ДНК. Присутствие геномов векторов количественно определяли с помощью количественной ПЦР с применением эталонной стандартной кривой для векторов; концентрацию геномной ДНК оценивали путем измерения оптической плотности A260. Представлены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ — номинальные p -значения для групп обработки согласно линейной регрессии у животных, обработанных с помощью CBE, с поправкой на дни сбора и пол в качестве ковариат.

[42] На фиг. 15 показаны иллюстративные данные в отношении прижизненной оценки диапазона доз rAAV в мышинной модели с CBE. Мыши получали вспомогательное вещество или одну из трех различных доз rAAV-GBA1 посредством ICV доставки в Р3: $3,2e9$ vg, $1,0e10$ vg или $3,2e10$ vg. В Р8 начиналась ежедневная IP обработка с помощью 25 мг/кг CBE. Мыши, которые получали вспомогательное вещество и CBE или вспомогательное вещество и PBS, служили в качестве контролей. Все группы обработки начинались с $n = 10$ (5M/5F) на группу. Всех мышей умерщвляли через один день после их последней дозы CBE (Р38-Р40). Во всех группах обработки проводили взвешивание ежедневно, и их вес анализировали в Р36. Моторную активность оценивали по задержке падения в тесте с вращающимся стержнем в Р24 и задержке прохождения в тесте «сужающаяся дорожка» в Р30. Вследствие ранней летальности число мышей, участвовавших в поведенческих анализах, составляло: вспомогательное вещество + PBS, $n = 10$, вспомогательное вещество + CBE, $n = 9$ и $3,2e9$ vg AAV-GBA1 + CBE, $n = 6$, $1,0e10$ vg rAAV-GBA1 + CBE, $n = 10$, $3,2e10$ vg rAAV-GBA1 + CBE, $n = 7$. Представлены

средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ для номинальных p -значений согласно линейной регрессии в группах, обработанных с помощью CBE, с поправкой на пол в качестве ковариаты.

[43] На фиг. 16 показаны иллюстративные данные в отношении биохимической оценки диапазона доз rAAV в мышинной модели с CBE. Кору головного мозга из всех групп обработки (вспомогательное вещество + PBS, $n = 10$, вспомогательное вещество + CBE, $n = 9$ и $3,2 \times 10^9$ vg rAAV-GBA1 + CBE, $n = 6$, $1,0 \times 10^{10}$ vg rAAV-GBA1 + CBE, $n = 10$, $3,2 \times 10^{10}$ vg rAAV-GBA1 + CBE, $n = 7$) использовали для измерения активности GСазы, уровней GluSph, уровней GluCer и количества геномов векторов. Активность GСазы показана в виде нг GСазы на мг общего белка. Уровни GluSph и GalSph показаны в виде пмоль на мг сырого веса ткани. Биораспределение показано в виде количества геномов векторов на 1 мкг геномной ДНК. Присутствие геномов векторов количественно определяли с помощью количественной ПЦР с применением эталонной стандартной кривой для векторов; концентрацию геномной ДНК оценивали путем измерения оптической плотности A260. Присутствие геномов векторов также измеряли в печени (Е). Представлены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ для номинальных p -значений согласно линейной регрессии в группах, обработанных с помощью CBE, с поправкой на пол в качестве ковариаты.

[44] На фиг. 17 показаны иллюстративные данные в отношении анализа в тесте «сужающаяся дорожка» при максимальной дозе rAAV-GBA1 в генетической мышинной модели. Моторную активность в группах обработки (WT + вспомогательное вещество, $n = 5$), 4L/PS-NA + вспомогательное вещество ($n = 6$) и 4L/PS-NA + rAAV-GBA1 ($n = 5$)) оценивали с помощью теста с прогулкой по сужающейся дорожке через 4 недели после введения rAAV-GBA1. Общее количество ошибок и активное время показаны в виде суммы за 5 испытаний на разных дорожках. Скорость и количество ошибок на определенную скорость показаны в виде среднего значения за 5 испытаний на разных дорожках. Представлены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM.

[45] На фиг. 18 показаны иллюстративные данные в отношении экспрессии *in vitro* конструкций rAAV, кодирующих белок програнулин (PGRN). На левой панели показана стандартная кривая для анализа ELISA програнулина (PGRN). На нижней

панели показана зависимость «доза-ответ» для экспрессии PGRN, измеренная с помощью анализа ELISA в клеточных лизатах клеток HEK293T, трансдуцированных с помощью rAAV. MOI = множественность заражения (геномы векторов на клетку).

[46] На фиг. 19 показаны иллюстративные данные в отношении экспрессии *in vitro* конструкций rAAV, кодирующих *GBA1* в комбинации с просапозином (*PSAP*), *SCARB2* и/или одной или более ингибирующими нуклеиновыми кислотами. Данные указывают на то, что трансфекция клеток HEK293 каждой конструкцией приводила к сверхэкспрессии трансгенов, представляющих интерес, по сравнению с ложнотрансфицированными клетками.

[47] На фиг. 20 представлено схематическое изображение векторов на основе rAAV, содержащих область «D», расположенную «снаружи» от ITR (например, проксимально по отношению к концу ITR относительно трансгенной вставки или экспрессионной конструкции) (вверху), и векторов на основе rAAV дикого типа, имеющих ITR «внутри» вектора (например, проксимально по отношению к трансгенной вставке вектора).

[48] На фиг. 21 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GBA2 или его часть и интерферирующую РНК для α -Syn.

[49] На фиг. 22 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (например, *GBA1* или его часть) и галактозилцерамидазу (например, *GALC* или его часть). Экспрессируемые последовательности, кодирующие GСазу и галактозилцерамидазу, разделены последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид T2A.

[50] На фиг. 23 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (например, *GBA1* или его часть) и галактозилцерамидазу (например, *GALC* или его часть). Экспрессируемые последовательности, кодирующие GСазу и галактозилцерамидазу, разделены последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид T2A.

[51] На фиг. 24 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть), катепсин В (*например, CTSB* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Экспрессируемые последовательности, кодирующие GСазу и катепсин В, разделены последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид T2A.

[52] На фиг. 25 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть), сфингомиелинфосфодиэстеразу 1 (*например, SMPD1* или ее часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

[53] На фиг. 26 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть) и галактозилцерамидазу (*например, GALC* или его часть). Последовательности, кодирующие GСазу и галактозилцерамидазу, разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

[54] На фиг. 27 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть) и катепсин В (*например, CTSB* или его часть). Экспрессия каждой из последовательностей, кодирующих GСазу и катепсин В, управляется отдельным промотором.

[55] На фиг. 28 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть), GCH1 (*например, GCH1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Последовательности, кодирующие GСазу и GCH1, разделены последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид T2A.

[56] На фиг. 29 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть), RAB7L1 (*например, RAB7L1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Последовательности, кодирующие GСазу и

RAB7L1, разделены последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид T2A.

[57] На фиг. 30 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть), GCH1 (*например, GCH1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Экспрессируемые последовательности, кодирующие GСазу и GCH1, разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

[58] На фиг. 31 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую VPS35 (*например, VPS35* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn и TMEM106B.

[59] На фиг. 32 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть), IL-34 (*например, IL34* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn. Последовательности, кодирующие GСазу и IL-34, разделены последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид T2A.

[60] На фиг. 33 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть) и IL-34 (*например, IL34* или его часть). Последовательности, кодирующие GСазу и IL-34, разделены внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES).

[61] На фиг. 34 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть) и TREM2 (*например, TREM2* или его часть). Экспрессия каждой из последовательностей, кодирующих GСазу и TREM2, управляется отдельным промотором.

[62] На фиг. 35 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть) и IL-34 (*например, IL34* или его часть).

Экспрессия каждой из последовательностей, кодирующих GCазу и IL-34, управляется отдельным промотором.

[63] На фиг. 36А - фиг. 36В показаны иллюстративные данные в отношении сверхэкспрессии TREM2 и GBA1 в клетках HEK293 по сравнению с контрольными трансдуцированными клетками, измеренной посредством qPCR и ELISA. На фиг. 36А показаны данные в отношении сверхэкспрессии TREM2. На фиг. 36В показаны данные в отношении сверхэкспрессии GBA1 из этой же конструкции.

[64] На фиг. 37 показаны иллюстративные данные, указывающие на успешный сайленсинг *SNCA in vitro* согласно анализу по репортерному гену GFP (вверху) и анализу α -Syn (внизу).

[65] На фиг. 38 показаны иллюстративные данные, указывающие на успешный сайленсинг *TMEM106B in vitro* согласно анализу по репортерному гену GFP (вверху) и анализу α -Syn (внизу).

[66] На фиг. 39 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN.

[67] На фиг. 40 показаны данные для трансдукции клеток HEK293 с применением гAAV, имеющих ITR с характерным для дикого типа (кружки) или альтернативным (например, «снаружи»; квадраты) расположением последовательности «D». гAAV, имеющие ITR, расположенные «снаружи», были способны трансдуцировать клетки так же эффективно, как и гAAV, имеющие ITR дикого типа.

[68] На фиг. 41 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GCазу (например, *GBA1* или его часть).

[69] На фиг. 42 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GCазу (например, *GBA1* или его часть).

[70] На фиг. 43 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

[71] На фиг. 44 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN.

[72] На фиг. 45 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN.

[73] На фиг. 46 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN, и интерферирующую РНК для тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (МАРТ).

[74] На фиг. 47 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть) и интерферирующую РНК для α -Syn.

[75] На фиг. 48 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PSAP.

[76] На фиг. 49 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть).

[77] На фиг. 50 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например, GBA1* или его часть) и галактозилцерамидазу (*например, GALC* или его часть).

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

[79] На фиг. 52А показано, что линии нейрональных стволовых клеток (NSC), происходящие из iPSC, от пациентов с мутациями FTD-GRN секретировали меньше програнулина, чем линии NSC, полученные от здоровых контрольных субъектов. Статистические показатели определяли с применением непарного t-критерия; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM.

[80] На фиг. 52В показаны результаты трансдукции PR006A с подбором дозы в нейрональных культурах, являющихся носителями мутации FTD-GRN. NSC были высеяны при равной плотности и дифференцировались в нейроны. В день 7 нейроны трансдуцировали с помощью вспомогательного вещества или указанных количеств PR006A в течение 72 часов. Экспрессию секретируемого програнулина измеряли в клеточных средах посредством ELISA и нормализовали относительно объема ($n = 3-4$; среднее значение $\pm$ SEM). Черной пунктирной линией представлены эндогенные уровни секретируемого програнулина из контрольных нейронов (обработанных вспомогательным веществом). Секретируемый програнулин не поддавался выявлению в обработанных вспомогательным веществом нейронах с FTD-GRN. Статистические показатели определяли с применением ANOVA, а затем HSD-критерия Тьюки, и статистическое сравнение каждого состояния с контрольными нейронами, обработанными вспомогательным веществом, указано на графике, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$. LLOQ = нижний предел количественного определения; MOI = множественность заражения.

[81] На фиг. 52С показано, что обработка с помощью PR006 нейрональных культур приводила к устранению дефектного созревания ключевой лизосомальной протеазы катепсина D в нейрональных культурах с FTD-GRN. NSC были высеяны при равных концентрациях и дифференцировались в нейроны. В день 7 нейроны трансдуцировали с помощью вспомогательного вещества или PR006A при MOI, составляющей $5,3 \times 10^5$, в течение 72 часов. Нейроны лизировали и лизаты анализировали на системе для вестерн-блоттинга Jess от ProteinSimple с первичным антителом к катепсину D (CTSD). Выявляли полосы, соответствующие как зрелому катепсину D (matCTSD), так и прокатепсину D (proCTSD), и площадь под кривой определяли количественно для каждой полосы и нормализовали относительно внутреннего сигнала нормализации для общего белка. Определяли соотношение

matCTSD/proCTSD в нейронах с FTD-GRN, обработанных вспомогательным веществом или с помощью PR006A; по оси y изображено соотношение matCTSD/proCTSD в виде процентной доли от соотношения в контрольных нейронах, обработанных вспомогательным веществом ($n = 3$; среднее значение $\pm$ SEM). Статистические показатели определяли с применением парного t-критерия, $* = p < 0,05$.

[82] На фиг. 52D и фиг. 52F показано, что PR006A уменьшает интенсивность патологии TDP-43 в нейрональных культурах с FTD-GRN. NSC были высеяны при равных концентрациях и дифференцировались в нейроны. В день 7 нейроны трансдуцировали с помощью вспомогательного вещества или PR006A при MOI, составляющей $5,3 \times 10^5$, и собирали через 21 день после трансдукции. Фиг. 52D. Нейроны лизировали, и нерастворимую в Triton-X фракцию белка выделяли и анализировали на системе для вестерн-блоттинга Jess от ProteinSimple с антителом к TDP-43 (№ 12892-AP-1). Выявляли полосу, соответствующую TDP-43, и площадь под кривой количественно определяли для каждой полосы и нормализовали относительно концентрации общего белка в нерастворимой фракции. По оси y изображено количество нерастворимого TDP-43 в виде процентной доли от уровней при обработке вспомогательным веществом, нормализованной отдельно для каждой линии клеток с FTD-GRN ($n = 3$; среднее значение $\pm$ SEM). На фиг. 52D показано, что обработка с помощью PR006 приводит к снижению уровня нерастворимого TDP-43, характерного признака патологии FTD-GRN, в нейрональных культурах с FTD-GRN. Фиг. 52F. Количественная оценка сигнала ядерного TDP-43 по иммунофлуоресцентным изображениям нейронов, происходящих из iPSC, обработанных с помощью PR006A. Определяли интенсивность сигнала TDP-43 на ядро в нейронах с FTD-GRN, обработанных вспомогательным веществом или с помощью PR006A; по оси y изображена интенсивность сигнала TDP-43 на ядро в виде процентной доли от интенсивности сигнала TDP-43 на ядро в контрольных нейронах, обработанных вспомогательным веществом ($n = 145-306$ клеток; среднее значение $\pm$ SEM). Уровень TDP-43 измеряли с помощью антитела к TDP-43 (№ 12892-AP-1), и площадь ядра определяли с помощью окрашивания DAPI. На фиг. 52F показано, что обработка с помощью PR006 приводила к повышению уровней экспрессии ядерного TDP-43 в нейрональных культурах с FTD-GRN почти до

контрольных уровней, характерных для дикого типа. Статистические показатели определяли с применением непарного t-критерия; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

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

[84] На фиг. 52G представлена серия изображений, демонстрирующих, что линии нейрональных стволовых клеток (NSC) из линий клеток с FTD-GRN человека и контрольных линий клеток человека успешно дифференцировались в нейрональные культуры. Контрольные линии NSC и линии NSC с FTD-GRN (FTD-GRN №1 и FTD-GRN №2) дифференцировались в нейроны после периода 7 дней, на что указывает морфология клеток и иммунофлуоресцентное окрашивание на нейрональные маркеры (NeuN [красный]; MAP2 или Тау, как отмечено слева [зеленый]). DAPI (голубой) применяли для окрашивания ядра.

[85] На фиг. 53А – фиг. 53С представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов по анализу биораспределения и экспрессии програнулина в ЦНС в исследовании с подбором дозы PR006A в модели на взрослых мышях с FTD-GRN. Мышам с KO *Grn* в возрасте 4 месяцев давали PR006A или вспомогательное вещество путем ICV введения. Их умерщвляли через 3 месяца после обработки вспомогательным веществом (красный) или с помощью PR006A в дозе, составляющей $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (голубой), для анализа биохимических конечных точек в ЦНС. Фиг. 53А. Присутствие геномов векторов оценивали в коре головного мозга и спинном мозге, и биораспределение показано в виде количества геномов векторов на мкг gDNA на логарифмической шкале ($n = 8-10$ /группа; среднее значение $\pm$ SEM). Присутствие геномов векторов количественно определяли посредством qPCR с применением эталонной стандартной кривой для векторов. Пунктирная линия (при 50 геномов векторов/мкг gDNA) представляет порог положительного присутствия векторов. Фиг. 53В. Экспрессию РНК *GRN*, кодируемой PR006A, оценивали с помощью количественной RT-PCR (qRT-PCR) в коре головного мозга ($n = 8-10$ /группа; среднее значение $\pm$ SEM).

Количество копий *GRN* (специфичных для кодон-оптимизированной последовательности PR006A согласно настоящему изобретению) нормализовали относительно 1 мкг общей РНК, и оно показано на логарифмической шкале. Фиг. 53С. Уровни белка програнулина измеряли с применением ELISA для програнулина, специфичного для человека, в головном мозге и спинном мозге ($n = 8-10/\text{группа}$; среднее значение $\pm$ SEM). Уровни програнулина в тканях нормализовали относительно концентрации общего белка. Нижний предел количественного определения (LLOQ) указан пунктирной серой линией. Для анализов ELISA в тканях значения LLOQ (нг/мг) определяют путем деления LLOQ анализа (нг/мл) на среднюю концентрацию общего белка во всех образцах. Простая линия, соответствующая цвету условного обозначения группы обработки, по оси x без планок погрешностей указывает на то, что для всех животных в этой группе значение составляло 0. Статистический анализ проводили с применением ANOVA, а затем критерия Даннетта для сравнения с группой мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. vg = геномы векторов; LLOQ = нижний предел количественного определения; SC = спинной мозг.

[86] На фиг. 53D – фиг. 53Е представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов по анализу биораспределения в периферических тканях и экспрессии програнулина в исследовании с подбором дозы PR006A в модели на взрослых мышах с FTD-GRN. Мышам с КО *Grn* в возрасте 4 месяцев давали PR006A или вспомогательное вещество путем ICV введения. Их умерщвляли через 3 месяца после обработки вспомогательным веществом (красный) или с помощью PR006A в дозе, составляющей $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (голубой) для анализа биохимических конечных точек в печени, сердце, легком, почке, селезенке и гонадах. Фиг. 53D. Оценивали присутствие геномов векторов, и биораспределение показано в виде количества геномов векторов на мкг gDNA на логарифмической шкале ($n = 8-10/\text{группа}$; среднее значение $\pm$ SEM). Присутствие геномов векторов количественно определяли посредством qPCR с применением эталонной стандартной кривой для векторов. Пунктирная линия (при 50 геномов векторов/мкг gDNA) представляет порог положительного присутствия векторов. Фиг. 53Е. Уровни белка програнулина измеряли с применением ELISA ($n =$

8-10/группа; среднее значение $\pm$ SEM). Уровни програнулина в тканях нормализовали относительно концентрации общего белка. Простая линия, соответствующая цвету условного обозначения группы обработки, по оси x без планок погрешностей указывает на то, что для всех животных в этой группе значение составляло 0. Статистический анализ проводили с применением ANOVA, а затем критерия Даннетта для сравнения с группой мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом; * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$. vg = геномы векторов.

[87] На фиг. 53F представлена гистограмма, на которой изображены результаты экспериментов по анализу уровней програнулина в плазме крови в исследовании с подбором дозы PR006A в модели на взрослых мышах с FTD-GRN. Мышам с КО *Grn* в возрасте 4 месяцев давали PR006A или вспомогательное вещество путем ICV введения. Их умерщвляли через 3 месяца после обработки вспомогательным веществом (красный) или с помощью PR006A в дозе, составляющей $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (голубой), для анализа биохимических конечных точек в плазме крови. Уровни белка програнулина измеряли с применением ELISA для програнулина, специфичного для человека, в плазме крови ($n = 8-10$ /группа; среднее значение $\pm$ SEM). Уровни в плазме крови показаны на логарифмической шкале. Нижний предел количественного определения (LLOQ) указан пунктирной серой линией. Статистический анализ проводили с применением ANOVA, а затем критерия Даннетта для сравнения с группой мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. LLOQ = нижний предел количественного определения. vg = геномы векторов.

[88] На фиг. 53G – фиг. 53H представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов, демонстрирующие уменьшенные лизосомальные и нейропатологические дефекты в исследовании с подбором дозы PR006A в модели на взрослых мышах с FTD-GRN. Мышам с КО *Grn* в возрасте 4 месяцев давали PR006A или вспомогательное вещество путем ICV введения. Их умерщвляли для анализа через 3 месяца после обработки вспомогательным веществом (красный) или с помощью PR006A в дозе, составляющей $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) или $1,1 \times 10^{11}$

vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (голубой). Липофусциноз анализировали двумя независимыми способами: (1) оценивание в баллах окрашенных с помощью Н&Е срезов головного мозга патологоанатомом и (2) количественная оценка аутофлуоресценции липофусцина из ИНС-срезов. Фиг. 53G. Накопление липофусцина (аутофлуоресцентных гранул липофусцина) оценивалось в баллах полуколичественным способом в окрашенных с помощью Н&Е срезах в различных областях головного мозга патологоанатомом высшей категории в слепом режиме в соответствии со следующей схемой классификации: 0 = липофусцин не наблюдается; 1 = очень небольшие гранулы липофусцина (<2 мкм), рассеянные по всей области; 2 = повышенная плотность накопления небольших гранул и/или развитие более крупных гранул ($> 2-3$ мкм); 3 = многоочаговые области с высокой плотностью гранул липофусцина, видимых при малом увеличении объектива; 4 = обширное накопление липофусцина. Показаны баллы тяжести накопления липофусцина в областях головного мозга, представляющих собой кору головного мозга, гиппокамп и таламус/гипоталамус ($n = 8-10$ /группа). Фиг. 53H. ИНС-анализ убиквитина проводили и количественно оценивали в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе. Размер надпороговых иммунореактивных объектов (размер иммунореактивных объектов [мкм²] показан для убиквитина ($n = 8-10$ /группа; среднее значение $\pm$ SEM). Статистические показатели определяли посредством ANOVA, а затем критерия Даннетта для сравнения с группой мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. vg = геномы векторов; WT = дикий тип.

[89] На фиг. 53I – фиг. 53K представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов, демонстрирующие сниженные уровни нейровоспалительных маркеров в исследовании с подбором дозы PR006A в модели на взрослых мышах с FTD-GRN. Мышам с КО *Grn* в возрасте 4 месяцев давали PR006A или вспомогательное вещество путем ICV введения. Их умерщвляли для анализа через 3 месяца после обработки вспомогательным веществом (красный) или с помощью PR006A в дозе, составляющей $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (голубой). Фиг. 53I. Экспрессию генов (уровни мРНК) *Tnf* и *Cd68* измеряли посредством qRT-PCR в соматосенсорной коре головного мозга (среднее

значение $\pm$ SEM; $n = 8-10$ /группа). Экспрессию генов нормализовали относительно гена «домашнего хозяйства» *Ppib*. Фиг. 53J – фиг. 53K. ИHC-анализ Iba1 (фиг. 53J) и GFAP (фиг. 53K) проводили и количественно оценивали в фиксированных срезах головного мозга в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе. Показан процент площади, представляющей интерес, покрытой надпороговыми объектами (площадь иммунореактивной области [%]) (среднее значение $\pm$ SEM; $n = 8-10$ /группа). Статистические показатели определяли с применением ANOVA с поправкой Даннетта, сравнивая каждую группу с группой мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом, $* = p < 0,05$, $*** = p < 0,001$. vg = геномы векторов; WT = дикий тип.

[90] На фиг. 53L – фиг. 53N представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов, демонстрирующие сниженную экспрессию генов лизосомальных и иммунных путей в исследовании с подбором дозы PR006A в модели на взрослых мышах с FTD-GRN. Мышам с КО *Grn* в возрасте 4 месяцев давали PR006A или вспомогательное вещество путем ICV введения. Их умерщвляли для анализа через 3 месяца после обработки вспомогательным веществом (красный) или с помощью PR006A в дозе, составляющей $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (голубой). Секвенирование РНК проводили в образцах коры головного мозга от мышей с КО *Grn*, обработанных с помощью ICV, и от мышей C57BL/6J WT в соответствующей возрастной группе (серый). Методику анализа вариации групп генов (GSVA) применяли для сравнения уровней экспрессии мРНК из ранее опубликованных генных сигнатур, дисрегуляция которых наблюдается у мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом, по сравнению с мышами WT. Показанные данные представляют собой баллы активности в GSVA для специально подобранных групп генов из двух опубликованных исследований и одного характерного пути. Фиг. 53L. Клеточный компонент: вакуоль (GO:0005773), фиг. 53M: лизосома и фиг. 53N: система комплемента (характерный путь) (медиана $\pm$ диапазон; $n = 8-10$ /группа). Статистический анализ проводили с применением ANOVA, а затем критерия Даннетта для сравнения с группой мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом, при контроле частоты ошибок I типа с

поправкой на эффект множественных сравнений; *** = $p < 0,001$. GSVA = анализ вариации групп генов; vg = геномы векторов; WT = дикий тип.

[91] На фиг. 54A представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов по анализу биораспределения трансгена PR006A, количественно определенного посредством qPCR. Уровни трансгена анализировали с применением методик qPCR у NHP через 182 дня после ICM инъекции вспомогательного вещества, низкой дозы PR006A ($6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга) либо высокой дозы PR006A ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга). Каждый столбец представляет среднее значение $\pm$ SEM для 3 животных на группу; желтая линия указывает на нижний предел количественного определения при 50 vg/мкг ДНК.

[92] На фиг. 54B представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов по анализу уровней антитела к лекарственному средству, вырабатываемого к програнулину человека. Показаны антитела к програнулину в образцах сыворотки крови и CSF NHP в день 29 и день 182 после обработки вспомогательным веществом, низкой дозой PR006A ($6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга) либо высокой дозой PR006A ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга). Данные представляют среднее значение $\pm$ SEM.

[93] На фиг. 54C представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов по анализу экспрессии трансгена PR006A (*GRN*). Уровни экспрессии *GRN* определяли в коре головного мозга, гиппокампе и вентральной области среднего мозга NHP, собранных в день 183, с применением RT-qPCR. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM.

[94] На фиг. 54D представлена гистограмма, на которой изображены результаты экспериментов по анализу уровней програнулина в CSF, количественно определенных с помощью платформы Simple Western™ (Jess). Уровни програнулина определяли в образцах CSF NHP, которые собирали в день 183, определенные посредством анализа Simple Western™ (Jess). Показаны образцы CSF от NHP, обработанных вспомогательным веществом, низкой дозой PR006A ($6,5 \times 10^9$ vg/г веса головного мозга) или высокой дозой PR006A ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г веса головного мозга). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM; P-значение: * $p < 0,05$,

согласно одностороннему анализу зависимости «доза-ответ» с применением критерия тенденций Вильяма.

[95] На фиг. 55 представлен график, на котором показаны результаты определения селективности и специфичности для автоматизированного вестерн-блот-анализа на Jess. Уровни белка програнулина в образцах CSF пациентов с FTD выявляли при 58 кДа с помощью Jess. Группа (A): гетерозиготные пациенты с FTD, и группы (B) и (C): семейные не являющиеся носителями или нормальные индивидуумы. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего значения (SEM). Значения SEM показаны в виде вертикальных планок погрешностей.

[96] На фиг. 56 представлен график, на котором показаны уровни програнулина в образцах CSF у пациентов с FTD, выявленные посредством ELISA. Группа (A): гетерозиготные пациенты с FTD, и группы (B) и (C): семейные не являющиеся носителями или нормальные индивидуумы. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего значения (SEM). Значения SEM показаны в виде вертикальных планок погрешностей.

[97] На фиг. 57 представлено изображение каждого образца CSF в геле, прогоняемого в двух повторностях на автоматизированной платформе для вестерн-блоттинга Jess. Образцы анализировали при 4-кратном разведении с использованием первичного антитела PG-359-7 AdipoGen. Первая дорожка представляет собой стандарты молекулярного веса, и справа представлена идентификация полос, используемая для расчета иммунореактивности, о которой сообщается в примере 14.

[98] На фиг. 58A – 58B представлена серия графиков, на которых показано измерение уровней экспрессии PGRN человека. Уровни экспрессии PGRN человека определяли в образцах CSF приматов, отличных от человека (NHP), которые собирали в день 180, с применением анализа Simple Western™ (Jess). Анализировали CSF от NHP, обработанных вспомогательным веществом («вспомогательное вещество»), низкой дозой PR006A ($6,5 \times 10^9$ vg/г веса головного мозга; «низкая») или высокой дозой PR006 ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г веса головного мозга; «высокая»). Данные выражены в виде средней площади пика иммунореактивности (фиг. 58A) или кратности изменения по сравнению с животными, обработанными вспомогательным

веществом (фиг. 58B). Каждая точка представляет один образец CSF от одного NHP (среднее значение для двух технических повторностей), и блок представляет среднее значение $\pm$ стандартная ошибка для трех отдельных NHP.

[99] На фиг. 59A – фиг. 59C представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов по анализу биораспределения и экспрессии програнулина в ЦНС в модели на старых мышах с FTD-GRN после обработки с помощью PR006A. Образцы тканей собирали от мышей с КО *Grn* в возрасте 18 месяцев через 2 месяца после получения ICV вспомогательного вещества (красный) или $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) PR006A (голубой). Фиг. 59A. Присутствие геномов векторов оценивали в коре головного мозга и спинном мозге (среднее значение $\pm$ SEM; $n = 4$ /группа). Биораспределение показано в виде количества геномов векторов на 1 мкг gDNA на логарифмической шкале. Присутствие геномов векторов количественно определяли посредством qPCR с применением эталонной стандартной кривой для векторов. Пунктирная линия (при 50 геномов векторов/мкг gDNA) представляет порог положительного присутствия векторов. Фиг. 59B – фиг. 59C. Уровни белка програнулина измеряли с применением ELISA в тканях ЦНС (головной мозг и спинной мозг (фиг. 59B)) и CSF (фиг. 59C) (среднее значение $\pm$ SEM; $n = 4$ /группа). Уровни програнулина в тканях нормализовали относительно концентрации общего белка, и уровни програнулина в CSF нормализовали относительно объема жидкости. Нижний предел количественного определения (LLOQ) указан пунктирной серой линией. Для анализов ELISA в тканях значения LLOQ (нг/мг) определяли путем деления LLOQ анализа (нг/мл) на среднюю концентрацию общего белка во всех образцах. Простая красная линия по оси x без планок погрешностей указывает на то, что для всех животных в этой группе значение составляло 0. Статистические анализы проводили с применением критерия Краскела-Уоллиса; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. vg = геномы векторов; LLOQ = нижний предел количественного определения; SC = спинной мозг.

[100] На фиг. 59D – фиг. 59E представлена серия гистограмм и изображений, на которых изображены результаты экспериментов, демонстрирующие уменьшенные лизосомальные и нейропатологические дефекты в модели на старых мышах с FTD-GRN после обработки с помощью PR006A. Образцы тканей собирали от мышей с КО *Grn* в возрасте 18 месяцев через 2 месяца после получения ICV вспомогательного

вещества (красный) или $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) PR006A (голубой). Липофусциноз анализировали путем оценивания в баллах патологоанатомом окрашенных с помощью Н&Е срезов головного мозга. Фиг. 59D. Иллюстративные изображения липофусцина из области таламуса/гипоталамуса на срезах головного мозга. Белыми стрелками указаны примеры накопления липофусцина. Представлена сводная информация о баллах тяжести накопления липофусцина в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе/гипоталамусе окрашенных с помощью Н&Е микропрепаратов из срезов головного мозга, в которых оценивали наличие аутофлуоресцентных гранул липофусцина. Накопление липофусцина оценивалось в баллах полуколичественным способом патологоанатомом высшей категории в слепом режиме в соответствии со следующей схемой классификации: 0 = липофусцин не наблюдается; 1 = очень небольшие гранулы липофусцина (<2 мкм), рассеянные по всей области; 2 = повышенная плотность накопления небольших гранул и/или развитие более крупных гранул ($> 2-3$ мкм); 3 = многоочаговые области с высокой плотностью гранул липофусцина, видимых при малом увеличении объектива; 4 = обширное накопление липофусцина. Фиг. 59E. ИHC-анализ убиквитина ($n = 4/\text{группа}$) проводили и количественно оценивали в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе. Показана плотность положительных клеток (клетки/мм²) для каждой области (среднее значение $\pm$ SEM). Статистические показатели определяли с применением t-критерия, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, vg = геномы векторов.

[101] На фиг. 59F – фиг. 59I представлена серия гистограмм, на которых изображены результаты экспериментов, демонстрирующие сниженные уровни нейровоспалительных маркеров в модели на старых мышах с FTD-GRN после обработки с помощью PR006A. Образцы тканей собирали от мышей с КО *Grn* в возрасте 18 месяцев через 2 месяца после получения ICV вспомогательного вещества (красный) или $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) PR006A (голубой). Фиг. 59F. Экспрессию генов *Tnf* и *Cd68* измеряли посредством qRT-PCR в соматосенсорной коре головного мозга (среднее значение $\pm$ SEM; $n = 4/\text{группа}$). Экспрессию генов нормализовали относительно гена «домашнего хозяйства» *Ppib*. (Фиг. 59G) Экспрессию белка в случае провоспалительного цитокина TNF α измеряли в коре головного мозга с применением анализа провоспалительных цитокинов мыши

MesoScale Discovery (среднее значение $\pm$ SEM; $n = 4$ /группа). Образцы коры головного мозга гомогенизировали, и уровни экспрессии белка нормализовали относительно концентрации общего белка в лизатах тканей. Фиг. 59H – фиг. 59I: ИHC-анализ Iba1 (фиг. 59H) и GFAP (фиг. 59I) проводили и количественно оценивали в фиксированных срезах головного мозга. Показана обобщенная картина плотности положительных клеток (клетки/мм²) из трех проанализированных областей головного мозга (коры головного мозга, гиппокампа и таламуса) (среднее значение $\pm$ SEM; $n = 3$ -4/группа). Статистические анализы проводили с применением t-критерия, * = $p < 0,05$. vg = геномы векторов.

[102] На фиг. 60 показан график, на котором изображена кривая зависимости «доза-ответ» в клетках HEK293T, трансдуцированных с помощью PR006A ($n = 2$; среднее значение $\pm$ SEM). Равное количество клеток трансдуцировали с помощью различных количеств PR006A. Через 72 часа уровни белка програнулина в клеточных средах измеряли с применением анализа ELISA.

[103] На фиг. 61 представлена диаграмма плана исследования для PR006A в максимальной дозе в модели на старых мышах с FTD-GRN. 10 мкл вспомогательного вещества (контроль) или PR006A в дозе, составляющей $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), доставляли путем ICV инъекции двум когортам мышей с КО *Grn*: (1) в возрасте 16 месяцев на момент инъекции ($n = 4$ -5/группа; PRV-2018-027) и (2) в возрасте 14 месяцев на момент инъекции ($n = 1$ /группа, обработанная вспомогательным веществом; $n = 3$ /группа, обработанная с помощью PR006A; PRV-2019-002). Животных умерщвляли через два месяца после инъекции. ЦНС и периферические ткани собирали для анализа биораспределения PR006A (qPCR), экспрессии белка програнулина (ELISA) и гистопатологического анализа (H&E). Экспрессию провоспалительных маркеров, накопление липофусцина и накопление убиквитина оценивали в головном мозге.

[104] На фиг. 62A – фиг. 62B представлены гистограммы, на которых показаны результаты для биораспределения в периферических тканях и экспрессии програнулина в модели на старых мышах с FTD-GRN после обработки с помощью PR006A. Образцы тканей собирали от мышей с КО *Grn* в возрасте 18 месяцев через 2 месяца после получения ICV вспомогательного вещества (красный) или $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) PR006A (голубой). Фиг. 62A. Присутствие геномов

векторов оценивали в печени, сердце, легком, почке, селезенке и гонадах (среднее значение $\pm$ SEM; $n = 4/\text{группа}$). Биораспределение показано в виде количества геномов векторов на мкг gDNA на логарифмической шкале. Присутствие геномов векторов количественно определяли посредством qPCR с применением эталонного стандарта для векторов. Фиг. 62В. Уровни белка програнулина измеряли с применением ELISA (среднее значение $\pm$ SEM; $n = 4/\text{группа}$). Уровни програнулина в тканях нормализовали относительно концентрации общего белка. Простая красная линия по оси x без планок погрешностей указывает на то, что для всех животных в этой группе значение составляло 0. Статистические анализы проводили с применением критерия Краскела-Уоллиса; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. vg = геномы векторов.

[105] На фиг. 63 представлена диаграмма плана исследования для PR006A в диапазоне доз в модели на взрослых мышах с FTD-GRN. 10 мкл вспомогательного вещества (контроль) или PR006A в дозе PR006A, составляющей $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) или $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), доставляли путем ICV инъекции мышам с КО *Grn* в возрасте 4 месяцев ($n = 10/\text{группа}$). Животных умерщвляли через три месяца после инъекции, когда мыши были в возрасте 7 месяцев. ЦНС и периферические ткани собирали для анализа биораспределения PR006A (qPCR), экспрессии белка програнулина (ELISA) и гистопатологического анализа (H&E). Экспрессию провоспалительных маркеров, накопление липофусцина, накопление убиквитина и изменения глобальной экспрессии генов оценивали в головном мозге.

[106] На фиг. 64 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (PR006A), содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую програнулин человека. «п. о.» относится к «парам оснований». «kan» относится к гену, который придает устойчивость к канамицину. «GRN» относится к «програнулину». «ITR» относится к последовательности инвертированного концевой повтора аденоассоциированного вируса. «TRY» относится к последовательности, содержащей три регуляторных сайта активации транскрипции: TATA, RBS и YY1. «CBAr» относится к промотору гена β -актина курицы. «CMVe» относится к энхансеру цитомегаловируса. «WPRE» относится к посттранскрипционному регуляторному

элементу вируса гепатита лесных сурков. «bGH» относится к сигналу для присоединения поли(А)-хвоста бычьего гормона роста. «int» относится к интрону. Нуклеотидные последовательности двух нитей PR006A представлены под SEQ ID NO: 90 и 91.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[107] Настоящее изобретение относится к видам генной терапии лобно-височной деменции (FTD). В частности, настоящее изобретение относится к схеме иммунодепрессии, применяемой в комбинации с рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (rAAV), доставляющим функциональную копию гена *GRN*, кодирующего програнулин. Схема иммунодепрессии необходима для снижения риска нежелательных явлений, связанных с иммунитетом, у субъекта, получающего лечение с помощью генной терапии.

[108] В основе настоящего изобретения частично лежат композиции и способы для экспрессии комбинаций определенных продуктов генов (*например*, продуктов генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС) у субъекта. Продукт гена может представлять собой белок, фрагмент (*например*, часть) белка, интерферирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС, *и т. п.* В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой белок или фрагмент белка, кодируемые геном, ассоциированным с заболеванием ЦНС. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой интерферирующую нуклеиновую кислоту (*например*, shRNA, siRNA, miRNA, amiRNA *и т. д.*), которая ингибирует ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС.

[109] Ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС, относится к гену, кодирующему продукт гена, который генетически, биохимически или функционально ассоциирован с заболеванием ЦНС, таким как FTD или PD (болезнь Паркинсона). Например, индивидуумы, у которых имеется патогенная мутация в гене *GRN* (который кодирует белок PGRN (програнулин)), характеризуются повышенным риском развития FTD по сравнению с индивидуумами, у которых не имеется мутация в *GRN*. Аналогично у индивидуумов, у которых имеются мутации в гене *GBA1* (который кодирует белок GCase), наблюдался повышенный риск развития PD по

сравнению с индивидуумами, у которых не имеется мутация в *GBA1*. В другом примере PD ассоциирована с накоплением белковых агрегатов, содержащих белок α -синуклеин (α -Syn); соответственно, *SNCA* (который кодирует α -Syn) представляет собой ген, ассоциированный с PD. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии, описанная в данном документе, кодирует характерную для дикого типа или немутантную форму гена, ассоциированного с заболеванием ЦНС (или его кодирующую последовательность). Примеры генов, ассоциированных с заболеваниями ЦНС, перечислены в таблице 1.

Таблица 1. Примеры генов, ассоциированных с заболеваниями ЦНС

Название	Ген	Функция	Номер доступа в NCBI
Лизосомальный мембранный белок 2	<i>SCARB2/LIMP2</i>	Лизосомальный рецептор для глюкозилцерамидазы (нацеливающийся на GBA)	NP_005497.1 (изоформа 1), NP_001191184.1 (изоформа 2)
Просапозин	<i>PSAP</i>	Предшественник для сапозинов А, В, С и D, которые локализуются в лизосомальном компартменте и облегчают катаболизм гликосфинголипидов с короткими олигосахаридными группами	AAH01503.1, AAH07612.1, AAH04275.1, AAA60303.1
Бета-глюкоцереброзидаза	<i>GBA1</i>	Расщепляет бета-глюкозидную связь глюкоцереброзида	NP_001005742.1 (изоформа 1), NP_001165282.1 (изоформа 2), NP_001165283.1 (изоформа 3)
Нелизосомальная глюкозилцерамидаза	<i>GBA2</i>	Катализирует превращение глюкозилцерамида в свободную глюкозу и церамид	NP_065995.1 (изоформа 1), NP_001317589.1 (изоформа 2)

Галактозилцерамидаза	<i>GALC</i>	Удаляет галактозу из производных церамида	EAW81359.1 (изоформа CRA_a), EAW81360.1 (изоформа CRA_b), EAW81362.1 (изоформа CRA_c)
Сфингомиелинфосфодиэстераза 1	<i>SMPD1</i>	Превращает сфингомиелин в церамид	EAW68726.1 (изоформа CRA_a), EAW68727.1 (изоформа CRA_b), EAW68728.1 (изоформа CRA_c), EAW68729.1 (изоформа CRA_d)
Катепсин В	<i>CTSB</i>	Тиоловая протеаза, которая, как полагают, участвует во внутриклеточном разрушении и метаболизме белков; также участвует в инвазии и метастазировании опухолей	AAC37547.1, AAH95408.1, AAH10240.1
Белок 1, подобный представителю RAB7 семейства онкогенов RAS	<i>RAB7L1</i>	Регулирует везикулярный транспорт	AAH02585.1
Белок 35, ассоциированный с сортировкой вакуолярных белков	<i>VPS35</i>	Компонент ретромерного карго-селективного комплекса	NP_060676.2

ГТР-циклогидролаза 1	<i>GCHI</i>	Отвечает за гидролиз гуанозинтрифосфата с образованием 7,8-дигидронеоптеринтрифосфата	AAH25415.1
Интерлейкин-34	<i>IL34</i>	Увеличивает рост или выживаемость моноцитов; вызывает активность путем связывания рецептора колониестимулирующего фактора 1	AAH29804.1
Триггерный рецептор 2, экспрессируемый на миелоидных клетках	<i>TREM2</i>	Образует рецепторный сигнальный комплекс с белком, связывающим протеинтирозинкиназу TYRO; функционирует в иммунном ответе и может участвовать в хроническом воспалении	AAF69824.1
Програнулин	<i>PGRN</i>	Играет роль в развитии, воспалении, пролиферации клеток и белковом гомеостазе	NP_002087.1

[110] В дополнение к пациентам с болезнью Гоше (у которых имеются мутации в обоих хромосомных аллелях гена *GBA1*), пациенты с мутациями только в одном аллеле *GBA1* имеют сильно повышенный риск болезни Паркинсона (PD). Тяжесть симптомов PD, которые включают затруднение походки, тремор в состоянии покоя, ригидность и частую депрессию, трудности со сном и снижение когнитивных функций, коррелирует со степенью снижения активности ферментов. Таким образом, пациенты с болезнью Гоше характеризуются наиболее тяжелым течением, тогда как пациенты с одной легкой мутацией в *GBA1*, как правило, характеризуются более мягким течением. Носители мутаций также имеют высокий риск других нарушений, связанных с PD, включая деменцию с тельцами Леви, характеризующуюся исполнительной дисфункцией, психозом и двигательным нарушением, подобным PD, и мультисистемную атрофию с характерными моторными и когнитивными

расстройствами. Не существует средств терапии, которые могли бы изменить неотвратимое течение этих нарушений.

[111] Было установлено, что случаи дефицита ферментов, таких как GСаза (*например*, продукт гена из гена *GBA1*), а также распространенные варианты многих генов, участвующих в функции лизосом или переносе макромолекул в лизосому (*например*, белок 1 лизосомальной мембраны (LIMP), также называемый SCARB2), ассоциированы с повышенным риском PD и/или риском болезни Гоше (*например*, нейронопатической болезни Гоше, такой как болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа). В основе настоящего изобретения частично лежат экспрессионные конструкции (*например*, векторы), кодирующие один или более генов, например, GСазу, GBA2, просапозин, програнулин (PGRN), LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2, TMEM106B или комбинацию любых из вышеприведенных (или их частей), ассоциированных с заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС), например, болезнью Гоше, PD и т. д. В некоторых вариантах осуществления комбинации продуктов генов, описанных в данном документе, действуют совместно (*например*, синергично), снижая проявление одного или более признаков и симптомов заболевания ЦНС при экспрессии у субъекта.

[112] Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую GСазу (*например*, продукт гена из гена *GBA1*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GСазу, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая GСазу, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14 (*например*, изложенную в виде эталонной последовательности в NCBI NP_000148.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV,

фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок GCазу.

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

[114] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую LIMP2/SCARB2 (*например*, продукт гена из гена *SCARB2*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SCARB2, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая LIMP2/SCARB2, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18 (*например*, изложенную в виде эталонной последовательности в NCBI NP_005497.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, ITR AAV,

фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SCARB2.

[115] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GBA2 (*например*, продукт гена из гена *GBA2*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GBA2, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая GBA2, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 30 (*например*, изложенную в виде эталонной последовательности в NCBI NP_065995.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок GBA2.

[116] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GALC (*например*, продукт гена из гена *GALC*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GALC, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая GALC, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 33 (*например*, изложенную в виде эталонной последовательности в NCBI NP_000144.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, ITR AAV,

фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок GALC.

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

[118] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок SMPD1 (*например*, продукт гена из гена *SMPD1*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SMPD1, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SMPD1, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 37 (*например*, изложенную в виде эталонной последовательности в NCBI NP_000534.3). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, ITR AAV,

фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок SMPD1.

[119] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GCH1 (*например*, продукт гена из гена *GCH1*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GCH1, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая GCH1, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 45 (*например*, изложенную в виде эталонной последовательности в NCBI NP_000534.3). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок GCH1.

[120] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок RAB7L (*например*, продукт гена из гена *RAB7L*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую RAB7L, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RAB7L, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 47 (*например*, изложенную в виде эталонной последовательности в NCBI NP_003920.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), *например*, ITR AAV,

фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок RAB7L.

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

[122] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок IL-34 (*например*, продукт гена из гена *IL34*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую IL-34, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-34, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 55 (*например*, изложенную в виде эталонной последовательности в NCBI NP_689669.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые

повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок IL-34.

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

[124] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок TMEM106B (*например*, продукт гена из гена *TMEM106B*). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TMEM106B, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TMEM106B, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 63 (*например*, изложенную в виде эталонной последовательности в NCBI NP_060844.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV,

фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок TMEM106B.

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

[126] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую первый продукт гена и второй продукт гена, где каждый продукт гена независимо выбран из продуктов генов или их частей, изложенных в таблице 1.

[127] В некоторых вариантах осуществления первый продукт гена или второй продукт гена представляют собой белок GCазу или его часть. В некоторых вариантах осуществления первый продукт гена представляет собой белок GCазу, а второй продукт гена выбран из GBA2, просапозина, програнулина, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2 и TMEM106B.

[128] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция кодирует (*например*, отдельно или в дополнение к другому продукту гена) интерферирующую нуклеиновую кислоту (*например*, shRNA, miRNA, dsRNA и т. д.). В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота

ингибирует экспрессию α -синуклеина (α -синуклеин). В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, которая нацеливается на α -синуклеин, содержит последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 20—25. В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, которая нацеливается на α -синуклеин, связывается (*например*, гибридизируется) с последовательностью, изложенной под любым из SEQ ID NO: 20—25.

[129] В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию TMEM106B. В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, которая нацеливается на TMEM106B, содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 64 или 65. В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, которая нацеливается на TMEM106B, связывается (*например*, гибридизируется) с последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 64 или 65.

[130] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит один или более промоторов. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор гена бета-актина курицы (CBA), промотор CAG, промотор CD68 или промотор JeT. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор для РНК-полимеразы II (*например*, или промотор для РНК-полимеразы III (*например*, U6 и *т. п.*)).

[131] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления IRES располагается между первым продуктом гена и вторым продуктом гена.

[132] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид T2A.

[133] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления

последовательности ITR фланкируют первый продукт гена и второй продукт гена (*например*, размещены от 5'-конца к 3'-концу следующим образом: ITR-первый продукт гена-второй продукт гена-ITR). В некоторых вариантах осуществления в одной из последовательностей ITR выделенной нуклеиновой кислоты отсутствует функциональный сайт концевой разрешения (*trs*). Например, в некоторых вариантах осуществления один из ITR представляет собой Δ ITR.

[134] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к векторам на основе гAAV, содержащим ITR, имеющий модифицированную область «D» (*например*, последовательность D, которая модифицирована относительно ITR AAV2 дикого типа, SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления ITR, имеющий модифицированную область D, представляет собой 5'-ITR вектора на основе гAAV. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область «D» содержит последовательность «S», например, изложенную под SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления ITR, имеющий модифицированную область «D», представляет собой 3'-ITR вектора на основе гAAV. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область «D» содержит 3'-ITR, при этом область «D» размещена на 3'-конце ITR (*например*, на наружном или крайнем конце ITR относительно трансгенной вставки вектора). В некоторых вариантах осуществления модифицированная область «D» содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 26 или 27.

[135] В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота (*например*, вектор на основе гAAV) содержит область TRY. В некоторых вариантах осуществления область TRY содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28.

[136] В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, описанная в настоящем изобретении, содержит пептид, или состоит из пептида, или кодирует пептид, имеющий последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 1-91.

[137] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой

плазмиду или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного AAV (rAAV) или бакуловирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV является односторонним (например, односторонней ДНК).

[138] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем изобретении, или вектор, описанный в настоящем изобретении.

[139] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий капсидный белок, и выделенная нуклеиновая кислота или вектор, описанные в настоящем изобретении.

[140] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок способен пересекать гематоэнцефалический барьер, например, капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAVrh.10. В некоторых вариантах осуществления rAAV трансдуцирует нейрональные клетки и отличные от нейрональных клетки центральной нервной системы (ЦНС).

[141] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание центральной нервной системы (ЦНС) или подозрение на его наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или rAAV), описанной в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой нейродегенеративное заболевание, такое как нейродегенеративное заболевание, указанное в таблице 12. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой синуклеинопатию, такую как синуклеинопатия, указанная в таблице 13. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой таупатию, такую как таупатия, указанная в таблице 14. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой лизосомную болезнь накопления, такую как лизосомная болезнь накопления, указанная в таблице 15. В некоторых вариантах осуществления

лизосомная болезнь накопления представляет собой нейронопатическую болезнь Гоше, такую как болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа.

[142] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется болезнь Паркинсона или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), описанной в настоящем изобретении.

[143] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция (FTD), FTD с мутацией *GRN*, FTD с мутацией *tau*-белка, FTD с мутацией *C9orf72*, цероидный липофусциноз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, кортикобазальная дегенерация, болезнь моторных нейронов или болезнь Гоше или подозрение на их наличие, при этом способ включает введение субъекту гAAV, кодирующего програнулин (PGRN), где PGRN кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68, и где гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

[144] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется FTD с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту гAAV, кодирующего програнулин (PGRN), где PGRN кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68, и где гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ геномов векторов (vg), приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят посредством инъекции в большую цистерну.

[145] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нуклеиновую кислоту (*например*, геном гAAV, *например*, инкапсидированный капсидными белками AAV), которая кодирует два или более продукта гена (*например*, продукты генов, ассоциированные с заболеванием ЦНС), *например*, 2, 3, 4, 5 или больше продуктов генов, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит две или более (*например*, 2, 3, 4, 5

или больше) разные нуклеиновые кислоты (*например*, два или более генома гAAV, *например*, по отдельности инкапсидированные капсидными белками AAV), каждая из которых кодирует один или более разных продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят две или более разные композиции, при этом каждая композиция содержит одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих разные продукты генов. В некоторых вариантах осуществления разные продукты генов функционально связаны с одним и тем же типом промотора (*например*, с одним и тем же промотором). В некоторых вариантах осуществления разные продукты генов функционально связаны с разными промоторами.

Выделенные нуклеиновые кислоты и векторы

[146] Выделенная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты (*например*, векторы на основе гAAV), содержащие экспрессионную конструкцию, кодирующую один или более генов, ассоциированных с PD, *например*, GСазу (*например*, продукт гена из гена *GBA1*) или ее часть. GСаза, также называемая β -глюкоцереброзидазой или GBA, относится к лизосомальному белку, который расщепляет бета-глюкозидную связь химического вещества глюкоцереброзида — промежуточного соединения в метаболизме гликолипидов. У людей GСаза кодируется геном *GBA1*, расположенным на хромосоме 1. В некоторых вариантах осуществления *GBA1* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_000148.2 (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GСазу, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека), такую как последовательность, изложенная под SEQ ID NO: 15.

[147] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую просапозин (*например*, продукт гена из гена *PSAP*). Просапозин представляет собой гликопротеин-предшественник для белков-активаторов сфинголипидов (сапозин) А, В, С и D, которые облегчают катаболизм гликосфинголипидов с короткими олигосахаридными группами. У людей ген *PSAP* расположен на хромосоме 10. В некоторых вариантах осуществления *PSAP* кодирует

пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_002769.1 (*например*, SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую просапозин, которая была кодон-оптимизирована (*например*, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, *например*, клетках человека), такую как последовательность, изложенная под SEQ ID NO: 17.

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

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

[150] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок GALC (*например*, продукт гена из гена *GALC*). Белок GALC относится к галактозилцерамидазе (или галактоцереброзидазе), которая представляет собой фермент, гидролизующий сложноэфирные связи галактозы в галактоцереброзиде,

галактозилсфингозине, лактозилцерамиде и моногалактозилдиглицериде. У людей ген *GALC* расположен на хромосоме 14. В некоторых вариантах осуществления ген *GALC* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_000144.2 (SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *GALC*, которая была кодон-оптимизирована.

[151] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок *CTSB* (например, продукт гена из гена *CTSB*). Белок *CTSB* относится к катепсину В, который представляет собой лизосомальную цистеиновую протеазу, которая играет важную роль во внутриклеточном протеолизе. У людей ген *CTSB* расположен на хромосоме 8. В некоторых вариантах осуществления ген *CTSB* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_001899.1 (SEQ ID NO: 35). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *CTSB*, которая была кодон-оптимизирована.

[152] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок *SMPD1* (например, продукт гена из гена *SMPD1*). Белок *SMPD1* относится к сфингомиелинфосфодиэстеразе 1, которая представляет собой фермент гидролазу, участвующий в метаболизме сфинголипидов. У людей ген *SMPD1* расположен на хромосоме 11. В некоторых вариантах осуществления ген *SMPD1* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_000534.3 (SEQ ID NO: 37). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую *SMPD1*, которая была кодон-оптимизирована.

[153] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок *GCH1*

(например, продукт гена из гена *GCH1*). Белок GCH1 относится к GTP-циклогидролазе I, которая представляет собой фермент гидролазу, являющийся частью путей биосинтеза фолата и биоптерина. У людей ген *GCH1* расположен на хромосоме 14. В некоторых вариантах осуществления ген *GCH1* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_000152.1 (SEQ ID NO: 45). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую GCH1, которая была кодон-оптимизирована.

[154] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок RAB7L (например, продукт гена из гена *RAB7L*). Белок RAB7L относится к белку 1, подобному представителю RAB7 семейства онкогенов RAS, который представляет собой GTP-связывающий белок. У людей ген *RAB7L* расположен на хромосоме 1. В некоторых вариантах осуществления ген *RAB7L* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_003920.1 (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую RAB7L, которая была кодон-оптимизирована.

[155] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок VPS35 (например, продукт гена из гена *VPS35*). Белок VPS35 относится к белку 35, ассоциированному с сортировкой вакуолярных белков, который является частью белкового комплекса, участвующего в ретроградном транспорте белков из эндосом в транс-сеть Гольджи. У людей ген *VPS35* расположен на хромосоме 16. В некоторых вариантах осуществления ген *VPS35* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_060676.2 (SEQ ID NO: 49). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую VPS35, которая была кодон-оптимизирована.

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

[157] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок TREM2 (*например*, продукт гена из гена *TREM2*). Белок TREM2 относится к триггерному рецептору 2, экспрессируемому на миелоидных клетках, который представляет собой рецептор из суперсемейства иммуноглобулинов, обнаруживаемый на миелоидных клетках. У людей ген *TREM2* расположен на хромосоме 6. В некоторых вариантах осуществления ген *TREM2* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_061838.1 (SEQ ID NO: 57). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TREM2, которая была кодон-оптимизирована.

[158] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую белок TMEM106B (*например*, продукт гена из гена *TMEM106B*). Белок TMEM106B относится к трансмембранному белку 106B, который представляет собой белок, участвующий в морфогенезе дендритов и регуляции лизосомального переноса. У людей ген *TMEM106B* расположен на хромосоме 7. В некоторых вариантах осуществления ген *TMEM106B* кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью в NCBI NP_060844.2 (SEQ ID NO: 62). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, изложенную под

SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TMEM106B, которая была кодон-оптимизирована.

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

[160] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен автоматизированный иммуноанализ методом вестерн-блоттинга для количественного определения уровня белка *PGRN* в образце цереброспинальной жидкости (CSF). В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ представляет собой капиллярную платформу для автоматизированного иммуноанализа методом вестерн-блоттинга, где все стадии, такие как разделение белков, их иммунозондирование, промывание и выявление с помощью хемилюминесценции, происходят в капиллярном картридже. В некоторых вариантах осуществления образец CSF получен от человека или примата, отличного от человека. В некоторых аспектах иммуноанализ позволяет выявлять различия в уровнях белка *PGRN* в присутствии циркулирующего антитела. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ количественного определения уровня белка програнулина в образце CSF, при этом способ включает: (1) разбавление образца CSF (*например*, 4-кратное разбавление); (2) загрузку образца CSF; антитела к програнулину; вторичного антитела, которое позволяет выявлять антитело к програнулину, люминола и пероксида в лунки капиллярного картриджа; (3) загрузку капиллярного картриджа в прибор для автоматизированного

иммуноанализа методом вестерн-блоттинга; (4) применение прибора для автоматизированного иммуноанализа методом вестерн-блоттинга для расчета одного или более из интенсивности сигнала, площади пика, отношения сигнала к шуму и параметров нормализации относительно общего белка; а также (5) количественное определение уровня белка програнулина в образце CSF в виде площади пика иммунореактивности к антителу к програнулину. В некоторых вариантах осуществления образец CSF разбавляют в мастер-миксе, содержащем дитиотреитол (DTT) и буфер для образца. Мастер-микс может дополнительно содержать другие фирменные компоненты. В других аспектах антитело к програнулину позволяет выявлять програнулин человека. В некоторых вариантах осуществления уровень белка програнулина количественно определяют из рассчитанных параметров с применением программного обеспечения, которое управляет прибором для автоматизированного иммуноанализа методом вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления программное обеспечение представляет собой программное обеспечение Compass для Simple Western™ (ProteinSimple, Сан-Хосе, Калифорния).

[161] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ количественного определения уровня белка програнулина в образце цереброспинальной жидкости (CSF), при этом способ включает: (1) разбавление образца CSF (*например*, 4-кратное разбавление) в мастер-миксе, содержащем дитиотреитол (DTT) и буфер для образца; (2) загрузку разбавленного образца CSF, антитела к програнулину; вторичного антитела, которое позволяет выявлять антитело к програнулину, люминола и пероксида в лунки капиллярного картриджа; (3) загрузку капиллярного картриджа в прибор для автоматизированного иммуноанализа методом вестерн-блоттинга; (4) применение прибора для автоматизированного иммуноанализа методом вестерн-блоттинга для расчета интенсивности сигнала, площади пика и отношения сигнала к шуму; а также (5) количественное определение уровня белка програнулина в образце CSF в виде площади пика иммунореактивности к антителу к програнулину.

[162] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую первый продукт гена и второй продукт гена, где каждый продукт гена независимо выбран из продуктов генов или их частей, изложенных в таблице 1.

[163] В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор на основе гAAV), описанные в настоящем изобретении, содержат последовательность или состоят из последовательности, изложенной под любым из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор на основе гAAV), описанные в настоящем изобретении, содержат последовательность или состоят из последовательности, которая является комплементарной (например, комплементарной нитью) по отношению к последовательности, изложенной под любым из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор на основе гAAV), описанные в настоящем изобретении, содержат последовательность или состоят из последовательности, которая является обратно комплементарной по отношению к последовательности, изложенной под любым из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор на основе гAAV), описанные в настоящем изобретении, содержат часть последовательности или состоят из части последовательности, изложенной под любым из SEQ ID NO: 1-91. Часть может содержать по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% последовательности, изложенной под любым из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем изобретении, представляет собой смысловую нить нуклеиновой кислоты (например, нить 5'—3') или в контексте вирусных последовательностей плюс-нить (+). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем изобретении, представляет собой антисмысловую нить нуклеиновой кислоты (например, нить 5'—3') или в контексте вирусных последовательностей минус-нить (-).

[164] В некоторых вариантах осуществления продукт гена кодируется кодирующей частью (например, кДНК) гена, встречающегося в природе. В некоторых вариантах осуществления первый продукт гена представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый геном *GBA1*. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый другим геном, указанным в таблице 1, например, геном *SCARB2/LIMP2* и/или геном *PSAP*. Однако специалисту в данной области известно, что порядок экспрессии первого продукта

гена (*например*, GCазы) и второго продукта гена (*например*, LIMP2 и *т. д.*) обычно может быть обратным (*например*, LIMP2 представляет собой первый продукт гена, и GCаза представляет собой второй продукт гена). В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой фрагмент (*например*, часть) гена, указанного в таблице 1. Фрагмент белка может содержать приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или приблизительно 99% белка, кодируемого генами, перечисленными в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент белка содержит от 50% до 99,9% (*например*, любое значение от 50% до 99,9%) белка, кодируемого геном, указанным в таблице 1.

[165] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция является моноцистронной (*например*, экспрессионная конструкция кодирует один слитый белок, содержащий первый продукт гена и второй продукт гена). В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция является полицистронной (*например*, экспрессионная конструкция кодирует два отдельных продукта гена, *например*, два разных белка или фрагмента белка).

[166] Полицистронный вектор экспрессии может содержать один или более (*например*, 1, 2, 3, 4, 5 или больше) промоторов. Можно применять любой подходящий промотор, *например*, конститутивный промотор, индуцируемый промотор, эндогенный промотор, тканеспецифический промотор (*например*, ЦНС-специфический промотор) и *т. д.* В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор гена бета-актина курицы (промотор CBA), промотор CAG (*например*, как описано в Alexopoulou et al. (2008) *BMC Cell Biol.* 9:2; doi: 10.1186/1471-2121-9-2), промотор CD68 или промотор JeT (*например*, как описано в Tornøe et al. (2002) *Gene* 297(1-2):21-32). В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первый продукт гена, второй продукт гена или первый продукт гена и второй продукт гена. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии содержит одну или более дополнительных регуляторных последовательностей, включая без ограничения последовательности связывания факторов транскрипции, сайты сплайсинга интронов, сайты добавления поли(A), энхансерные

последовательности, сайты связывания репрессоров или любую комбинацию из вышеперечисленных.

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

[168] С точки зрения патологии нарушения, такие как болезни PD и Гоше, ассоциированы с накоплением белковых агрегатов, состоящих в основном из белка α -синуклеина (α -Syn). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, содержат ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая снижает или предотвращает экспрессию белка α -Syn. Последовательность, кодирующая ингибирующую нуклеиновую кислоту, может быть расположена в нетранслируемой области (например, интроне, 5'-UTR, 3'-UTR и т. п.) вектора экспрессии.

[169] В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота размещена в интроне экспрессионной конструкции, например, в интроне выше последовательности, кодирующей первый продукт гена. Ингибирующая нуклеиновая кислота может представлять собой двухнитевую РНК (dsRNA), siRNA, shRNA, микроРНК (miRNA), искусственную miRNA (amiRNA) или РНК-аптамер. Обычно ингибирующая нуклеиновая кислота связывается (например, гибридизируется) со смежными нуклеотидами РНК-мишени (например, мРНК) в количестве от приблизительно 6 до приблизительно 30 (например, любым целым числом от 6 до 30 включительно). В некоторых вариантах осуществления

ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой miRNA или amiRNA, например, miRNA, которая нацеливается на *SNCA* (ген, кодирующий белок α -Syn) или *TMEM106B* (например, ген, кодирующий белок TMEM106B). В некоторых вариантах осуществления miRNA не содержит каких-либо ошибочных спариваний с областью мРНК *SNCA*, с которой она гибридизируется (например, miRNA является «усовершенствованной»). В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой shRNA (например, shRNA, нацеливающуюся на *SNCA* или *TMEM106B*). В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой искусственную miRNA (amiRNA), которая содержит каркас miR-155 и последовательность, нацеливающуюся на *SNCA* или *TMEM106B*.

[170] Специалисту в данной области понятно, что когда речь идет о последовательностях нуклеиновых кислот, содержащих или кодирующих ингибирующие нуклеиновые кислоты (например, dsRNA, siRNA, miRNA, amiRNA и т. п.), любой один или более из тимидиновых (Т) нуклеотидов или уридиновых (U) нуклеотидов в последовательности, предусмотренной в данном документе, может быть заменен любым другим нуклеотидом, подходящим для спаривания оснований (например, посредством образования уотсон-криковской пары оснований) с аденозиновым нуклеотидом. Например, Т можно заменить на U, и U можно заменить на Т.

[171] Выделенная нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, может существовать сама по себе или как часть вектора. Обычно вектор может представлять собой плазмиду, космиду, фагмиду, искусственную бактериальную хромосому (BAC) или вирусный вектор (например, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор, бакуловирусный вектор и т. п.). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду (например, плазмиду, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе). В некоторых вариантах осуществления вектор на основе rAAV является одонитевым (например, одонитевой ДНК). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного AAV (rAAV). В некоторых вариантах осуществления вектор

представляет собой бакуловиральный вектор (*например*, вектор на основе вируса ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV)).

[172] Как правило, вектор на основе гAAV (*например*, геном гAAV) содержит трансген (*например*, экспрессионную конструкцию, содержащую один или более из каждого из следующих: промотора, интрона, энхансерной последовательности, последовательности, кодирующей белок, последовательности, кодирующей ингибирующую РНК, последовательности поли(А)-хвоста и т. п.), фланкированный двумя последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления трансген вектора на основе гAAV содержит выделенную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления каждая из двух последовательностей ITR вектора на основе гAAV представляет собой полноразмерный ITR (*например*, длиной примерно 145 п. о. и содержащий функциональный сайт связывания *Rep* (RBS) и сайт концевой разрешения (*trs*)). В некоторых вариантах осуществления один из ITR вектора на основе гAAV является усеченным (*например*, укороченным или неполноразмерным). В некоторых вариантах осуществления в усеченном ITR отсутствует функциональный сайт концевой разрешения (*trs*), и он применяется для получения векторов на основе самокомплементарного AAV (векторов на основе scAAV). В некоторых вариантах осуществления усеченный ITR представляет собой Δ ITR, *например*, как описано в McCarty et al. (2003) *Gene Ther.* 10(26):2112-8. В некоторых вариантах осуществления каждая из двух последовательностей ITR представляет собой последовательность ITR AAV2.

[173] Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенным нуклеиновым кислотам (*например*, векторам на основе гAAV), содержащим ITR, имеющий одну или более модификаций (*например*, добавления, делеции, замены нуклеиновых кислот и т. п.) по сравнению с ITR AAV дикого типа, *например*, по сравнению с ITR AAV2 дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 29). Структура ITR AAV2 дикого типа показана на фиг. 20. Обычно ITR дикого типа содержит область из 125 нуклеотидов, которая самоотжигается с образованием палиндромной двухнитевой Т-образной шпильчатой структуры, состоящей из двух поперечных ветвей (образованных последовательностями, называемыми В/В' и С/С' соответственно), более длинной стеблевой области (образованной последовательностями А/А') и одностеблевой

концевой области, называемой областью «D» (фиг. 20). Обычно область «D» ITR расположена между стеблевой областью, образованной последовательностями A/A', и вставкой, содержащей трансген вектора на основе гAAV (например, размещена «внутри» от ITR относительно конца ITR или проксимально по отношению к трансгенной вставке или экспрессионной конструкции вектора на основе гAAV). В некоторых вариантах осуществления область «D» содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27. Было обнаружено, что область «D» играет важную роль в инкапсидировании векторов на основе гAAV капсидными белками, например, как раскрыто в Ling et al. (2015) *J Mol Genet Med* 9(3).

[174] В основе настоящего изобретения частично лежит неожиданное обнаружение того, что векторы на основе гAAV, содержащие область «D», расположенную «снаружи» от ITR (*например*, проксимально по отношению к концу ITR относительно трансгенной вставки или экспрессионной конструкции), эффективно инкапсидируются капсидными белками AAV по сравнению с векторами на основе гAAV, имеющими ITR с немодифицированными (*например*, характерными для дикого типа) ITR. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе гAAV, имеющие модифицированную последовательность «D» (*например*, последовательность «D» в положении «снаружи»), характеризуются сниженной токсичностью по сравнению с векторами на основе гAAV, имеющими последовательности ITR дикого типа.

[175] В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность «D» содержит по меньшей мере одну нуклеотидную замену по сравнению с последовательностью «D» дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 27). Модифицированная последовательность «D» может иметь по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 нуклеотидных замен по сравнению с последовательностью «D» дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность «D» содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 замен нуклеиновых кислот по сравнению с последовательностью «D» дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность «D» характеризуется идентичностью, составляющей от приблизительно 10% до приблизительно 99% (*например*, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%,

60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%), с последовательностью «D» дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления модифицированная последовательность «D» содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 26, также называемую последовательностью «S», как описано в Wang et al. (1995) *J Mol Biol* 250(5):573-80.

[176] Выделенная нуклеиновая кислота или вектор на основе rAAV, как описано в настоящем изобретении, может дополнительно содержать последовательность «TRY», *например*, изложенную под SEQ ID NO: 28 или описанную в Francois et al., (2005) *J. Virol.* 79(17):11082-11094. В некоторых вариантах осуществления последовательность TRY размещена между ITR (*например*, 5'-ITR) и экспрессионной конструкцией (*например*, вставкой, кодирующей трансген) выделенной нуклеиновой кислоты или вектора на основе rAAV.

[177] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к бакуловирусным векторам, содержащим выделенную нуклеиновую кислоту или вектор на основе rAAV, описанные в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления бакуловирусный вектор представляет собой вектор на основе вируса ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcNPV), *например*, как описано в Urabe et al. (2002) *Hum Gene Ther* 13(16):1935—43 и Smith et al. (2009) *Mol Ther* 17(11):1888-1896.

[178] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, описанные в данном документе. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. *Например*, клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего, бактериальную клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомого и *т. п.* В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, *например*, клетку HEK293T. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, *например*, клетку *E. coli*.

rAAV

[179] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к рекомбинантным AAV (rAAV), содержащим трансген, который кодирует

нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе (*например*, вектор на основе гAAV, описанный в данном документе). Термин «гAAV» обычно относится к вирусным частицам, содержащим вектор на основе гAAV, инкапсидированный одним или более капсидными белками AAV. гAAV, описанный в настоящем изобретении, может содержать капсидный белок, имеющий серотип, выбранный из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAV10. В некоторых вариантах осуществления гAAV содержит капсидный белок из организма-хозяина, отличного от человека, *например*, капсидный белок AAV из макака-резуса, такой как AAVrh.10, AAVrh.39 и т. д. В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанный в настоящем изобретении, содержит капсидный белок, который представляет собой вариант капсидного белка дикого типа, такой как вариант капсидного белка, который содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 (*например*, 15, 20, 25, 50, 100 и т. д.) аминокислотных замен (*например*, мутаций) по сравнению с капсидным белком AAV дикого типа, из которого он получен. В некоторых вариантах осуществления вариант капсидного белка AAV представляет собой капсидный белок AAV1RX, *например*, как описано в Albright et al. *Mol Ther.* 2018 Feb 7; 26(2):510-523. В некоторых вариантах осуществления вариант капсидного белка представляет собой капсидный белок TM6 AAV, *например*, как описано в Rosario et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016; 3: 16026.

[180] В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в настоящем изобретении, легко распространяются по ЦНС, в частности при введении в пространство CSF или непосредственно в паренхиму головного мозга. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в настоящем изобретении, содержат капсидный белок, который способен пересекать гематоэнцефалический барьер (BBB). *Например*, в некоторых вариантах осуществления гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9 или AAVrh.10. Получение гAAV описано, *например*, в Samulski et al. (1989) *J Virol.* 63(9):3822-8 и Wright (2009) *Hum Gene Ther.* 20(7): 698—706. В некоторых вариантах осуществления гAAV содержит капсидный белок, который специфично или преимущественно нацеливается на миелоидные клетки, *например*, клетки микроглии.

[181] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен гAAV, называемый «PR006A». PR006A представляет собой гAAV,

который доставляет функциональный ген *GRN* человека, что приводит к повышенной экспрессии функционального PGRN человека. Вставка вектора PR006A содержит промоторный элемент гена β -актина курицы (CBA), содержащий 4 части: энхансер цитомегаловируса (CMV), промотор CBA, экзон 1 и интрон (int) для конститутивной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности *GRN* человека (SEQ ID NO: 68). 3'-Область также содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE), за которым расположен сигнал для присоединения полиаденилового хвоста бычьего гормона роста. Три хорошо описанных регуляторных сайта активации транскрипции

[182] включены в 5'-конец промоторной области: TATA, RBS и YY1 (см., например, Francois et al., (2005) *J. Virol.* 79(17):11082–11094). Фланкирующие инвертированные концевые повторы (ITR) обеспечивают правильную упаковку вставочных последовательностей. Остов содержит ген, придающий устойчивость к канамицину, а также спейсерную последовательность для предотвращения обратного упаковывания. Схематическое изображение вектора на основе гAAV показано на фиг. 64. Под SEQ ID NO: 90 представлена нуклеотидная последовательность первой нити (в порядке от 5'- к 3'-концу) вектора PR006A, показанного на фиг. 64. Под SEQ ID NO: 91 представлена нуклеотидная последовательность второй нити (в порядке от 5'- к 3'-концу) вектора PR006A, показанного на фиг. 64. PR006A содержит капсидные белки AAV9.

[183] В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанный в настоящем изобретении (например, содержащий геном рекомбинантного гAAV, инкапсидированный капсидными белками AAV с образованием капсидосодержащей частицы гAAV), получают в системе экспрессии на основе бакуловирусного вектора (BEVS). Получение гAAV с применением BEVS описано, например, в Urabe et al. (2002) *Hum Gene Ther* 13(16):1935—43, Smith et al. (2009) *Mol Ther* 17(11):1888—1896, патенте США № 8945918, патенте США № 9879282 и международной публикации согласно PCT WO 2017/184879. Однако, гAAV можно получить с применением любого подходящего способа (например, с применением рекомбинантных генов *her* и *cap*). В некоторых вариантах осуществления гAAV, раскрытый в данном документе, продуцируется в клетках HEK293 (эмбриональной почки человека).

Фармацевтические композиции

[184] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие выделенную нуклеиновую кислоту или rAAV, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» относится к материалу, такому как носитель или разбавитель, который не нарушает биологическую активность или свойства соединения и является относительно нетоксичным, *например*, материал можно вводить индивидууму, не вызывая нежелательных биологических эффектов или вредного взаимодействия с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

[185] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемые материал, композицию или носитель, такие как жидкий или твердый наполнитель, стабилизатор, диспергирующее средство, суспендирующее средство, разбавитель, наполнитель, загуститель, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующие в переносе или транспортировке соединения, применимого в настоящем изобретении, в пределах организма или в организм пациента таким образом, что оно может выполнять свою предназначенную функцию. Дополнительные ингредиенты, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, применяемые при практическом осуществлении настоящего изобретения, известны из уровня техники и описаны, *например*, в Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA), который включен в данный документ посредством ссылки.

[186] Композиции (*например*, фармацевтические композиции), предусмотренные в данном документе, можно вводить любым путем, включая энтеральный (*например*, пероральный), парентеральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, подкожный, интравентрикулярный, трансдермальный, внутрикожный, ректальный, интравагинальный, внутрибрюшинный, местный (в виде порошков, мазей, кремов и/или капель), чресслизистый, назальный, трансбуккальный, сублингвальный; путем интратрахеальной инстилляцией, интрабронхиальной инстилляцией и/или ингаляцией; и/или в виде перорального спрея, назального спрея и/или аэрозоля. Конкретные предполагаемые пути представляют собой пероральное введение, внутривенное

введение (*например*, системную внутривенную инъекцию), регионарное введение с помощью крово- и/или лимфоснабжения и/или прямое введение в пораженный участок. В целом, наиболее подходящий способ введения будет зависеть от множества факторов, включая природу средства (*например*, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или состояние субъекта (*например*, то, способен ли субъект переносить пероральное введение). В определенных вариантах осуществления соединение или фармацевтическая композиция, описанные в данном документе, подходят для местного введения в глаз субъекта.

[187] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен готовый лекарственный продукт PR006A, содержащий вышеописанный гAAV PR006A, представленный в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления конечный буфер для составления содержит приблизительно 20 мМ Tris [pH 8,0], приблизительно 1 мМ MgCl₂, приблизительно 200 мМ NaCl и приблизительно 0,001% [вес/об.] полоксамера 188. В некоторых вариантах осуществления готовый лекарственный продукт и конечный буфер для составления подходят для инъекции в большую цистерну (ICM).

[188] В данном документе предусмотрена терапевтическая комбинация (A) гAAV, содержащего: (a) вектор на основе гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок PGRN, где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и (b) капсидный белок AAV9; и (B) сиролимуза для применения в способе лечения лобно-височной деменции с мутацией *GRN* у субъекта.

[189] В данном документе предусмотрена терапевтическая комбинация рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего: (i) вектор на основе гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68; и (ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более иммунодепрессантов для применения в способе лечения лобно-височной деменции с мутацией *GRN* у субъекта. В данном документе предусмотрена терапевтическая

комбинация рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего: (i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и (ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих: (A) сиролимуса; (B) метилпреднизолона; (C) ритуксимаба и (D) преднизона для применения в способе лечения лобно-височной деменции с мутацией *GRN* у субъекта.

[190] В данном документе предусмотрена терапевтическая комбинация рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего: (i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и (ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих: (A) сиролимуса; (B) метилпреднизолона; (C) ритуксимаба и (D) преднизона для применения в способе подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие.

[191] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая комбинация содержит от приблизительно 1×10^{13} vg до приблизительно 7×10^{14} vg rAAV. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая комбинация содержит приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg rAAV.

[192] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая комбинация содержит дополнительный иммунодепрессант, который не представляет собой сиролимус, метилпреднизолон, ритуксимаб или преднизон.

Способы

[193] Аспекты настоящего изобретения относятся к композициям для экспрессии одного или более продуктов генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта для лечения заболеваний, ассоциированных с ЦНС. Один или более

продуктов генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, могут кодироваться одной или более выделенными нуклеиновыми кислотами или векторами на основе гAAV. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят один вектор (*например*, выделенную нуклеиновую кислоту, гAAV и *т. д.*), кодирующий один или более (1, 2, 3, 4, 5 или более) продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят множество (*например*, 2, 3, 4, 5 или более) векторов (*например*, выделенных нуклеиновых кислот, гAAV и *т. д.*), где каждый вектор кодирует другой продукт гена, ассоциированный с заболеванием ЦНС.

[194] Заболевание, ассоциированное с ЦНС, может представлять собой нейродегенеративное заболевание, синуклеинопатию, таупатию или лизосомную болезнь накопления. Примеры нейродегенеративных заболеваний и генов, ассоциированных с ними, перечислены в таблице 12.

[195] «Синуклеинопатия» относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся накоплением альфа-синуклеина (продукта гена *SNCA*) у субъекта (*например*, по сравнению со здоровым субъектом, *например*, субъектом, у которого отсутствует синуклеинопатия). Примеры синуклеинопатий и генов, ассоциированных с ними, перечислены в таблице 13.

[196] «Таупатия» относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся накоплением аномального тау-белка у субъекта (*например*, по сравнению со здоровым субъектом, у которого отсутствует таупатия). Примеры таупатий и генов, ассоциированных с ними, перечислены в таблице 14.

[197] «Лизосомная болезнь накопления» относится к заболеванию, характеризующемуся аномальным накоплением токсичных клеточных продуктов в лизосомах субъекта. Примеры лизосомных болезней накопления и генов, ассоциированных с ними, перечислены в таблице 15.

[198] Используемые в данном документе термины «лечить» или «лечение» относятся к (a) предупреждению или задержке начала проявления заболевания ЦНС; (b) снижению тяжести заболевания ЦНС; (c) уменьшению или предупреждению развития симптомов, характерных для заболевания ЦНС; (d) и/или предупреждению усугубления симптомов, характерных для заболевания ЦНС. Симптомы заболевания ЦНС могут включать, *например*, моторную дисфункцию (*например*, тремор,

ригидность, замедленность движений, затруднения при ходьбе, паралич), когнитивную дисфункцию (*например*, деменцию, депрессию, тревожность, психоз), затруднения с памятью, эмоциональную и поведенческую дисфункцию.

[199] В основе настоящего изобретения частично лежат композиции для экспрессии комбинаций продуктов генов, ассоциированных с PD, у субъекта, которые действуют совместно (*например*, синергично) для лечения болезни Паркинсона.

[200] Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется болезнь Паркинсона или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), описанной в настоящем изобретении.

[201] В основе настоящего изобретения частично лежат композиции для экспрессии одного или более продуктов генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта для лечения болезни Гоше. В некоторых вариантах осуществления болезнь Гоше представляет собой нейронопатическую болезнь Гоше, например, болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, у которого имеется болезнь Гоше, отсутствуют PD или симптомы PD.

[202] Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется нейронопатическая болезнь Гоше или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), описанной в настоящем изобретении.

[203] В основе настоящего изобретения частично лежат композиции для экспрессии одного или более продуктов генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта для лечения болезни Альцгеймера или лобно-височной деменции (FTD). В некоторых вариантах осуществления у субъекта отсутствует болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется FTD и отсутствует болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется FTD с мутацией *GRN* (програнулина). В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется FTD с мутацией *GRN*, и субъект является гетерозиготным по мутации *GRN* (*например*, патогенной мутации *GRN*). В некоторых вариантах

осуществления мутация *GRN* представляет собой нулевую мутацию (*например*, нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания или мутации сайта сплайсинга или полную или частичную делецию (экзона) гена). В некоторых вариантах осуществления мутация *GRN* представляет собой патогенную мутацию с подтвержденным функциональным вредным эффектом. В некоторых вариантах осуществления мутация *GRN* представляет собой патогенную миссенс-мутацию. В некоторых вариантах осуществления мутация *GRN* указана в базе данных Molgen FTD (molgen.ua.ac.be). В некоторых вариантах осуществления мутация *GRN* приводит к низкому уровню PGRN в плазме крови (< 70 нг/мл) у субъекта.

[204] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется FTD, FTD с мутацией *GRN*, FTD с мутацией *tau*-белка, FTD с мутацией *C9orf72*, нейрональный цероидный липофусциноз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, кортикобазальная дегенерация, болезнь моторных нейронов или болезнь Гоше.

[205] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется симптоматическая FTD (*например*, поведенческий вариант FTD (bvFTD), FTD с первичной прогрессирующей афазией (PPA), FTD с кортикобазальным синдромом или комбинация синдромов).

[206] Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется FTD с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), описанной в настоящем изобретении.

[207] В некоторых вариантах осуществления субъекту, у которого имеется болезнь Альцгеймера или FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*), вводят гAAV, кодирующий програнулин (PGRN) или его часть. В некоторых вариантах осуществления субъекту, у которого имеется болезнь Альцгеймера или FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*), вводят гAAV, кодирующий PGRN или его часть, где белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления белок PGRN содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 67 или ее часть. В некоторых

вариантах осуществления гAAV, кодирующий PGRN, содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

[208] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую гAAV, кодирующий PGRN, для лечения FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*) вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 1×10^{12} геномов векторов (vg) до приблизительно 1×10^{15} vg, или от приблизительно 1×10^{13} vg до приблизительно 7×10^{14} vg, или от приблизительно 1×10^{13} vg до приблизительно 5×10^{14} vg, или от приблизительно 2×10^{13} vg до приблизительно 2×10^{14} vg, или от приблизительно 3×10^{13} vg до приблизительно 2×10^{14} vg, или от приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg до приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую гAAV, кодирующий PGRN, для лечения FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*) вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно 2×10^{13} vg, приблизительно 3×10^{13} vg, приблизительно 4×10^{13} vg, приблизительно 5×10^{13} vg, приблизительно 6×10^{13} vg, приблизительно 7×10^{13} vg, приблизительно 8×10^{13} vg, приблизительно 9×10^{13} vg, приблизительно 1×10^{14} vg или приблизительно 2×10^{14} vg.

[209] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*) или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий PGRN, где композицию вводят в дозе, составляющей приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ геномов векторов (vg), приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg.

[210] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется FTD (*например*, FTD с мутацией *GRN*) или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий PGRN, где композицию вводят в дозе, составляющей приблизительно 1×10^{14} геномов векторов (vg), приблизительно $2,0 \times 10^{14}$ vg или приблизительно $4,0 \times 10^{14}$ vg.

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

[212] В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую гAAV, доставляют путем однократной субокципитальной инъекции в большую цистерну. В некоторых вариантах осуществления инъекцию в большую цистерну осуществляют под рентгенографическим контролем.

[213] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения симптома субъекта, у которого имеется FTD с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий последовательность для функционального белка програнулина (PGRN), где белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления симптом FTD с мутацией *GRN* может представлять собой изменение личности, нарушение исполнительной функции, расторможенность, апатию, замедленное речеобразование, неграмотную речь, мультимодальную агнозию, семантическую афазию или нарушенное понимание слов. В некоторых вариантах осуществления гAAV, кодирующий PGRN, содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

[214] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения накопления липофусцина в головном мозге субъекта, у которого имеется FTD с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), где белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения накопления убиквитина в головном мозге субъекта, у которого имеется FTD с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), где белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения экспрессии гена и/или экспрессии белка TNF α и/или CD68 в головном мозге субъекта, у которого имеется FTD с мутацией *GRN* или

подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), где белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ увеличения созревания катепсина D в головном мозге субъекта, у которого имеется FTD с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), где белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ повышения уровня ядерного белка TDP-43 (ДНК-связывающего белка транс-активного ответа массой 43 кДа) в головном мозге субъекта, у которого имеется FTD с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), где белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения уровня легких цепей нейрофиламентов (NfL) в крови или CSF субъекта, у которого имеется FTD с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей гAAV, кодирующий програнулин (PGRN), где белок PGRN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления гAAV, кодирующий PGRN, содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

[215] Субъект обычно является млекопитающим, предпочтительно человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет возраст от 1 месяца до 10 лет (например, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 14 месяцев, 15 месяцев, 16 месяцев, 17 месяцев, 18 месяцев, 19 месяцев, 20 месяцев, 21 месяц, 22 месяца, 23 месяца, 24 месяца, 3 года, 4 года, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет или любой возраст в промежутке между этими значениями). В некоторых вариантах

осуществления возраст субъекта составляет от 2 лет до 20 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта составляет от 30 лет до 100 лет. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет возраст старше 55 лет.

[216] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят непосредственно в ЦНС субъекта, например, путем прямой инъекции в головной мозг и/или спинной мозг субъекта. Примеры способов прямого введения в ЦНС включают без ограничения интрацеребральную инъекцию, интравентрикулярную инъекцию, интрацистермальную инъекцию, интрапаренхиматозную инъекцию, интратекальную инъекцию и любую комбинацию из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту путем инъекции в большую цистерну (ICM). В некоторых вариантах осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта приводит к экспрессии трансгена (*например*, экспрессии первого продукта гена, второго продукта гена и, если применимо, третьего продукта гена) в среднем мозге, полосатом теле и/или коре головного мозга субъекта. В некоторых вариантах осуществления прямая инъекция в ЦНС приводит к экспрессии трансгена (*например*, экспрессии первого продукта гена, второго продукта гена и, если применимо, третьего продукта гена) в спинном мозге и/или CSF субъекта.

[217] В некоторых вариантах осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта включает конвекционную усовершенствованную доставку (CED). Конвекционная усовершенствованная доставка представляет собой терапевтическую стратегию, которая предусматривает выполнение хирургического доступа к головному мозгу и введение катетера малого диаметра непосредственно в целевую область мозга с последующей инфузией терапевтического средства (*например*, композиции или гAAV, описанных в данном документе) непосредственно в головной мозг субъекта. CED описана, например, в Debinski et al. (2009) *Expert Rev Neurother.* 9(10):1519—27.

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

[219] В некоторых вариантах осуществления композицию (*например*, композицию, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), описанную в настоящем изобретении, вводят как периферическим путем, так и непосредственно в ЦНС субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту путем внутриартериальной инъекции (*например*, инъекции в сонную артерию) и путем интрапаренхиматозной инъекции (*например*, интрапаренхиматозной инъекции посредством CED). В некоторых вариантах осуществления прямая инъекция в ЦНС и периферическая инъекция являются одновременными (*например*, происходят в одно и то же время). В некоторых вариантах осуществления прямую инъекцию осуществляют до (*например*, от 1 минуты до 1 недели или больше до) периферической инъекции. В некоторых вариантах осуществления прямую инъекцию осуществляют после (*например*, от 1 минуты до 1 недели или больше после) периферической инъекции.

[220] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят иммунодепрессант до (*например*, от 1 месяца до 1 минуты до) композиции, описанной в данном документе, или одновременно с ней. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант представляет собой кортикостероид (*например*, преднизон, будесонид и т. д.), ингибитор mTOR (*например*, сиролимус, эверолимус и т. д.), антитело (*например*, адалимумаб, этанерцепт, натализумаб и т. д.) или метотрексат.

[221] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят пероральную нагрузочную дозу сиролимуса, составляющую приблизительно 6 мг, в день -1 (окно от дня -3 до дня -1) (где день 0 представляет собой день введения гAAV). Например, дозу сиролимуса можно вводить в день -3, день -2 или день -1. В некоторых вариантах осуществления последующую поддерживающую дозу сиролимуса, составляющую 2 мг, вводят и при необходимости корректируют для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих приблизительно 4 нг/мл (диапазон от приблизительно 2 нг/мл до приблизительно 8 нг/мл), в течение месяца 3. В некоторых вариантах осуществления последующую поддерживающую дозу сиролимуса, составляющую 2 мг, вводят и при необходимости корректируют для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение месяца 3. В некоторых вариантах осуществления дозу сиролимуса постепенно снижают в течение

последующих от 15 дней до 30 дней (после окончания месяца 3). В некоторых вариантах осуществления до введения дозы сиролимуса собирают данные об остаточных уровнях.

[222] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят внутривенную нагрузочную дозу метилпреднизолона, составляющую приблизительно 1 г, в день 0 (окно от дня -1 до дня 0) с последующим введением приблизительно 30 мг преднизона перорально в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения гAAV. В некоторых вариантах осуществления дозу преднизона постепенно снижают в течение последующих 7 дней. В некоторых вариантах осуществления преднизон вводят перорально в дозе, составляющей 0,5 мг/кг ежедневно, в качестве сопутствующего лекарственного препарата с дня 1 в течение 14 дней, затем 0,25 мг/кг ежедневно в течение 4 дней с последующим медленным постепенным снижением дозы от 0,1 мг/кг до 0 мг/кг ежедневно в течение 4 дней. В некоторых вариантах осуществления введение метилпреднизолона и преднизона осуществляют в комбинации с вышеописанным введением сиролимуса. В некоторых вариантах осуществления могут применяться более высокие дозы или более длительное постепенное снижение дозы преднизона (*например*, в случаях повышенного уровня аланинаминотрансферазы (ALT)/аспартатаминотрансферазы (AST)).

[223] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту: (A) гAAV, содержащего: (i) вектор на основе гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5'-к 3'-концу: (a) ITR AAV2; (b) энхансер CMV; (c) промотор CBA; (d) трансгенную вставку, кодирующую белок PGRN, где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68; (e) WPRE; (f) сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста и (g) ITR AAV2, и (ii) капсидный белок AAV9; и (B) сиролимуса; где сиролимус вводят перорально в дозе, составляющей приблизительно 6 мг, в диапазоне от 1 дня до 3 дней до введения гAAV, и в дозе, составляющей приблизительно 2 мг, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 2 нг/мл до приблизительно 8 нг/мл, в течение приблизительно 3 месяцев после введения гAAV; и где вводимую дозу сиролимуса

постепенно снижают в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 3-месячного периода после введения гAAV.

[224] В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется FTD-GRN или подозрение на ее наличие, где (1) введение гAAV, доставляющего функциональную копию гена *GRN*, кодирующего PGRN дикого типа, осуществляют в комбинации с (2) применением схемы приема иммунодепрессантов. В некоторых вариантах осуществления схема приема иммунодепрессантов включает введение одного или более из следующих: сиролимуса; метилпреднизолона; антитела к CD20 и преднизона. В некоторых вариантах осуществления схема приема иммунодепрессантов включает введение всех из следующих: сиролимуса; метилпреднизолона; антитела к CD20 и преднизона. В некоторых вариантах осуществления схема приема иммунодепрессантов заключается в введении всех из следующих: сиролимуса; метилпреднизолона; антитела к CD20 и преднизона. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD20 представляет собой ритуксимаб.

[225] В некоторых вариантах осуществления схема приема иммунодепрессантов приводит к подавлению иммунных ответов у субъекта, связанных с AAV и/или экспрессией трансгенного белка. В некоторых вариантах осуществления схема приема иммунодепрессантов приводит к снижению иммунного ответа на капсид AAV9 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления схема приема иммунодепрессантов приводит к снижению воспалительного ответа в CSF у субъекта.

[226] В данном документе предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего: (i) вектор на основе гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и (ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих: (A) сиролимуса; (B) метилпреднизолона; (C) ритуксимаба и (D) преднизона.

[227] Также в данном документе предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего: (i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5'-к 3'-концу: (a) ITR аденоассоциированного вируса (AAV) 2; (b) энхансер цитомегаловируса (CMV); (c) промотор гена бета-актина курицы (CBA); (d) трансгенную вставку, кодирующую белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68; (e) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE); (f) сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста и (g) инвертированный концевой повтор (ITR) AAV2; и (ii) капсидный белок AAV9; и одного или более из следующих: (A) сиролимуса; (B) метилпреднизолона; (C) ритуксимаба и (D) преднизона.

[228] В данном документе дополнительно предусмотрен способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего: (i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и (ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих: (A) сиролимуса; (B) метилпреднизолона; (C) ритуксимаба и (D) преднизона.

[229] Также в данном документе предусмотрен способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего: (i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5'-к 3'-концу: (a) ITR аденоассоциированного вируса (AAV) 2; (b) энхансер цитомегаловируса (CMV); (c) промотор гена бета-актина курицы (CBA); (d) трансгенную вставку, кодирующую белок програнулин (PGRN), где трансгенная

вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68; (e) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE); (f) сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста и (g) инвертированный концевой повтор (ITR) AAV2; и (ii) капсидный белок AAV9; и одного или более из следующих: (A) сиролимуса; (B) метилпреднизолона; (C) ритуксимаба и (D) преднизона.

[230] В способах, раскрытых в данном документе, для подавления иммунного ответа у субъекта иммунодепрессию обеспечивают с помощью иммунодепрессантов (*например*, сиролимуса, метилпреднизолона, антитела к CD20 и преднизона), а не с помощью генной терапии (*например*, гAAV).

[231] В некоторых вариантах осуществления метилпреднизолон вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, за один день до введения гAAV. В некоторых вариантах осуществления метилпреднизолон вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, в тот же день, в который осуществляется и введение гAAV.

[232] В некоторых вариантах осуществления преднизон вводят перорально (A) в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения приблизительно 1000 мг метилпреднизолона; и (B) постепенно снижают его дозу в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из (A). В некоторых вариантах осуществления более длительное постепенное снижение дозы преднизона применяется в течение дополнительных 4 недель у субъекта, у которого проявляется уровень ALT и/или AST $> 3 \times$ верхняя граница нормы (ULN) в конце первоначального 14-дневного постепенного снижения дозы.

[233] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD20 (*например*, ритуксимаб) вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, в любой отдельный день между 14 днями до и 1 днем до введения гAAV.

[234] В некоторых вариантах осуществления метилпреднизолон вводят до введения антитела к CD20 (*например*, ритуксимаба). В некоторых вариантах осуществления метилпреднизолон вводят за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения антитела к CD20 (*например*, ритуксимаба). В некоторых вариантах осуществления как метилпреднизолон, так и антитело к CD20 (*например*,

ритуксимаб) вводят за день до введения гAAV; и метилпреднизолон вводят за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения антитела к CD20 (*например, ритуксимаба*). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD20 (*например, ритуксимаб*) вводят в любой отдельный день между 14 днями до и 2 днями до введения гAAV; и метилпреднизолон вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения антитела к CD20 (*например, ритуксимаба*) в тот же день, в который вводят антитело к CD20 (*например, ритуксимаб*).

[235] В некоторых вариантах осуществления сиролимус вводят перорально (А) в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV и (В) в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV; где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса. В некоторых вариантах осуществления вводимую дозу сиролимуса постепенно снижают в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода после введения гAAV.

[236] В данном документе предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг;

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение гAAV, раскрытого в данном документе, посредством инъекции в большую цистерну на следующий день после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iv) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (i), и

(v) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (iv);

(vi) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения rAAV на стадии (iii);

(vii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения rAAV на стадии (iii); где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(viii) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (vii).

[237] В данном документе предусмотрен способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг;

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение rAAV посредством инъекции в большую цистерну на следующий день после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iv) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (i), и

(v) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (iv);

(vi) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV на стадии (iii);

(vii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV на стадии (iii); где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(viii) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (vii).

[238] В данном документе предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, в любой отдельный день между 14 днями до и 2 днями до введения гAAV на стадии (iv);

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, за один день до введения гAAV на стадии (iv) либо в тот же день с ним;

(iv) введение гAAV, раскрытого в данном документе, посредством инъекции в большую цистерну;

(v) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (iii), и

(vi) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (v);

(vii) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV на стадии (iv);

(viii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV на стадии (iii); где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(ix) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (viii).

[239] В данном документе предусмотрен способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, в любой отдельный день между 14 днями до и 2 днями до введения гAAV на стадии (iv);

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, за один день до введения гAAV на стадии (iv) либо в тот же день с ним;

(iv) введение гAAV посредством инъекции в большую цистерну;

(v) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (iii), и

(vi) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (v);

(vii) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV на стадии (iv);

(viii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV на стадии (iii); где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(ix) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (viii).

[240] В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ субъекта представляет собой иммунный ответ на гAAV. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой Т-клеточный ответ. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой В-клеточный ответ. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой ответ с образованием антител. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой плеоцитоз. В некоторых вариантах осуществления плеоцитоз представляет собой плеоцитоз в цереброспинальной жидкости (CSF). В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой аномальный уровень белка CSF. В некоторых вариантах осуществления аномальный уровень белка CSF составляет более 70 мг/дл.

[241] В некоторых вариантах осуществления профилактическое IV лечение с помощью кортикостероидов (которое нацелено как на Т-клетки, так и на В-клетки) начинается за день до лечения с помощью гAAV, и пероральное лечение продолжается в течение 14 дней с последующим постепенным снижением дозы в течение 7 дней. Лечение с помощью сиролимуса, которое в первую очередь нацелено на Т-клетки, начинается за день до лечения с помощью гAAV и будет продолжаться в течение 90 дней с последующим постепенным снижением дозы. Ритуксимаб, который

в первую очередь нацелен на В-клетки, вводят однократной дозой, предпочтительно за день до лечения с помощью гAAV, и при этом ожидается, что его активность будет сохраняться в течение 6 месяцев.

[242] В некоторых вариантах осуществления субъект получает схему иммунодепрессии, заключающуюся в приеме кортикостероидов, ритуксимаба и сиролимуса. Субъект получает нагрузочную дозу метилпреднизолона, составляющую 1000 мг IV, в импульсном режиме в день -1 (разрешается в день -1 или день 0). Преднизон в дозе, составляющей 30 мг/день, дают перорально в качестве сопутствующего лекарственного препарата, начиная со следующего дня после IV введения в импульсном режиме 1000 мг метилпреднизолона (день 0 или день 1), в течение 14 дней, и затем его дозу постепенно снижают в течение следующих 7 дней. Субъект получает 1-кратную дозу, составляющую 1000 мг ритуксимаба IV, в любой отдельный день между днем -14 и днем -1. Чтобы снизить риск и тяжесть инфузионной реакции (IRR), связанной с ритуксимабом, субъект получает метилпреднизолон IV до получения ритуксимаба IV. Для введения дозы ритуксимаба в день -1 субъект получает инфузию ритуксимаба через по меньшей мере 30 минут после вышеописанного IV введения в импульсном режиме 1000 мг метилпреднизолона. Для введения дозы ритуксимаба между днем -14 и днем -2 субъект получает IV инфузию 100 мг метилпреднизолона за примерно 30 минут до получения ритуксимаба IV. Субъект получает пероральную нагрузочную дозу сиролимуса, составляющую 6 мг, в день -1 (окно от дня -3 до дня -1). Последующую пероральную поддерживающую дозу сиролимуса, составляющую 2 мг/день, предоставляют в качестве сопутствующего лекарственного препарата, начиная с дня 0 (или на следующий день после нагрузочной дозы сиролимуса, если нагрузочная доза сиролимуса вводится в день -3 или день -2), и корректируют по мере необходимости в течение 90 дней для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих 6 нг/мл (диапазон 4—9 нг/мл), в течение 90 дней. Затем дозу сиролимуса постепенно снижают в течение следующих 15—30 дней. Могут применять более высокие дозы или более длительное постепенное снижение дозы кортикостероидов и сиролимуса.

[243] В некоторых вариантах осуществления могут применять более длительное постепенное снижение дозы или возобновление иммунодепрессивного

лечения (*например*, в случаях повышенного уровня AST или ALT, воспалительных изменений в CSF или других предполагаемых реакций иммунной системы).

[244] В некоторых вариантах осуществления субъекту дополнительно вводят дополнительный иммунодепрессант, который не представляет собой сиролimus, метилпреднизолон, ритуксимаб или преднизон.

[245] В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в данном документе, может включать увеличение доз иммунодепрессивного средства, пролонгированную схему постепенного снижения доз, применение дополнительного средства или возобновление лечения, исходя из клинических признаков или симптомов, соответствующих иммунному ответу, например:

- бессимптомного плеоцитоза с количеством лейкоцитов (WBC) $> 30 \text{ мм}^3$ и/или высоким содержанием белка в цереброспинальной жидкости (CSF) ($> 70 \text{ мг/дл}$);
- плеоцитоза в CSF и/или повышенного содержания белка, сопровождающегося клиническими симптомами (включая декомпенсацию первопричинных симптомов FTD);
- появления сенсорных симптомов на основании неврологического обследования и/или шкалы оценки нейропатии, вызванной лечением (TNAS);
- повышения уровня аланинаминотрансферазы (ALT) и/или аспартатаминотрансферазы (AST) $> 5 \times$ верхняя граница нормы (ULN) в сочетании с симптомами гепатита (*например*, желтухой, утомляемостью);
- повышения уровня ALT и/или AST $> 10 \times$ ULN независимо от наличия или отсутствия клинической симптоматики.

[246] Количество вводимой субъекту композиции (*например*, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), описанной в настоящем изобретении, будет варьироваться в зависимости от способа введения. Например, в некоторых вариантах осуществления гAAV, описанный в данном документе, вводят субъекту в титре, составляющем от приблизительно 10^9 копий генома (GC)/кг до приблизительно 10^{14} GC/кг (*например*, приблизительно 10^9 GC/кг, приблизительно 10^{10} GC/кг, приблизительно 10^{11} GC/кг, приблизительно 10^{12} GC/кг, приблизительно 10^{12} GC/кг или приблизительно 10^{14} GC/кг). В некоторых вариантах

осуществления субъекту вводят высокий титр (*например*, $> 10^{12}$ копий генома GC/кг rAAV) путем инъекции в пространство CSF или путем интрапаренхиматозной инъекции. В некоторых вариантах осуществления rAAV, описанный в данном документе, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 1×10^{10} геномов векторов (vg) до приблизительно 1×10^{17} vg, путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления rAAV, описанный в данном документе, вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 1×10^{10} vg до приблизительно 1×10^{16} vg, путем инъекции в большую цистерну.

[247] Композицию (*например*, композицию, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или rAAV), описанную в настоящем изобретении, можно вводить субъекту один или несколько раз (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 или больше) раз. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту непрерывно (*например*, постоянно), например, посредством инфузионного насоса.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Векторы на основе rAAV

[248] Векторы на основе AAV создаются с применением клеток, таких как клетки HEK293, для трансфекции тремя плазмидами. Последовательности ITR фланкируют экспрессионную конструкцию, содержащую промоторный/энхансерный элемент, для каждого из представляющего интерес трансгена, 3'-поли(A)-сигнала и посттрансляционных сигналов, таких как элемент WPRE. Несколько продуктов генов могут экспрессироваться одновременно, такие как *GBA1* и *LIMP2* и/или просапозин, путем слияния белковых последовательностей, или путем применения пептидного линкера 2A, такого как T2A или P2A, который связывает 2 пептидных фрагмента с добавленными аминокислотами благодаря предотвращению образования пептидной связи, или путем применения элемента IRES, или экспрессии с 2 отдельными кассетами экспрессии. Наличие короткой интронной последовательности, которая эффективно подвергается сплайсингу выше экспрессируемого гена, может повысить уровень экспрессии shRNA, и при этом в эти последовательности потенциально могут быть включены другие регуляторные РНК. Примеры экспрессионных конструкций, описанных в настоящем изобретении, показаны на фиг. 1-8, 21-35, 39, 41-51 и 64 и в таблице 2 ниже.

Таблица 2

Название	Промотор 1	shRNA	CDS1	Поли(А) 1	Бицистрон- ный элемент	Промотор 2	CDS2	Поли(А) 2	Длина между ITR
CMVe_CBAP_GBA1_ WPRE_bGH	CBA		GBA1	WPRE-bGH					3741
LT1s_JetLong_mRNAiaSYn _SCARB2-T2A- GBA1_bGH	JetLong	aSyn	SCARB2	bGH	T2A		GBA1		4215
LI1_JetLong_SCARB2- IRES-GBA1_bGH	JetLong		SCARB2	bGH	IRES		GBA1		4399
FP1_JetLong_GBA1_bGH_ JetLong_SCARB2_SV40L	JetLong		GBA1	bGH		JetLong	SCARB2	SV40L	4464
ВекторPrevail_LT2s_ JetLong_mRNAiaSYn_PSA P-T2A- GBA1_bGH 4353 нт	JetLong	aSyn	PSAP	bGH	T2A	-	GBA1	-	4353
ВекторPrevail_LI2_JetLong _PSAP_IRES_GBA1_ синтетический поли(А) 4337 нт	JetLong	-	PSAP	Синтети- ческий рА	IRES	-	GBA1	-	4337
ВекторPrevail_10s_JetLong _mRNAiaSy_GBA2_WPRE _bGH 4308 нт	JetLong	aSyn	GBA2	WPRE_bGH	-	-	-	-	4308
ВекторPrevail_FT4_JetLong _GBA1_T2A_GALC_ синтетический поли(А) 4373 нт	JetLong	-	GBA1	Синтети- ческий рА	T2A	-	GALC	-	4373
ВекторPrevail_LT4_ JetLong_GALC_T2A_GBA	JetLong	-	GALC	Синтети- ческий рА	T2A	-	GBA1	-	4373

1_синтетический поли(А) 4373 нт									
ВекторPrevail_LT5s_ JetLong_mRNAiaSyn_CTS B-T2A- GBA1_WPRE_bGH_4392 нт	JetLong	aSyn	CTSB	WPRE_bGH	T2A	-	GBA1	-	4392
ВекторPrevail_FT11t_ JetLong_mRNAiaSyn_GBA 1_T2S_SMPD1_ синтетический поли(А) 4477 нт	JetLong	aSyn	GBA1	Синтети- ческий рА	T2A	-	SMPD1	-	4477
ВекторPrevail_LI4_JetLong _GALC_IRES_GBA1_ синтетический поли(А) 4820 нт	JetLong	-	GALC	Синтети- ческий рА	IRES	-	GBA1	-	4820
ВекторPrevail_FP5_JetLong _GBA1_bGH_JetLong_CTS B_SV40L 4108 нт	JetLong	-	GBA1	bGH	-	JetLong	CTSB	SV40L	4108
ВекторPrevail_FT6s_ JetLong_mRNAiaSyn_GBA 1-T2A- GCH1_WPRE_bGH_4125 нт	JetLong	aSyn	GBA1	WPRE_bGH	T2A	-	GCH1	-	4125
ВекторPrevail_LT7s_ JetLong_mRNAiaSyn_RAB 7L1-T2A- GBA1_WPRE_bGH_3984 нт	JetLong	aSyn	RAB7L1	WPRE_bGH	T2A	-	GBA1	-	3984
ВекторPrevail_FI6s_ JetLong_mRNAiaSYn_GBA	JetLong	aSyn	GBA1	bGH	IRES	-	GCH1	-	3978

1-IRES-GCH1_bGH_3978 HT									
BektopPrevail_9st_JetLong_mRNAiaSyn_mRNAiTME M106B_VPS35_WPRE_bGH_4182 HT	JetLong	aSyn и TME M106B	VPS35	WPRE_bGH	-	-	-	-	4182
BektopPrevail_FT12s_JetLong_mRNAiaSyn_GBA1-T2A-IL34_WPRE_bGH_4104 HT	JetLong	aSyn	GBA1	WPRE_bGH	T2A	-	IL34	-	4104
BektopPrevail_FI12s_JetLong_mRNAiaSYn_GBA1-IRES-IL34_bGH_3957 HT	JetLong	aSyn	GBA1	bGH	IRES	-	IL34	-	3957
BektopPrevail_FP8_JetLong_GBA1_bGH_CD68_TREM2_SV40L_4253 HT	JetLong	-	GBA1	bGH	-	CD68	TREM2	SV40L	4253
BektopPrevail_FP12_CMVe_CBA_GBA1_bGH_JetLong_IL34_SV40L_4503 HT	CBA		GBA1	bGH		JetLong	IL34	SV40L	4503

Пример 2. Клеточные анализы трансдукции вируса в клетки с дефицитом GBA

[249] Клетки с дефицитом *GBA1* получают, например, в виде фибробластов от пациентов с GD, моноцитов или клеток hES или полученных от пациентов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). Эти клетки накапливают субстраты, такие как глюкозилцерамид и глюкозилсфингозин (GlcCer and GlcSph). Обработку культивируемых линий клеток дикого типа или мутантных клеток с помощью ингибиторов GСазы, таких как CBE, также можно применять для получения клеток с дефицитом GBA.

[250] С применением таких клеточных моделей лизосомальные дефекты количественно оценивают с точки зрения накопления белковых агрегатов, таких как α -синуклеин, с антителом к этому белку или фосфо- α Syn с последующей визуализацией с применением флуоресцентной микроскопии. Также осуществляется визуализация лизосомальных аномалий с помощью ICC для белковых маркеров, таких как LAMP1, LAMP2, LIMP1, LIMP2, или с применением красителей, таких как LysoTracker, или путем поглощения посредством эндоцитозного компартмента флуоресцентного декстрана или других маркеров. Также можно осуществлять визуализацию накопления маркера аутофагии вследствие дефектного слияния с лизосомой, например для LC3. Вестерн-блоттинг и/или ELISA применяют для количественной оценки аномального накопления этих маркеров. Также с применением стандартных подходов измеряют накопление гликолипидных субстратов и продуктов GBA1.

[251] Конечные точки терапии (*например*, снижение патологии, связанной с PD) измеряют в контексте экспрессии трансдукции векторов на основе AAV для подтверждения и количественной оценки активности и функции. GСазу также можно количественно определять с применением показателей для белков, определенных посредством ELISA, или стандартных анализов активности GСазы.

Пример 3. Анализы *in vivo* с применением мутантных мышей

[252] В данном примере описаны анализы *in vivo* векторов на основе AAV с применением мутантных мышей. Исследования *in vivo* векторов на основе AAV, как указано выше, у мутантных мышей проводят с применением анализов, описанных,

например, в Liou *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281(7): 4242—4253, Sun *et al.* (2005) *J. Lipid Res.* 46:2102—2113 и Farfel-Becker *et al.* (2011) *Dis. Model Mech.* 4(6):746—752.

[253] Инtrateкальную или интравентрикулярную доставку контрольной среды-носителя и векторов на основе AAV (*например*, в дозе, составляющей 2×10^{11} vg/мышь) осуществляют с применением концентрированных исходных растворов AAV, например, при объеме инъекции, составляющем 5—10 мкл. Осуществляют интрапаренхиматозную доставку посредством конвекционной усовершенствованной доставки.

[254] Обработку начинают либо до появления симптомов, либо после их появления. Измеряемыми конечными точками являются накопление субстрата в ЦНС и CSF, накопление фермента GCазы согласно ELISA и активности фермента, моторные и когнитивные конечные точки, лизосомальная дисфункция и накопление мономеров, протофибрилл или фибрилл α -синуклеина.

Пример 4. Химические модели заболевания

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

[256] Инtrateкальную или интравентрикулярную доставку контрольной среды-носителя и векторов на основе AAV (*например*, в дозе, составляющей 2×10^{11} vg/мышь) осуществляют с применением концентрированных исходных растворов AAV, например, с помощью инъекции объемом 5—10 мкл. Осуществляют интрапаренхиматозную доставку посредством конвекционной усовершенствованной доставки. Периферическую доставку осуществляют путем инъекции в хвостовую вену.

[257] Обработку начинают либо до появления симптомов, либо после их появления. Измеряемыми конечными точками являются накопление субстрата в ЦНС и CSF, накопление фермента GCазы согласно ELISA и активности фермента, моторные и когнитивные конечные точки, лизосомальная дисфункция и накопление мономеров, протофибрилл или фибрилл α -синуклеина.

Пример 5. Клинические испытания у пациентов с PD, LBD и болезнью Гоше

[258] В некоторых вариантах осуществления пациенты, имеющие определенные формы болезни Гоше (*например*, GD1), характеризуются повышенным риском развития болезни Паркинсона (PD) или деменции телец Леви (LBD). В данном примере описаны клинические испытания для оценки безопасности и эффективности гAAV, описанного в настоящем изобретении, у пациентов, страдающих болезнью Гоше, PD и/или LBD.

[259] Клинические испытания таких векторов для лечения болезни Гоше, PD и/или LBD осуществляют с применением плана исследования, аналогичного описанному в Grabowski et al. (1995) *Ann. Intern. Med.* 122(1):33—39.

Пример 6. Лечение периферического заболевания

[260] В некоторых вариантах осуществления у пациентов, имеющих определенные формы болезни Гоше, проявляются симптомы периферической нейропатии, *например*, описанные в Biegstraaten et al. (2010) *Brain* 133(10):2909—2919.

[261] В данном примере описаны анализы *in vivo* векторов на основе AAV, описанных в данном документе, для лечения периферической нейропатии, связанной с болезнью Гоше (*например*, болезнью Гоше 1 типа). Вкратце, пациентам с болезнью Гоше 1 типа, у которых идентифицированы признаки или симптомы периферической нейропатии, вводят гAAV, описанный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления отслеживание периферических нейропатических признаков и симптомов у субъекта осуществляют, *например*, с применением способов, описанных в Biegstraaten et al., после введения гAAV.

[262] Уровни трансдуцированных продуктов генов, описанных в настоящем изобретении, присутствующих у пациентов (*например*, в сыворотке крови пациента, в периферических тканях (*например*, ткани печени, ткани селезенки и *т. п.*)), анализируют, *например*, посредством вестерн-блоттинга, ферментных функциональных анализов или визуализирующих исследований.

Пример 7. Лечение ЦНС-форм заболеваний

[263] В данном примере описаны *in vivo* анализы rAAV, описанных в данном документе, для лечения ЦНС-форм болезни Гоше. Вкратце, пациентам с болезнью Гоше, идентифицированным как имеющие ЦНС-форму болезни Гоше (*например*, болезнь Гоше 2 типа или 3 типа), вводят rAAV, описанный в настоящем изобретении. Уровни трансдуцированных продуктов генов, описанных в настоящем изобретении, присутствующих в ЦНС пациентов (*например*, в сыворотке крови ЦНС пациента, в цереброспинальной жидкости (CSF) пациента или в ткани ЦНС пациента), анализируют, *например*, посредством вестерн-блоттинга, ферментных функциональных анализов или визуализирующих исследований.

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

[264] В данном примере описано введение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), кодирующего *GBA1*, субъекту, у которого имеется болезнь Паркинсона, характеризующаяся мутацией в гене *GBA1*.

[265] Вставка вектора на основе rAAV-GBA1 содержит промоторный элемент СВА (СВА), состоящий из четырех частей: энхансера CMV (CMVe), промотора СВА (СВА_p), экзона 1 и интрона (int) для конститутивной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности (CDS) *GBA1* человека (бордовый). 3'-Область также содержит посттранскрипционный регуляторный элемент в виде посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита лесных сурков (WPRE), за которым расположен сигнал для присоединения поли(А)-хвоста бычьего гормона роста (поли(А) bGH). Фланкирующие ITR обеспечивают правильную упаковку вставочных последовательностей. Оценивали два варианта последовательности 5'-ITR (фиг. 7, блок-вставка, нижняя последовательность); эти варианты имеют несколько нуклеотидных различий в пределах 20-нуклеотидной области «D» ITR, что предположительно влияет на эффективность упаковывания и экспрессии. Векторный продукт на основе rAAV-GBA1 содержит нуклеотидную последовательность домена «D», показанную на фиг. 7 (блок-вставка, верхняя последовательность). Анализ варианта вектора, несущего мутантный домен «D» (называемый в данном документе доменом «S» с изменениями нуклеотидов,

показанными с помощью затушевывания), осуществляли аналогичным образом в доклинических исследованиях. Остов содержит ген, придающий устойчивость к канамицину, а также спейсерную последовательность для предотвращения обратного упаковывания. Схематическое изображение вектора на основе rAAV-GBA1 показано на фиг. 8. Вектор на основе rAAV-GBA1 упаковывается в rAAV с применением капсидных белков серотипа AAV9.

[266] rAAV-GBA1 вводят субъекту в виде однократной дозы посредством субокципитальной инъекции под контролем флюороскопии в большую цистерну (внутри большой цистерны; ICM). Один вариант исследования схемы введения доз rAAV-GBA1 выглядит следующим образом.

[267] Однократную дозу rAAV-GBA1 вводят пациентам (N = 12) при одном из двух уровней доз (3×10^{13} vg (низкая доза); 1×10^{14} vg (высокая доза) и *т. д.*), которые определяются на основе результатов неклинических фармакологических и токсикологических исследований.

[268] Первоначальные исследования проводили на химической мышинной модели с ежедневным введением кондуритол-бета-эпоксида (CBE), ингибитора GСазы, для оценки эффективности и безопасности вектора rAAV-GBA1 и S-вариантной конструкции rAAV-GBA1 (как дополнительно описано ниже). Кроме того, первоначальные исследования проводились на генетической мышинной модели, которая несет гомозиготную мутацию *GBA1* и характеризуется частичным дефицитом сапозина (4L/PS-NA). Дополнительные исследования для определения диапазона доз у мышей и приматов, отличных от человека (NHP), проводят для дальнейшей оценки безопасности и эффективности вектора.

[269] Две слегка отличающиеся версии 5'-инвертированного концевой повтора (ITR) в остове AAV тестировали для оценки возможности получения и экспрессии трансгена (фиг. 7). Домен «D» размером 20 п. о. в пределах 5'-ITR размером 145 п. о. считается необходимым для оптимального продуцирования вирусного вектора, но также сообщалось, что мутации в пределах домена «D» в некоторых случаях повышают экспрессию трансгена. Таким образом, в дополнение к вирусному вектору rAAV-GBA1, который несет интактный домен «D», также оценивали вторую форму вектора с мутантным доменом D (называемым в данном

документе доменом «S»). Как rAAV-GBA1, так и вариант экспрессируют один и тот же трансген. Хотя оба вектора продуцировали вирус, который был эффективным *in vivo*, как подробно описано ниже, для дополнительной разработки был выбран rAAV-GBA1, который содержит домен «D» дикого типа.

[270] Чтобы создать модель CBE с дефицитом GСазы, неполовозрелым мышам вводили дозу CBE, представляющего собой специфический ингибитор GСазы. Мышам вводили IP инъекцию CBE ежедневно, начиная с дня 8 после рождения (P8). Были протестированы три различные дозы CBE (25 мг/кг, 37,5 мг/кг, 50 мг/кг) и PBS для создания модели, которая демонстрирует поведенческий фенотип (фиг. 9). Более высокие дозы CBE приводили к летальному исходу дозозависимым образом. Все мыши, обработанные с помощью 50 мг/кг CBE, умерли в P23, и 5 из 8 мышей, обработанные с помощью 37,5 мг/кг CBE, умерли в P27. У мышей, обработанных с помощью 25 мг/кг CBE, летальность не наблюдалась. Хотя у мышей, которым вводили инъекции CBE, не наблюдались общие моторные расстройства при анализе с использованием теста «открытое поле» (прохождение такого же расстояния и с такой же скоростью, как и у мышей, которым давали PBS), у мышей, обработанных с помощью CBE, наблюдалось расстройство моторной координации и равновесия, что измерялось посредством анализа с использованием теста с вращающимся стержнем.

[271] Мышей, выживших к концу исследования, умерщвляли на следующий день после их последней дозы CBE (P27, «день 1») или через три дня после отмены CBE (P29, «день 3»). Анализ липидов проводили на коре головного мозга мышей, которым вводили 25 мг/кг CBE, для оценки накопления субстратов GСазы в когортах как в день 1, так и в день 3. Уровни GluSph и GalSph (измеренные в совокупности в данном примере) значительно накапливались у мышей, обработанных с помощью CBE, по сравнению с контрольными животными, обработанными с помощью PBS, что согласуется с недостаточностью GСазы.

[272] На основании вышеописанного исследования была выбрана доза CBE, составляющая 25 мг/кг, поскольку она вызывала расстройства поведения, не влияя на выживаемость. Для достижения обширного распределения GBA1 во всем головном мозге и трансгенной экспрессии на протяжении обработки с помощью CBE rAAV-GBA1 или вспомогательное вещество доставляли путем

интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции в день 3 после рождения (P3), затем ежедневную обработку IP с помощью CBE или PBS начинали в P8 (фиг. 10).

[273] Мыши, обработанные с помощью CBE, которые получали rAAV-GBA1, демонстрировали статистически значимо лучшие результаты в тесте с вращающимся стержнем по сравнению с мышами, которые получали вспомогательное вещество (фиг. 11). Мыши в группе обработки с помощью варианта не отличались от мышей, обработанных вспомогательным веществом, в отношении других поведенческих показателей, таких как общее расстояние, пройденное на протяжении тестирования (фиг. 11).

[274] По завершении прижизненного исследования половину мышей умерщвляли на следующий день после их последней дозы CBE (P36, «день 1») или через три дня после отмены CBE (P38, «день 3») для биохимического анализа (фиг. 12). С применением флуорометрического ферментного анализа, выполняемого в трех биологических повторностях, оценивали активность GСазы в коре головного мозга. Активность GСазы повышалась у мышей, которых обрабатывали с помощью rAAV-GBA1, в то время как обработка с помощью CBE снижала активность GСазы. Кроме того, у мышей, которые получали как CBE, так и rAAV-GBA1, уровни активности GСазы являлись аналогичными группе, обработанной с помощью PBS, что указывает на то, что доставка rAAV-GBA1 способна преодолевать ингибирование активности GСазы, индуцированное обработкой с помощью CBE. Анализ липидов проводили в моторной коре головного мозга мышей для определения уровней субстратов GluCer и GluSph. Оба липида накапливались в образцах головного мозга мышей, которым давали CBE, и обработка с помощью rAAV-GBA1 значительно снижала накопление субстрата.

[275] Уровни липидов отрицательно коррелировали как с активностью GСазы, так и с эффективностью в тесте с вращающимся стержнем во всех группах обработки. Повышенная активность GСазы после введения rAAV-GBA1 была ассоциирована со снижением количества субстрата и усилением моторной функции (фиг. 13). Как показано на фиг. 14, предварительное биораспределение оценивали по присутствию геномов векторов, измеренному посредством qPCR (при этом результат > 100 геномов векторов на 1 мкг геномной ДНК определялся как положительный). Мыши, которые получали rAAV-GBA1, как с CBE, так и без него, являлись положительными

в отношении геномов векторов rAAV-GBA1 в коре головного мозга, что указывает на то, что доставка ICV приводит к доставке rAAV-GBA1 в кору головного мозга. Кроме того, геномы векторов выявляли в печени, немного в селезенке и не выявляли в сердце, почке или гонадах. По всем показателям не было статистически значимой разницы между группами дня 1 и дня 3.

[276] В более крупном исследовании в модели с СВЕ дополнительно изучали эффективные дозы rAAV-GBA1 в модели с СВЕ. С применением модели с СВЕ с дозой, составляющей 25 мг/кг, вспомогательное вещество или rAAV-GBA1 доставляли посредством ICV в РЗ, и ежедневную IP обработку с помощью PBS или СВЕ начинали в Р8. Учитывая сходство между группами с отменой СВЕ и без него, наблюдаемое в предыдущих исследованиях, всех мышей умерщвляли через один день после последней дозы СВЕ (Р38—40). Оценивали эффект трех различных доз rAAV-GBA1, что приводило к следующим пяти группам по 10 мышей (5M/5F) на группу:

вспомогательное вещество ICV + PBS IP;

вспомогательное вещество ICV + 25 мг/кг СВЕ IP;

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

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

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

[277] В самой высокой дозе rAAV-GBA1 устранял неспособность прибавлять в весе, связанную с обработкой с помощью СВЕ, в Р37. Кроме того, эта доза приводила к статистически значимому повышению эффективности в тесте с вращающимся стержнем и тесте «сужающаяся дорожка» по сравнению с группой, обработанной вспомогательным веществом и с помощью СВЕ (фиг. 15). Летальность наблюдали в нескольких группах, в том числе группах, обработанных как вспомогательным веществом, так и с помощью rAAV-GBA1 (вспомогательное вещество + PBS: 0; вспомогательное вещество + 25 мг/кг СВЕ: 1; 3,2e9 vg rAAV-GBA1 + 25 мг/кг СВЕ: 4; 1,0e10 vg rAAV-GBA1 + 25 мг/кг СВЕ: 0; 3,2e10 vg rAAV-GBA1 + 25 мг/кг СВЕ: 3).

[278] По завершении прижизненного исследования мышей умерщвляли для биохимического анализа (фиг. 16). Активность GСазы в коре головного мозга

оценивали в трех биологических повторностях посредством флуорометрического анализа. Мыши, обработанные с помощью CBE, демонстрировали сниженную активность GСазы, тогда как мыши, которые получали высокие дозы rAAV-GBA1, демонстрировали статистически значимое повышение активности GСазы по сравнению с обработкой с помощью CBE. Мыши, обработанные с помощью CBE, также характеризовались накоплением GluCer и GluSph, оба из которых устранялись введением высокой дозы rAAV-GBA1.

[279] В дополнение к установленной химической модели CBE rAAV-GBA1 также оценивали в генетической модели 4L/PS-NA, которая является гомозиготной по мутации GD V394L в Gba1 и также характеризуется частичным дефицитом сапонинов, которые влияют на локализацию и активность GСазы. Эти мыши демонстрируют расстройства двигательной выносливости, координации и равновесия, о чем свидетельствуют их эффективность в анализах с использованием теста с прогулкой по сужающейся дорожке, теста с вращающимся стержнем и теста с подвешиванием за хвост. Обычно продолжительность жизни этих мышей составляет менее чем 22 недель. В начальном исследовании 3 мкл максимального титра вируса доставляли путем ICV в P23 при конечной дозе, составляющей 2,4e10 (6,0e10 vg/г головного мозга). С 6 мышами на группу группы обработки составляли:

WT + вспомогательное вещество ICV

4L/PS-NA + вспомогательное вещество ICV

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

[280] Моторную активность с использованием теста с прогулкой по сужающейся дорожке оценивали через 4 недели после доставки rAAV-GBA1. Группа мутантных мышей, которые получали rAAV-GBA1, демонстрировала тенденцию к меньшему общему количеству ошибок и меньшему количеству ошибок на определенную скорость по сравнению с мутантными мышами, обработанными вспомогательным веществом, восстановлению моторной функции почти до уровней WT (фиг. 17). Поскольку моторные фенотипы становятся более тяжелыми по мере старения этих мышей, их эффективность в отношении этого и других поведенческих тестов оценивают в более поздние моменты времени. При завершении

прижизненного исследования оценивают уровни липидов, активность GСазы и биораспределение у этих мышей.

[281] Дополнительные более низкие дозы rAAV-GBA1 на текущий момент тестируют с применением модели с CBE, что соответствует 0,03х, 0,1х и 1х предлагаемой высокой клинической дозы фазы 1. Каждая группа включает 10 мышей (5M/5F) на группу.

Вспомогательное вещество ICV

Вспомогательное вещество ICV + 25 мг/кг CBE IP;

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

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

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

[282] В дополнение к моторным фенотипам оценивают уровни липидов и активность GСазы в коре головного мозга. Также проводили обработки и анализы во временной динамике.

[283] Начинали более крупное исследование для определения диапазона доз для оценки данных по эффективности и безопасности. 10 мышам 4L/PS-NA (5M/5F на группу) вводили инъекции 10 мкл rAAV-GBA1. С применением аллометрического расчета веса головного мозга дозы коррелируют с 0,15х, 1,5х, 4,4х и 14,5х предлагаемой высокой клинической дозой фазы 1. Группы для инъекций состоят из:

WT + вспомогательное вещество ICV

4L/PS-NA + вспомогательное вещество ICV

4L/PS-NA + 4,3e9 vg (1,1e10 vg/г головного мозга) rAAV-GBA1 ICV

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

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

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

Пример 9. Анализ in vitro векторов на основе rAAV

[284] Конструкции на основе rAAV тестировали *in vitro* и *in vivo*. На фиг. 18 показаны иллюстративные данные в отношении экспрессии *in vitro* конструкций

гAAV, кодирующих белок програнулин (PGRN). На левой панели показана стандартная кривая для анализа ELISA програнулина (PGRN). На нижней панели показана зависимость «доза-ответ» для экспрессии PGRN, измеренная с помощью анализа ELISA в клеточных лизатах клеток HEK293T, трансдуцированных с помощью гAAV. MOI = множественность заражения (геномы векторов на клетку).

[285] Пилотное исследование проводили для оценки активности *in vitro* векторов на основе гAAV, кодирующих просапозин (*PSAP*) и *SCARB2*, отдельно или в комбинации с *GBA1* и/или одной или более ингибирующими РНК. Также тестировали одну конструкцию, кодирующую PSAP и програнулин (PGRN). Тестируемые векторы включают векторы, представленные в таблице 3. "Opt" относится к кодону последовательности нуклеиновой кислоты, оптимизированному для экспрессии в клетках млекопитающих (например, клетках человека). На фиг. 19 представлены иллюстративные данные, указывающие на то, что трансфекция клеток HEK293 с помощью каждой из конструкций приводила к сверхэкспрессии соответствующего продукта гена по сравнению с ложнотрансфицированными клетками.

[286] Пилотное исследование проводили для оценки активности *in vitro* векторов на основе гAAV, кодирующих TREM2, отдельно или в комбинации с одной или более ингибирующими РНК. Тестируемые векторы включают векторы, представленные в таблице 3. "Opt" относится к кодону последовательности нуклеиновой кислоты, оптимизированному для экспрессии в клетках млекопитающих (например, клетках человека). На фиг. 36А-36В показаны иллюстративные данные, указывающие на то, что трансфекция клеток HEK293 с помощью каждой из конструкций приводила к сверхэкспрессии соответствующего продукта гена по сравнению с ложнотрансфицированными клетками.

Таблица 3

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

				TREM2
--	--	--	--	-------

Пример 10. Тестирование конструкций shRNA SNCA и TMEM106B

Клетки HEK293

[287] В данном исследовании применяли линию клеток эмбриональной почки человека 293 (HEK293) (№ 85120602, Sigma-Aldrich). Клетки HEK293 поддерживали в культуральной среде (D-MEM [№ 11995065, Thermo Fisher Scientific], обогащенной фетальной бычьей сывороткой [FBS] [№ 10082147, Thermo Fisher Scientific]), содержащей 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (№ 15140122, Thermo Fisher Scientific).

Плазмидная трансфекция

[288] Плазмидную трансфекцию проводили с применением реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (№ 11668019, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце, клетки HEK293 (№ 12022001, Sigma-Aldrich) высевали при плотности, составляющей 3×10^5 клеток/мл, в культуральных средах без антибиотиков. На следующий день плазмиду и реагент Lipofectamine 2000 объединяли в раствор Opti-MEM (№ 31985062, Thermo Fisher Scientific). Через 5 минут смеси добавляли в культуру HEK293. Через 72 часа клетки собирали для экстракции РНК и белка или подвергали визуализирующим анализам. Для визуализирующих анализов лунки предварительно покрывали 0,01% раствором поли-L-лизина (P8920, Sigma-Aldrich) перед посевом клеток.

Анализ экспрессии гена посредством количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR)

[289] Относительные уровни экспрессии гена определяли посредством количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) с применением набора Power SYBR Green Cells-to-CT (№ 4402955, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Плазмиды-кандидаты вводили путем транзientной трансфекции в клетки HEK293, посеянные на 48-луночные планшеты ($7,5 \times 10^4$ клеток/лунка), с применением реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (0,5 мкг плазмиды и 1,5 мкл реагента в 50 мкл раствора Opti-MEM). Через 72 часа РНК экстрагировали из клеток и применяли для обратной транскрипции для синтеза

кДНК в соответствии с инструкцией производителя. Для анализа количественной ПЦР 2~5 мкл продуктов кДНК амплифицировали в двух повторностях с применением пар геноспецифических праймеров (в конечной концентрации 250 нМ) с мастермиксом Power SYBR Green PCR (№ 4367659, Thermo Fisher Scientific). Последовательности праймеров для генов *SNCA*, *TMEM106B* и *GAPDH* представляли собой: 5'- AAG AGG GTG TTC TCT ATG TAG GC -3' (SEQ ID NO: 71), 5'- GCT CCT CCA ACA TTT GTC ACT T -3' (SEQ ID NO: 72) для *SNCA*, 5'-ACA CAG TAC CTA CCG TTA TAG CA-3' (SEQ ID NO: 73), 5'-TGT TGT CAC AGT AAC TTG CAT CA-3' (SEQ ID NO: 74) для *TMEM106B* и 5'- CTG GGC TAC ACT GAG CAC C -3' (SEQ ID NO: 75), 5'- AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG -3' (SEQ ID NO: 76) для *GAPDH*. Количественную ПЦР проводили в системе QuantStudio 3 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Уровни экспрессии нормализовали по конститутивному гену *GAPDH* и рассчитывали с применением сравнительного способа CT.

Анализ флуоресцентной визуализации

[290] Репортерные плазмиды EGFP, которые содержат 3'-UTR гена *SNCA* человека ниже кодирующей области EGFP, применяли для валидации нокдаун-плазмид *SNCA* и *TMEM106B*. Репортерные плазмиды EGFP и нокдаун-плазмиды-кандидаты одновременно вводили путем трансфекции в клетки HEK293, посеянные на 96-луночные планшеты ($3,0 \times 10^4$ клеток/луночка), покрытые поли-L-лизин, с применением реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (0,04 мкг репортерной плазмиды, 0,06 мкг нокдаун-плазмиды и 0,3 мкл реагента в 10 мкл раствора Opti-MEM). Через 72 часа измеряли интенсивность флуоресценции сигнала EGFP при длине волны возбуждения 488 нм/длине волны испускания 512 нм с применением многорежимного ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific). Клетки фиксировали с помощью 4% PFA при RT в течение 10 минут и инкубировали с D-PBS, содержащим 40 мкг/мл 7-аминоактиномицина D (7-AAD) в течение 30 мин при к. т. После промывания с D-PBS измеряли интенсивность флуоресценции сигнала 7-AAD при длине волны возбуждения 546 нм/длине волны испускания 647 нм с применением ридера Varioskan для количественного определения количества клеток. Нормализованный сигнал EGFP при уровнях сигнала 7-AAD сравнивали с контрольными нокдаун-образцами.

Твердофазный иммуноферментный анализ

[291] Репортерные плазмиды α -синуклеина, которые содержат 3'-UTR гена *SNCA* или гена *TMEM106B* человека ниже кодирующей области *SNCA*, применяли для валидации нокдаун-плазмид на уровне белка. Уровни белка α -синуклеина определяли посредством ELISA (№ KHB0061, Thermo Fisher Scientific) с применением лизатов, экстрагированных из клеток HEK293. Плазмиды-кандидаты вводили путем транзientной трансфекции в клетки HEK293, посеянные на 48-луночные планшеты ($7,5 \times 10^4$ клеток/луночка), с применением реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (0,1 мкг репортерной плазмиды, 0,15 мкл нокдаун-плазмиды и 0,75 мкл реагента в 25 мкл раствора Opti-MEM). Через 72 часа клетки лизировали в буфере для радиоиммунопреципитационного анализа (RIPA) (№ 89900, Thermo Fisher Scientific), обогащенном смесью ингибиторов протеаз (№ P8340, Sigma-Aldrich), и подвергали воздействию ультразвука в течение нескольких секунд. После инкубации на льду в течение 30 мин лизаты центрифугировали при $20000 \times g$ при 4°C в течение 15 мин и собирали надосадочную жидкость. Количественно определяли уровни белка. Планшеты считывали в планшет-ридере Varioskan при 450 нм, и концентрации рассчитывали с применением программного обеспечения SoftMax Pro 5. Измеренные концентрации белка нормализовали по концентрации общего белка, определенной с помощью анализа с бидинхониновой кислотой (№ 23225, Thermo Fisher Scientific).

[292] На фиг. 37 и в таблице 4 показаны иллюстративные данные, указывающие на успешный сайленсинг *SNCA in vitro* согласно анализу по репортерному гену GFP (вверху) и анализу α -Syn (внизу). На фиг. 38 и в таблице 5 показаны иллюстративные данные, указывающие на успешный сайленсинг *TMEM106B in vitro* согласно анализу по репортерному гену GFP (вверху) и анализу α -Syn (внизу).

Таблица 4

ID	Промотор	Нокдаун	Промотор	Сверхэкспрессия
I00007	CMV_интронный	SNCA_mi	CMV	opt-GBA1
I00008	H1	SNCA_sh	CMV	opt-GBA1
I00009	H1	SNCA_Pubsh4	CMV	opt-GBA1

I00014	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-SCARB2_GBA
I00015	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-PSAP_GBA
I00016	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-CTSB_GBA
I00019	JL_интронный	SNCA_TMEN_mi	JetLong	opt-VPS35
I00023	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-GBA1_IL34
I00024	JL_интронный	SNCA_mi	JetLong	opt-GBA2
I00028	интронный	SNCA_Broadsh	CMV	opt-GBA1
I00029	интронный	SNCA_Pubsh4	CMV	opt-GBA1

Таблица 5

ID	Промотор	Нокдаун	Промотор	Сверхэкспрессия
I00010	H1	TMEN_Pubsh	CMV	opt-GRN
I00011	JL_интронный	TMEN_mi	JetLong	opt-GBA1_GRN
I00012	H1	TMEN_sh	CMV	opt-GRN
I00019	JL_интронный	SNCA_TMEN_mi	JetLong	opt-VPS35

Пример 11. Расположение последовательности «D» ITR и трансдукция клеток

[293] Исследовали эффект расположения последовательности «D» ITR в отношении клеточной трансдукции векторов на основе гAAV. Клетки HEK293 трансдуцировали с помощью кодирующего GСазу гAAV, имеющего 1) ITR дикого типа (например, последовательности «D», проксимальные по отношению к трансгенной вставке и дистальные по отношению к концу ITR) или 2) ITR с последовательностью «D», расположенной «снаружи» вектора (например, последовательностью «D», расположенной проксимально по отношению к концу ITR и дистально по отношению к трансгенной вставке), как показано на фиг. 20.

Неожиданно данные указывают на то, что rAAV, имеющие последовательность «D», расположенную в положении «снаружи», сохраняют способность эффективно упаковываться и трансдуцировать клетки (фиг. 40).

*Пример 12. Тестирование *in vitro* rAAV програнулина*

[294] На фиг. 39 представлено схематическое изображение одного варианта осуществления вектора, содержащего экспрессионную конструкцию, кодирующую PGRN. Програнулин сверхэкспрессируется в ЦНС грызунов, характеризующихся дефицитом *GRN*, либо гетерозиготных, либо гомозиготных по делеции *GRN*, посредством инъекции вектора на основе rAAV, кодирующего PGRN (*например*, кодон-оптимизированный програнулин) посредством интрапаренхиматозной либо интратекальной инъекции, такой как в большую цистерну.

[295] Мышам вводили инъекции в возрасте 2 месяца и 6 месяцев и в возрасте до 6 месяцев или 12 месяцев анализировали по одному или нескольким из следующего: уровни экспрессии *GRN* на уровне РНК и белка, поведенческие анализы (*например*, улучшение движения), анализы выживаемости (*например*, улучшение выживаемости), маркеры микроглии и воспалительные маркеры, глиоз, потеря нейронов, липофусциноз и/или устранение накопления лизосомальных маркеров, таких как LAMP1. Анализы на мышях с дефицитом PGRN описаны, *например*, Arrant et al. (2017) *Brain* 140: 1477-1465; Arrant et al.. 2018) *J. Neuroscience* 38(9):2341–2358; и Amado et al. (2018) doi:<https://doi.org/10.1101/30869>; полные содержания которых включены в данный документ посредством ссылки.

*Пример 13. Тестирование *in vitro* и *in vivo* rAAV програнулина*

[296] Анализы *in vitro* и *in vivo* проводили для анализа эффектов конструкции на основе rAAV (PR006 (также называемый PR006A); см. фиг. 64), кодирующей белок програнулин (PGRN). PR006 содержит капсид, имеющий серотип AAV9.

*Неклинические исследования *in vitro**

Экспрессия програнулина, полученная из PR006A в клетках HEK293T

[297] Исследовали способность PR006A индуцировать выработку белка програнулина в клеточном окружении. Клетки HEK293T трансдуцировали с помощью PR006A в диапазоне множественности заражения (MOI) в диапазоне от 2,1

$\times 10^5$ до $3,3 \times 10^6$ геномов векторов (vg)/клетка. Трансдукция PR006A приводила к устойчивому дозозависимому повышению экспрессии белка програнулина и секреции в клеточных средах (фиг. 60). Значительно более низкие уровни белка програнулина, отражающие экспрессию, полученную из эндогенного гена *GRN* человека, обнаруживали в группе отрицательного контроля, обработанной вспомогательным веществом отдельно (предполагаемая клиническая среда-носитель).

Эффективность в нейронах FTD-GRN, происходящих из iPSC

[298] Исследование проводили для анализа эффективности конструкции гAAV *in vitro* в нейрональных культурах человека с FTD-GRN (лобно-височной деменцией с мутацией *GRN*). Линии клеток получали из репозитория клеток и данных человека (NHCDR) Национального института неврологических расстройств и инсульта (NINDS): Материалы ND50015 (FTD-GRN, M1L), ND50060 (FTD-GRN, R493X) и ND38555 (контроль, дикий тип) (см. таблицу 6).

Таблица 6. Краткое описание характеристик линии клеток iPSC

Линия клеток	NINDS, ID линии клеток №	Клинический диагноз FTD?	Мутация <i>GRN</i>	Возраст	Пол	Источник клеток/ способ перепрограммирования
FTD-GRN #1	ND50015	Да	M1L	54	F	Фибробласт/ эписомальные плазмиды
FTD-GRN #2	ND50060	Группа риска (брат или сестра страдали в возрасте 62 года)	R493X	60	M	Фибробласт/ эписомальные плазмиды
Контроль	ND38555	Нет	Н/д	48	F	Фибробласт/ ретровирусные плазмиды

[299] Для создания клеточной модели, которая является патологически соответствующей FTD-GRN, iPSC из каждой линии дифференцировали в нейрональные клетки с применением двухстадийного протокола. В первой стадии iPSC дифференцировали в линии пролиферирующих нейрональных стволовых клеток (NSC), которые характеризовались отсутствием экспрессии плюрипотентных маркеров (т. е. Oct4 и SSEA1) и приобретали экспрессию маркеров нейрональных

стволовых клеток (т. е. SOX2, нестина, SOX1 и PAX6), как определено посредством иммунофлуоресцентного мечения.

[300] Контрольные линии и линии NSC FTD-GRN высевали с одинаковой плотностью, и через 48 часов экспрессию програнулина измеряли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в клеточных лизатах (внутриклеточный програнулин) (фиг. 52E) и клеточных средах (секретируемый програнулин) (фиг. 52A). Экспрессию програнулина нормализовали по концентрации общего белка, чтобы учесть различия в количестве клеток ($n=3$; среднее значение $\pm$ SEM). Линии NSC с гетерозиготными мутациями GRN характеризовались значительно более низкими уровнями внутриклеточного и секретируемого програнулина по сравнению с контрольными NSC, при этом NSC FTD-GRN экспрессировали ~ 25 -50% от уровней эндогенного програнулина. Это свидетельствует о том, что эта клеточная модель FTD-GRN воспроизводит клинический дефицит програнулина, наблюдаемый у пациентов с FTD-GRN, у которых уровень экспрессируемого програнулина в плазме крови составляет от одной трети до одной второй нормального уровня (Finch et al., *Brain* 132, 583-591 (2009); Ghidoni et al., *Neurology* 71, 1235-1239, (2008); Sleegers et al., *Ann Neurol* 65, 603-609 (2009)).

[301] NSC из всех линий клеток дифференцировали в нейрональные культуры. После установления того, что NSC, происходящие из iPSC, демонстрируют сниженную экспрессию програнулина, линии дифференцировали в нейроны для получения клинически репрезентативного типа клеток для неклинических исследований эффективности PR006A. NSC высевали в средах для дифференцировке нейронов, подвергали терминальной дифференцировке в постмитотические нейроны в течение периода, составляющего 7 дней, а затем оценивали экспрессию нейрональных маркеров (т. е. MAP2, NeuN, Тау, Tuj1, NF-H) с помощью иммунофлуоресценции (фиг. 52G). Как контрольные линии, так и линии FTD-GRN, происходящие из iPSC, эффективно дифференцировали в нейроны с применением данного протокола.

[302] Нейрональные культуры FTD-GRN, происходящие из iPSC, применяли для оценки эффективности PR006A *in vitro*. Нейроны FTD-GRN обрабатывали вспомогательным веществом или с помощью PR006A при MOI, составляющих 2,7 x

10^5 , $5,3 \times 10^5$ или $1,1 \times 10^6$ vg/клетка. Трансдукция PR006 приводила к устойчивой дозозависимой экспрессии секретируемого програнулина, измеренной посредством ELISA, во всех линиях клеток (фиг. 52B). Обработанные вспомогательным веществом контрольные нейроны и нейроны FTD-GRN оценивали в отношении уровней эндогенного програнулина. Контрольные нейроны экспрессировали эндогенно секретируемый програнулин, тогда как секретируемый програнулин не выявляли в нейронах FTD-GRN (фиг. 52B). Линейный регрессионный анализ подтвердил значительную корреляцию между дозой PR006A и уровнями програнулина в обеих линиях клеток FTD-GRN ($p=3,5 \times 10^{-13}$). Данные результаты демонстрируют, что обработка с помощью PR006A приводит к повышенной секреции програнулина в нейрональной модели FTD-GRN.

[303] Известно, что програнулин стимулирует созревание лизосомальной протеазы катепсина D (CTSD), потеря функции которой также была вовлечена в лизосомные болезни накопления и нейродегенерацию. CTSD экспрессируется как неактивный полноразмерный пробелок (proCTSD), который подвергается протеолитическому процессингу в ферментативно активную зрелую протеазу (matCTSD). Сообщалось, что програнулин действует как молекулярный шаперон, который связывается с proCTSD для усиления его созревания в протеазу matCTSD. В нейрональных культурах FTD-GRN трансдукция PR006 устраняла дефектное созревание катепсина D (фиг. 52C). Контрольные нейроны, нейроны FTD-GRN #1 и нейроны FTD-GRN #2 трансдуцировали с помощью PR006A или вспомогательного вещества. MOI PR006A, составляющую $5,3 \times 10^5$, применяли для экспериментов по эффективности, поскольку она восстанавливала уровни програнулина в по меньшей мере 2 раза по сравнению с контрольными клетками (фиг. 52B). Для оценки эффективности уровни экспрессии proCTSD и matCTSD измеряли в клеточных лизатах с применением платформы Simple Western™ (Jess) (фиг. 52C). Нейроны FTD-GRN, обработанные вспомогательным веществом, характеризовались более низким соотношением matCTSD к proCTSD по сравнению с контрольными нейронами, обработанными вспомогательным веществом; обработка с помощью PR006A значительно повышала соотношение в обеих линиях нейронов FTD-GRN (фиг. 52C). В контрольных нейронах соотношение matCTSD к proCTSD значительно не изменялось посредством обработки с помощью PR006A. Данные результаты

демонстрируют, что PR006A восстанавливают фенотип, связанный с лизосомальной функцией, в нейронах FTD-GRN.

[304] В нормальных нейронах белок TDP-43 (ДНК-связывающий белок транскриптивного ответа массой 43 кДа) локализован в ядре. В головном мозге после смерти пациентов с FTD-GRN наблюдается агрегация TDP-43 в цитоплазме нейронов и снижается ядерное накопление TDP-43. Нейроны FTD характеризуются сниженным уровнем ядерного TDP-43, что приводит к агрегации и последующей токсичности в нейронах. Поскольку мыши с КО *Grn* полностью не воссоздают эту патологию TDP-43, нейроны, происходящие из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) являются ценной моделью FTD-GRN для исследования биологии TDP-43. Сообщалось о снижении накопления TDP-43 в ядре и увеличении накопления нерастворимого TDP-43 в нейронах, происходящих из iPSC, у пациентов с FTD-GRN по сравнению с контрольными нейронами, которые не несут мутацию *GRN*, как описано у Valdez et al. (*Human Molecular Genetics* 26, 4861-4872 (2017)). Трансдукция PR006A культур нейронов из обеих линий, несущих мутацию FTD-GRN, устраняла аномалии TDP-43, что приводит к снижению уровня нерастворимого TDP-43 (измеренного с применением платформы Simple Western™ (фиг. 52D)) и повышению ядерной локализации TDP-43 (измеренной с применением иммунофлуоресценции (фиг. 52F)).

[305] Подводя итог, можно сказать, что трансдукция PR006 устраняла дефектное созревание лизосомального фермента катепсина D и улучшала аномальную патологию TDP-43 в нейронах FTD-GRN.

Неклинические исследования *in vivo*

Эффективность и биораспределение у старых мышей с нокаутированным геном *Grn*

[306] Эффективность PR006A *in vivo* и максимальную дозу PR006A оценивали в мышинной модели с нокаутированным геном (КО) *Grn*. В мышинной модели с КО *Grn*, используемой в этих исследованиях (B6(Cg)-*Grn*^{tm1.1Aidi}/J (Jackson Laboratory, Бар Харбор, Мэн), экзоны 1-4 удаляли из целевого гена програнулина (*Grn*) (Yin et al., *J Exp Med* 207, 117-128 (2010)). Эти животные характеризуются полной потерей програнулина, проявляют зависимые от возраста фенотипы, в том числе

лизосомальные изменения, накопление нейронального липофусцина, накопление убиквитина, микроглиоз и нейровоспаление, и, следовательно, их широко применяют для моделирования FTD-GRN. Все попытки предпринимались для исключения ошибки из исследования; мышей распределяли по группам обработки, которые являлись сбалансированными по полу и весу тела, и проводили оценку экспериментальных конечных точек с помощью квалифицированного персонала в слепом режиме.

[307] В начальных исследованиях PR006A доставляли состарившимся мышам с КО *Grn* в дозе, составляющей $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), которая представляла собой самую высокую достижимую дозу в момент исследования вследствие ограничений объема инъекций и физического титра партии вируса, используемой для исследования. Использовали старых мышей, поскольку многие из фенотипов, связанные с FTD-GRN, в том числе воспаление в ЦНС и микроглиоз, развиваются зависимым от возраста образом с наиболее выраженным проявлением фенотипов в возрасте от 12 до 24 месяцев.

[308] В исследованиях со старыми мышами с КО *Grn* PR006A вводили путем однократной интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции. 10 мкл вспомогательного вещества (предполагаемая клиническая среда-носитель; 20 mM Tris, pH 8,0, 200 mM NaCl и 1 mM $MgCl_2$ + 0,001% Pluronic F68) или $9,7 \times 10^{10}$ vg PR006A ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга [на основе веса головного мозга взрослой мыши, составляющего 400 мг]) доставляли путем ICV инъекции в двух когортах старых мышей с КО *Grn*: (1) в возрасте 16 месяцев в момент инъекции (n = 4/группа; PRV-2018-027; фиг. 61) и (2) в возрасте 14 месяцев в момент инъекции (планируемое n = 3/группа; PRV-2019-002; фиг. 61). Животных умерщвляли через два месяца после инъекции.

[309] В исследовании PRV-2018-027 однократную дозу PR006A доставляли мышам в возрасте 16 месяцев со следующими группами обработки.

Модель	ICV	Доза ICV	N
КО <i>Grn</i>	Вспомогательное вещество	Н/д	4 (2M/2F)
КО <i>Grn</i>	PR006A	$9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга)	5 (3M/2F)

[310] Вследствие непредвиденных отклонений в исследовании (ошибок в генотипировании и преждевременной потери животных) исследование PRV-2019-002 (когорта в возрасте 14 месяцев) включало только 1 мышь в группе, обработанной вспомогательным веществом, вместо планируемых $n = 3$. Небольшое количество образцов сделало невозможным статистический анализ и, следовательно, это исследование исключено из дальнейшего обсуждения в данном документе. Однако результаты исследования являлись сопоставимыми с результатами исследования PRV-2018-027.

[311] Биораспределение и экспрессия програнулина. Биораспределение определяли посредством измерения присутствия геномов векторов с применением анализа qPCR, который соответствует действующим стандартам Центра по оценке и изучению биологических препаратов (CBER) / отдела тканей и передовых методов терапии (OTAT) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для чувствительности ПЦР (при этом результат > 50 геномов векторов на 1 мкг геномной ДНК определялся как положительный). Все мыши, которые получали PR006A, являлись положительными по геномам векторов в коре головного мозга и спинном мозге, что указывает на то, что введение ICV успешно приводит к трансдукции PR006A в головной мозг и ЦНС (фиг. 59А). PR006A ICV приводил к значительным уровням белка програнулина человека в ЦНС (головном мозге, спинном мозге) мышей с КО *Grn*, тогда как, как и ожидалось, програнулин человека не выявляли у мышей, получавших вспомогательное вещество (фиг. 59В). Поскольку програнулин представляет собой первично секретируемый белок, экспрессию в CSF можно считать суррогатом выработки белка в головном мозге, и она представляет собой потенциальную трансляционную конечную точку для пациентов с FTD-GRN, которые характеризуются сниженными уровнями програнулина в CSF. Авторы настоящего изобретения были способны выявить програнулин человека в CSF мышей, обработанных с помощью PR006A, но вследствие малого объема образца и технических ограничений получения достаточного объема CSF у мышей измерения уровня програнулина в CSF находились ниже нижнего предела количественного определения (LLOQ) анализа (фиг. 59С).

[312] Введение ICV также приводило к широкому присутствию геномов векторов и уровням белка програнулина в периферических тканях, в том числе печени, сердце, легком, почке, селезенке и гонадах (фиг. 62A – 62B). Кроме того, значительные уровни програнулина человека выявляли в плазме крови мышей с КО *Grn*, обработанных с помощью PR006A. Как ожидалось, програнулин человека не выявляли у мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом.

[313] Накопление липофусцина. Накопление нейронального липофусцина, электронно-плотного, аутофлуоресцентного материала, который постепенно накапливается с течением времени в лизосомах постмитотических клеток и представляет собой индикатор лизосомальной дисфункции, представляет собой характерный зависимый от возраста фенотип мышей с КО *Grn*. Накопление липофусцина оценивали с применением двух независимых способов в прилегающих срезах головного мозга: (1) при более клиническом подходе накопление липофусцина в головном мозге оценивали в баллах патологоанатомом по шкале от 0 (липофусцин не наблюдается) до 4 (обширное накопление липофусцина) в слепом режиме и (2) при более количественном подходе аутофлуоресценцию липофусцина выявляли с помощью иммуногистохимического анализа (ИНС) и автоматически количественно определяли. Мыши с КО *Grn* характеризовались значительным липофусцинозом во всем головном мозге, и обработка ICV с помощью PR006A снижала балл тяжести накопления липофусцина в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе (фиг. 59D). Количественное определение накопления липофусцина из изображений ИНС также выявляло уменьшение липофусциноза при обработке с помощью PR006A во всех трех областях головного мозга. Поскольку положительные по убиквитину включения являются определяющим патологическим признаком пациентов с FTD-GRN, и они также накапливаются в мышинной модели с КО *Grn* зависимым от возраста образом, проводили и количественно оценивали ИНС в областях головного мозга, представляющих интерес (кора головного мозга, гиппокамп, таламус), для оценки накопления убиквитина. Обработка с помощью PR006A значительно снижала накопление убиквитина у мышей с КО *Grn* (фиг. 59E). Эти результаты свидетельствуют о том, что PR006A улучшает лизосомальную дисфункцию в мышинной модели FTD-GRN с КО *Grn*.

[314] Нейровоспаление. Хроническое воспаление в ЦНС представляет собой патологический признак в головном мозге пациентов с FTD-GRN, который воссоздается у мышей с КО *Grn* зависимым от возраста образом. Програнулин характеризуется противовоспалительными эффектами в мышинных моделях FTD-GRN, и потеря програнулина ведет к активации провоспалительных цитокинов, в том числе TNF α . В этом исследовании обработка с помощью PR006A подавляла уровни воспалительных маркеров у старых мышей с КО *Grn*. PR006A ICV снижал экспрессию гена провоспалительного цитокина *Tnf* (TNF α) и *Cd68* (CD68), маркера микроглии, в коре головного мозга (фиг. 59F). Уровни белка TNF α также снижались в образцах коры головного мозга от мышей с КО *Grn*, обработанных с помощью PR006A, с применением анализа провоспалительных цитокинов мыши Mesoscale Discovery (фиг. 59G). Для дополнительной оценки нейровоспаления проводили иммуногистохимический анализ (ИHC) для Iba1, маркера микроглиоза, и GFAP, маркера астроцитоза, и количественно определяли в областях головного мозга, представляющих интерес (коре головного мозга, гиппокампе, таламусе). Обработка с помощью PR006A приводила к тенденции к снижению микроглиоза (Iba1), но не влияла на астроцитоз (GFAP) у мышей с КО *Grn* (фиг. 59H; фиг. 59I). В совокупности эти результаты указывают на то, что обработка с помощью PR006A снижает нейровоспаление в модели на старых мышях с КО *Grn* FTD-GRN.

[315] Гистопатологическое исследование: тщательный гистопатологический анализ, который проводился патологоанатомом высшей категории в слепом режиме на окрашенных гематоксилином и эозином (H&E) срезах головного мозга, грудного отдела спинного мозга, печени, сердца, селезенки, легкого и почки всех мышей из этих исследований, не выявил нежелательных явлений, связанных с обработкой с помощью PR006A. Введение PR006A мышам с КО *Grn* приводило к снижению частоты и/или тяжести результатов, которые были характерными для модели, в том числе снижение частоты и/или баллов тяжести нейронального некроза в продолговатом мозге и мосте. Кроме того, при обработке с помощью PR006A наблюдали снижение как частоты, так и тяжести аксональной дегенерации в грудном отделе спинного мозга. Эти результаты обсуждаются подробно в разделе «Токсикология» ниже.

[316] Заключение: PR006A ICV в дозе, составляющей $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), приводила к широкому присутствию геномов векторов во всем головном мозге и периферических тканях у старых мышей с КО *Grn*. Обработка с помощью PR006A повышала глобальную экспрессию програнулина. Кроме того, PR006A снижал накопление липофусцина и убиквитина в головном мозге, патологии, которые, как известно, возникают как в мышинной модели с КО *Grn*, так и у пациентов с FTD-GRN. PR006A также снижала экспрессию провоспалительных цитокинов и активацию иммунных клеток в коре головного мозга — фенотипы, указывающие на хроническое воспаление в ЦНС.

Эффективность в зависимости от диапазона доз у взрослых мышей с нокаутированным геном Grn

[317] Для дополнительной оценки эффективных доз PR006A проводили более крупное исследование для определения диапазона доз у взрослых мышей с КО *Grn*. В PRV-2019-004 10 мкл вспомогательного вещества (предполагаемая клиническая среда-носитель; 20 mM Tris, pH 8,0, 200 mM NaCl и 1 mM MgCl₂ + 0,001% Pluronic F68) или PR006A доставляли посредством ICV животным в возрасте 4 месяца. Взрослых мышей использовали вместо старых мышей с КО *Grn*, поскольку последние не являлись доступными в достаточном количестве для проведения исследования для определения диапазона доз. Хотя взрослые мыши с КО *Grn* характеризуются более легким фенотипом, чем старые мыши, они все еще демонстрируют лизосомальные дефекты и нейровоспалительные изменения и, следовательно, являются подходящими для оценки диапазона эффективных доз PR006A. Чтобы оценить эффективность PR006A в широком диапазоне доз вируса, PR006A вводили в дозе, составляющей $1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), самой высокой достижимой дозе в момент исследования вследствие ограничений объема инъекции и физического титра партии вируса, используемой для исследования, средней дозе, составляющей $1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), или низкой дозе, составляющей $1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга) при полной логарифмической разнице, охватывающей каждую дозу. Детали экспериментального плана представлены на фиг. 63.

[318] Три дозы PR006A оценивали с 10 мышами (4M/6F) на группу.

Модель	ICV	Доза ICV	N
KO <i>Grn</i>	Вспомогательное вещество	Н/д	10 (4M/6F)
KO <i>Grn</i>	PR006A	$1,1 \times 10^9$ vg ($2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга)	10 (4M/6F)
KO <i>Grn</i>	PR006A	$1,1 \times 10^{10}$ vg ($2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга)	10 (4M/6F)
KO <i>Grn</i>	PR006A	$1,1 \times 10^{11}$ vg ($2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга)	10 (4M/6F)

[319] Мыши в соответствующей возрастной группе из той же линии генетического окружения, что и мыши с KO *Grn* с аллелями *Grn* дикого типа (WT) (в возрасте 7 месяцев C57BL/6J), служили в качестве контроля для выбранных конечных точек эффективности в этом исследовании.

Модель	ICV	Доза ICV	N
WT (C57BL/6J)	Н/д	Н/д	10 (5M/5F)

[320] Биораспределение и экспрессия програнулина. Биораспределение определяли посредством измерения присутствия геномов векторов с применением анализа qPCR, который соответствует действующим стандартам CBER/OTAT Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для чувствительности ПЦР (при этом результат > 50 геномов векторов на мкг геномной ДНК определялся как положительный). Мыши, которые получали PR006A, являлись положительными по геномам векторов в коре головного мозга и спинном мозге дозозависимым образом, что указывает на то, что введение ICV успешно приводит к трансдукции PR006A в ЦНС (фиг. 53А). Анализ qRT-PCR *GRN*, кодируемого PR006A, выявило, что введение дозы ICV PR006A приводило к дозозависимой индукции экспрессии мРНК *GRN* человека в коре головного мозга (фиг. 53В). Обработка с помощью PR006A повышала уровни белка програнулина в головном мозге и в спинном мозге (фиг. 53С). В ткани головного мозга уровни програнулина человека выявляли и количественно определяли при самой высокой дозе PR006A; при более низких дозах уровни програнулина находились ниже предела анализа выявления вследствие высокого фона в головном мозге. Однако на основании кратности логарифмической разницы между дозами пропорциональная оценка ожидаемых уровней програнулина при более низких дозах будет значительно ниже нижнего предела количественного определения (LLOQ) анализа в ткани головного

мозга. Уровень эндогенного програнулина мыши измеряли у мышей с аллелями *Grn* дикого типа (WT) в соответствующей возрастной группе и из соответствующей линии; как в коре головного мозга, так и в спинном мозге уровни програнулина человека у мышей с КО *Grn*, обработанных с помощью PR006A, не превышали уровень эндогенного програнулина у мышей WT при любой дозе. Поскольку для измерения програнулина человека и мыши применяли различные анализы выявления с использованием не обладающих межвидовой перекрестной реактивностью антител к програнулину, абсолютные числа нельзя сравнивать с точностью.

[321] Введение PR006A также приводило к обширному присутствию геномов векторов и уровням белка програнулина в периферических тканях, в том числе печени, сердце, легком, почке, селезенке и гонадах (фиг. 53D; фиг. 53E).

[322] В плазме крови значительные уровни програнулина человека выявляли у мышей с КО *Grn*, обработанных с помощью PR006A, при всех уровнях доз (фиг. 53F). В соответствии с ожиданиями, програнулин человека не выявляли у мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом. Уровни програнулина человека у животных, обработанных с помощью средней дозы PR006A, находились в том же диапазоне, что и уровни програнулина мыши, измеренные у мышей с аллелями *Grn* WT. Поскольку для измерения програнулина человека и мыши применяли различные анализы выявления с использованием не обладающих межвидовой перекрестной реактивностью антител к програнулину, абсолютные числа нельзя сравнивать с точностью.

[323] Накопление липофусцина. Накопление липофусцина оценивали с применением двух независимых способов в прилегающих срезах головного мозга: (1) при более клиническом подходе накопление липофусцина в головном мозге оценивали в баллах патологоанатомом по шкале от 0 (липофусцин не наблюдается) до 4 (обширное накопление липофусцина) в слепом режиме и (2) при более количественном подходе аутофлуоресценцию липофусцина выявляли с помощью ИНС и автоматически количественно определяли. Мыши с КО *Grn* характеризовались липофусцинозом во всем головном мозге, тогда как у мышей WT не выявляли липофусцин в головном мозге (фиг. 53G). Введение ICV PR006A приводило к дозозависимому снижению баллов тяжести внутриклеточного накопления липофусцина в головном мозге мышей с КО *Grn* (фиг. 53G). Эффективность PR006A

в отношении снижения проявления липофусциноза может быть наиболее легко количественно определена в областях головного мозга, которые демонстрируют наиболее устойчивый фенотип липофусциноза в мышинной модели FTD-GRN с КО *Grn*, в том числе гиппокампе и таламусе. В дополнение к оцениванию липофусцина патологоанатомом, ИНС, проведенная в областях головного мозга, представляющих интерес (например, коре головного мозга, гиппокампе, таламусе), для количественной оценки липофусциноза, выявила дозозависимое снижение количества накопления липофусцина в областях головного мозга, представляющих собой кору головного мозга и таламус, со значительным снижением при средних и высоких дозах PR006A. ИНС также проводили для оценки накопления убиквитина в головном мозге — дополнительной патологии, связанной с FTD-GRN, которая имеет место у мышей с КО *Grn*. По сравнению с мышами WT мыши с КО *Grn* демонстрировали повышение уровня убиквитина во всем головном мозге (фиг. 53H). PR006A значительно уменьшал размер иммунореактивных объектов убиквитина почти до уровней WT при всех трех дозах (фиг. 53H).

[324] Нейровоспаление. Обработка с помощью PR006A подавляла уровни воспалительных маркеров в головном мозге взрослых мышей с КО *Grn*. PR006A ICV снижал экспрессию гена провоспалительного цитокина *Tnf* (TNF α) и *Cd68* (CD68), маркера микроглии, в коре головного мозга в диапазоне доз, составляющем от $2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга до $2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга (фиг. 53I). В соответствии с опубликованными данными авторы настоящего изобретения наблюдали повышение экспрессии генов этих провоспалительных маркеров у мышей с КО *Grn*, обработанных вспомогательным веществом, по сравнению с мышами в соответствующей возрастной группе с аллелями *Grn* дикого типа (фиг. 53I). В отличие от наблюдений за мышами с КО *Grn* в возрасте 18 месяцев из PRV-2018-027 и сообщений об аномалиях TNF α в литературе, не было устойчивого повышения уровней белка TNF α в коре головного мозга у взрослых мышей с КО *Grn* в возрасте 7 месяцев, обработанных вспомогательным веществом; кроме того, никаких значительных изменений не наблюдали с PR006A у мышей с КО *Grn*. Эти результаты соответствуют ранее опубликованным результатам, что устойчивые нейровоспалительные фенотипы не имеют место в мышинной модели с КО *Grn* до возраста 12-24 месяцев. Иммуногистохимический анализ (ИНС) проводили и

количественно оценивали в областях головного мозга, представляющих интерес (коре головного мозга, гиппокампе и таламусе), для дополнительной оценки нейронального воспаления посредством окрашивания на Iba1, маркер микроглиоза, и GFAP, маркер астроцитоза. Наблюдали значительное увеличение микроглиоза (Iba1) и астроцитоза (GFAP) во всем головном мозге у мышей с КО *Grn* по сравнению с мышами WT (фиг. 53J - фиг. 53K). Обработка с помощью PR006A значительно уменьшала микроглиоз (Iba1) при всех трех дозах (фиг. 53J). Тенденцию в отношении уменьшения астроцитоза (GFAP) наблюдали при средней дозе PR006A, и значительное уменьшение астроцитоза (GFAP) наблюдали при высокой дозе PR006A в таламической области головного мозга (фиг. 53K).

[325] Хотя многие из фенотипов мышинной модели с КО *Grn* проявляются в более позднем возрасте, в исследованиях сообщалось, что мыши с КО *Grn* демонстрируют широко распространенные изменения экспрессии генов уже в возрасте 4 месяцев, в том числе изменения в лизосомальных и иммунных путях. Следовательно, в дополнение к направленному анализу qRT-PCR, описанному выше, применяли подход транскриптомики для оценки изменений в уровнях мРНК, которые можно оценить глобально с помощью чувствительных технологий с высокой пропускной способностью (секвенирования РНК) и требуют минимальное количество материала образца. Авторы настоящего изобретения проводили секвенирование РНК в коре головного мозга и применяли анализ вариации групп генов (Hanzelmann et al., *BMC Bioinformatics* 14, 7 (2013)) для определения того, какие пути экспрессии генов изменяются у мышей с КО *Grn* в возрасте 7 месяцев, обработанных вспомогательным веществом, по сравнению с мышами в соответствующей возрастной группе WT этой же линии. Авторы настоящего изобретения подтвердили дефициты в лизосомальных и иммунных путях у мышей без *Grn*, как сообщалось в ранее опубликованных исследованиях. Сообщалось о значительных изменениях в подгруппе генов «вакуолярные» TERM GO (GO:0005773) (содержит 4 гена, о нарушении регуляции которых сообщалось у мышей с КО *Grn*, как описано Lui et al (*Cell* 165, 921-935 (2016))), группе «лизосомальных генов» (подгруппа из 25 генов, связанных с лизосомами, которые, как показано, характеризуются нарушением регуляции у мышей с КО *Grn*, как описано Evers et al (*Cell Reports* 20, 2565-2574 (2017))) и группе генов «система комплемента» из базы данных анализа представленности групп генов

для характерных генов (содержит гены, кодирующие компоненты системы комплемента, части врожденной иммунной системы). Затем авторы настоящего изобретения измеряли и сравнивали уровни активности этих групп генов с обработкой с помощью PR006A (фиг. 53L – фиг. 53N). Обработка с помощью PR006A дозозависимо устраняла различия в группах генов, наблюдаемые у мышей с КО *Grn*.

[326] Гистопатологическое исследование. Тщательный гистопатологический анализ, который проводился патологоанатомом высшей категории в слепом режиме на окрашенных гематоксилином и эозином (H&E) срезах головного мозга, грудного отдела спинного мозга, печени, сердца, селезенки, легкого и почки всех мышей из этих исследований, не выявил доказательств токсичности, связанных с обработкой с помощью PR006A. Детали анализа токсичности представлены в разделе ниже.

[327] Заключение: PR006A ICV в дозах в диапазоне от $2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга до $2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга приводил к обширному присутствию геномов векторов во всем головном мозге и периферических тканях дозозависимым образом. Обработка с помощью PR006A также приводила к выработке мРНК и белка програнулина в ЦНС. Явную дозозависимую взаимосвязь между PR006A и уменьшением липофусциноза, показателем лизосомальной дисфункции, наблюдали в нескольких областях головного мозга. Устойчивое и статистически значимое уменьшение уровня липофусциноза наблюдали при среднем и высоком уровне дозы PR006A. Все дозы PR006A снижали накопление убиквитина в головном мозге. Начиная с самой низкой дозы, составляющей $2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга, PR006A снижал экспрессию провоспалительных маркеров в головном мозге на уровне РНК и белка.

Сводная информация. Неклинические исследования *in vivo*

[328] PR006A эффективно трансдуцировал мышей с КО *Grn*, что приводило к устойчивому дозозависимому биораспределению трансгена и выработке мРНК и белка програнулина в ЦНС. PR006A дозозависимо устранял аномалии экспрессии генов в лизосомальном и нейровоспалительном путях. PR006A уменьшал многие из фенотипов, встречающиеся в головном мозге этой мышинной модели FTD-GRN, в том числе липофусциноз, накопление убиквитина и микроглиоз. В исследовании для определения диапазона доз самая низкая доза PR006A, составляющая $2,7 \times 10^9$ vg/г

головного мозга, значительно подавляла экспрессию воспалительных маркеров в коре головного мозга. Средняя доза PR006A, составляющая $2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга, улучшала как лизосомальные дефекты (*например*, липофусциноз), так и нейровоспаление устойчивым и статистически значимым образом. Высокая доза PR006A, составляющая $2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга, дополнительно повышала экспрессию програнулина при отсутствии доказательства токсичности.

Таблица 7. Сводная информация о биораспределении

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

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

Фармакологическая безопасность

[329] На протяжении этих исследований не отмечали нежелательных явлений, которые можно было бы отнести к тестируемому изделию. Результаты безопасности из прижизненных и гистопатологических анализов животных в PRV-2018-027, PRV-2019-002 и PRV-2019-004 обсуждаются в разделе ниже.

Токсичность однократной дозы

[330] Серию неклинических исследований с PR006A проводили для изучения конечных точек безопасности у мышей и обезьян. Три исследования проводили в модели с КО *Grn*, где конечные точки включали нейropатологические оценки и оценивали как защитную активность, так и потенциальную токсичность в результате введения PR006A посредством интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции; введение ICV является более технически сложным у мышей. Эти мышинные модели являются репрезентативными для FTD-GRN, при котором пациенты характеризуются

мутацией в гене *GRN*, приводящей к сниженным уровням програнулина. У яванских макаков нейропатологическое исследование также проводили как часть пилотного исследования, в котором PR006A вводили путем инъекции в большую цистерну (ICM). Исследование GLP проводили у яванских макаков, в котором PR006A доставляли в ICM, и обезьян умерщвляли в день 7, день 30 и день 183. Исследование GLP включало полный перечень клинических конечных точек в дополнение к патологоанатомическим оценкам в отношении полного перечня тканей. Для поддержки однократного введения дозы в клинику проводили следующие исследования однократного введения.

Максимальная доза PR006A в модели на старых мышах FTD-GRN (PRV-2018-027 и PRV-2019-002)

[331] Как часть этих исследований эффективности на мышах с КО *Grn* проводили нейропатологические оценки у мышей, обработанных ICV вспомогательным веществом либо с помощью PR006A. Мыши с КО *Grn* характеризуются полной потерей програнулина, и их широко применяют в качестве моделей FTD-GRN вследствие их зависимых от возраста фенотипов, которые включают лизосомальные изменения, нейрональное накопление липофусцина, микроглиоз и нейровоспаление. Аспекты фармакологических частей исследования обобщены в разделах выше, тогда как конечные точки, связанные с токсикологией, оцененные в этом исследовании, обобщены ниже. Два исследования PR006A проводили в модели на старых мышах с КО *Grn*. В первом исследовании (PRV-2018-027) 9 мышей разного пола с КО *Grn* в возрасте 16 месяцев получали ICV введение PR006A либо вспомогательного вещества. Животных умерщвляли через 9 недель после введения. В это исследование включали группу с однократной дозой PR006A: 10 мкл неразбавленного вируса для общей дозы, составляющей $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), и контрольную группу обрабатывали 10 мкл вспомогательного вещества.

Таблица 8. План исследования PRV-2018-027

Модель	Обработка	RoA (Объем дозы)	Доза PR006A (vg/г головного мозга)	Общая доза PR006A Доза (vg)	Число мышей	Вскрытие после обработки
КО <i>Grn</i>	Вспомога-	ICV (10 мкл)	0	0	4 (2M/2F)	9 недель

	тельное вещество					
KO <i>Grn</i>	PR006A	ICV (10 мкл)	$2,4 \times 10^{11}$	$9,7 \times 10^{10}$	5 (3M/2F)	9 недель

ROA: путь введения

[332] Различные конечные точки после смерти, такие как биораспределение, лизосомальные изменения и воспалительные маркеры, оценивали как часть этого протокола исследования (см. раздел выше). Животных также проверяли в отношении выживаемости два раза в день, и вес тела измеряли один раз в день. После эвтаназии через 2 месяца после обработки целевые ткани собирали, фиксировали каплями в охлажденном 4% параформальдегиде и хранили при 4°C. Ткани от 8 животных, которые завершили исследование, иссекали, обрабатывали и заключали в парафиновые блоки. Затем из них делали срезы толщиной ~5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и исследовали с помощью ветеринарного патологоанатома высшей категории.

[333] На протяжении исследования 1 мышь из группы обработки преждевременно умерла; никаких аномалий у умершего животного при вскрытии не регистрировали и, следовательно, причина смерти неизвестна. Никаких других смертей или аномалий не наблюдали. Все группы обработки отслеживались аналогичным образом с точки зрения веса тела без наличия значимых различий.

[334] При гистопатологическом исследовании не выявили нежелательных результатов, связанных с PR006A. В головном мозге наблюдали обширное накопление липофусцина, соответствующее ожидаемым результатам у мышей с KO *Grn*. У животных, обработанных с помощью PR006A, не наблюдали снижения балла тяжести в отношении накопления липофусцина во всех областях головного мозга. Морфологические изменения также, по-видимому, демонстрировали небольшое снижение баллов частоты и/или тяжести, в частности в отношении нейронального некроза в продолговатом мозге и мосте при обработке с помощью PR006A. Однако эти тенденции в морфологических изменениях не являлись такими последовательными, как в баллах липофусцина.

[335] В грудном отделе спинного мозга не наблюдали аксональной дегенерации и очень редко (у 1 из 4 животных в каждой группе) наблюдали минимальный нейрональный некроз. Наблюдали незначительное снижение как

частоты, так и тяжести аксональной дегенерации у животных, обработанных с помощью PR006A.

[336] Следующие результаты, которые предположительно связаны с мышами гомозиготными по нокаутированному гену *Grn*, по-видимому, имели меньшую частоту и/или тяжесть у животных, обработанных с помощью PR006A: расширенные каналы в мозговом веществе почек, гломерулопатия почки и инородный материал в легком (характеризуются как линейные, бесклеточные, темно-розовые структуры, обычно в дыхательных путях и часто ассоциированные с гигантскими клетками инородных тел и/или макрофагами). Более крупная когорта животных может быть необходима для более определенных заключений.

[337] Все другие наблюдаемые гистопатологические результаты считались случайными и/или характеризовались аналогичной частотой возникновения и тяжестью у животных, обработанных вспомогательным веществом и обработанных тестируемым изделием и, следовательно, считались не связанными с введением PR006A.

[338] Во втором исследовании (PRV-2019-002) 5 мышей разного пола с КО *Grn* в возрасте 14 месяцев получали ICV введение PR006A либо вспомогательного вещества. Животных умерщвляли через 8 недель после введения. В это исследование включали группу с однократной дозой PR006A: 10 мкл неразбавленного вируса для общей дозы, составляющей $9,7 \times 10^{10}$ vg ($2,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), и контрольную группу обрабатывали 10 мкл вспомогательного вещества.

Таблица 9. План исследования PRV-2019-002

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

*Результаты генотипирования в конце исследования подтвердили, что n=1 животное из группы вспомогательного вещества являлось гетерозиготным по КО *Grn* вместо ожидаемого гомозиготного по КО *Grn*.

[339] Животных анализировали идентичным образом для исследования PRV-2018-027. Животных проверяли в отношении выживаемости два раза в день, и вес тела измеряли один раз в день. После эвтаназии через 2 месяца после обработки целевые ткани собирали, фиксировали каплями в охлажденном 4% параформальдегиде и хранили при 4°C до оценки.

[340] В ЦНС результаты, соответствующие ранее наблюдаемым у мыши с КО *Grn*, наблюдали в головном мозге (Yin et al., *J Exp Med* 207(1):117-128 (2010)). В частности, наблюдали обширное повышение накопления липофусцина во всем головном мозге. Также редко наблюдали минимальный нейрональный некроз (у одного необработанного животного с ранней смертью и у одного животного, обработанного вспомогательным веществом).

[341] Вследствие малого количества образцов было невозможно демонстрировать последовательную тенденцию в результатах, связанных с обработкой. Не существовало существенного различия в ответе между тестируемым изделием (PR006A) и вспомогательным веществом.

[342] Для тканей, отличных от ЦНС, результаты, которые считали соответствующими фенотипу мыши с КО *Grn*, наблюдали в почке (тубулярная дилатация и инфильтраты мононуклеарных воспалительных клеток) и печени (вакуолизация клеток Купфера/клеток синусоидальной выстилки и микрогранулемы клеток Купфера) (Yin et al., *J Exp Med* 207(1):117-128 (2010)).

[343] Выявляли результат «гломерулопатии», наблюдаемый у всех животных, которые подверглись хирургическому вмешательству и были включены в исследование. Хотя опубликованные отчеты об этом результате как об изменении, ассоциированном со стандартными, не подвергнутыми испытанию мышами с нокаутированным геном *Grn*, не обнаружили, одно исследование демонстрировало мышей с дефицитом програнулина, обработанных рационом, который индуцирует гипергомоцистеинемию, развитие утолщения базальной мембраны клубочков и сглаживание ножки подоцитов (Fu et al., *Hypertension* 69(2):259-266 (2017)).

[344] Все другие результаты являлись соответствующими результатам, обычно наблюдаемым у лабораторных мышей. Вследствие низкого количества образцов невозможно было показать никакой решающей разницы, связанной с обработкой.

Исследование с подбором дозы PR006A в модели на взрослых мышах с FTD-GRN (PRV-2019-004)

[345] Для дополнительной оценки безопасности PR006A проводили более крупное исследование для определения диапазона доз на взрослых мышах с КО *Grn*. В общей сложности 40 мышей разного пола разделяли на 4 группы и им вводили либо вспомогательное вещество, либо одну из трех доз PR006A путем однократной односторонней ICV инъекции в левое полушарие; все животные, независимо от группы обработки, получали общий объем дозы, составляющий 10 мкл. Мышей обрабатывали в возрасте 4 месяцев и подвергали эвтаназии через 3 месяца после обработки. Дополнительную контрольную группу дикого типа (WT), которая включала необработанных мышей C57BL/6J (та же линия генетического окружения) в возрасте до примерно 7 месяцев, также подвергали эвтаназии и подвергали аналогичному вскрытию.

[346] Исследование проводили в соответствии с планом исследования ниже.

Таблица 10. План исследования PRV-2019-004

Группа	Модель	Обработка	RoA (Объем дозы)	Доза PR006A (vg/г головного мозга)	Общая доза PR006A (vg)	Число мышей	Вскрытие после обработки
1	КО <i>Grn</i>	Вспомога- тельное вещество	ICV (10 мкл)	0	0	10 (4М/6F)	Неделя 13
2	КО <i>Grn</i>	PR006A	ICV (10 мкл)	$2,7 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{11}$	10 (4М/6F)	Неделя 13
3	КО <i>Grn</i>	PR006A	ICV (10 мкл)	$2,7 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$	10 (4М/6F)	Неделя 13
4	КО <i>Grn</i>	PR006A	ICV (10 мкл)	$2,7 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	10 (4М/6F)	Неделя 13
Н/д	WT (C57BL/6J)	Отсутствует	Н/д	0	0	10 (5М/5F)	Н/д

[347] На протяжении исследования животных проверяли в отношении выживаемости два раза в день и взвешивали один раз в неделю. Мышей подвергали эвтаназии через 3 месяца после обработки и проводили различные оценки после смерти для оценки эффективности PR006A (см. раздел ниже). Кроме того, срезы,

окрашенные с помощью Н&Е, из головного мозга, грудного отдела спинного мозга, печени, сердца, селезенки, легкого, почки и гонад оценивали с помощью патологоанатома высшей категории.

[348] На гистопатологическом исследовании не выявили нежелательных результатов, связанных с PR006A, ни у одной из мышей, независимо от группы обработки.

[349] Наблюдались результаты, соответствующие фенотипу мышинной модели с КО *Grn*, такие как накопление внутриклеточного липофусцина в различных областях головного мозга: коре головного мозга, ядрах головного мозга, гиппокампе, таламусе/гипоталамусе, мозжечке и стволе головного мозга (в частности мосте и продолговатом мозге). Явного доказательства морфологических изменений на срезах, окрашенных Н&Е (вакуолизации нейронов и глиоза), не наблюдали. Накопление пигмента липофусцина может предшествовать легко выявляемым морфологическим изменениям и, следовательно, служит адекватным биомаркером эффективности. Хотя все группы, гомозиготные по нокаутированному гену *Grn*, демонстрировали накопление липофусцина, выявлялись различия в тяжести этого результата в группах обработки. Частота более высоких баллов для накопления липофусцина являлась самой высокой для группы животных, обработанной вспомогательным веществом (группа 1). Из тех животных, которые были обработаны с помощью PR006A, частота более высоких баллов наблюдалась в группе 4 (низкая доза PR006A; $2,7 \times 10^9$ vg/г головного мозга), за которой следовала группа 3 (средняя доза PR006A; $2,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга). Самые низкие баллы тяжести наблюдали в группе 2 (высокая доза PR006A; $2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга). Эти результаты демонстрируют дозозависимое снижение баллов тяжести внутриклеточного накопления липофусцина в головном мозге мышей, гомозиготных по нокаутированному гену *Grn*. Все другие наблюдаемые результаты считались случайными и/или характеризовались аналогичной частотой возникновения и тяжестью у животных, обработанных вспомогательным веществом и обработанных тестируемым изделием и, следовательно, считались не связанными с введением PR006A.

Исследование однократного введения дозы согласно GLP у обезьян (PRV-2018-028)

План исследования

[350] Целью данного исследования согласно GLP являлось оценивание токсичности и биораспределения тестируемого изделия, PR006A, при однократном введении посредством ICM инъекции у яванских макаков с периодом наблюдения, составляющим 6 дней, 29 дней или 182 дня после введения; животных умерщвляли в день 7, день 30 или день 183 исследования. Исследование разработали для оценки 2 уровней доз: самая высокая доза представляет собой максимально достижимую дозу, достижимую с объемом 1,2 мл (самый высокий объем, с которым был опыт введения) неразбавленного PR006A, и более низкая доза, которая является эквивалентной значению на одну логарифмическую единицу ниже, чем высокая доза. Дозы приравниваются к низкой дозе, составляющей $4,8 \times 10^{11}$ vg, и высокой дозе, составляющей $4,8 \times 10^{12}$ vg; с оценкой веса головного мозга, составляющей 74 г, у яванского макака — вида NHP, используемого в этом исследовании, это соответствует примерно $6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга и $6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга. Исследование также включает контрольную исследуемую группу, в которой животные получают только 1,2 мл вспомогательного вещества (20 mM Tris, pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ + 0,001% [вес/об.] Pluronic F68). В данном исследовании использовались как самцы, так и самки яванских макаков. Группа дня 7 включала 1 самку, получавшую самую высокую дозу, и была разработана в качестве контрольного показателя для ранней токсичности; оставшиеся два момента времени (день 30 и день 183) включали 2 самцов и 1 самку при каждой дозе. В дополнение к образцам из нескольких областей головного мозга собирали образцы периферических тканей для анализа посредством qPCR. Все образцы, которые были положительными согласно qPCR, проанализировали в отношении экспрессии трансгена. Сведенное в таблицу краткое описание плана данного исследования представлено в таблице 11.

Таблица 11. Обзор исследования PRV-2018-028 у NHP согласно GLP

Цель	Оценить переносимость и биораспределение PR006A у NHP
Соответствие нормативным требованиям	GLP
Тестируемый препарат	PR006A
Общее число животных	19 яванских макаков
Вес (возраст)	2—5 кг (25—50 месяцев)

План исследования	Распределения по группам				
	Группа	Доза (vg/г головного мозга)	Число животных		
			Вскрытие (день 7)	Вскрытие (день 30)	Вскрытие (день 183)
	1	0	0	2M/1F	2M/1F
	2	$6,5 \times 10^9$	0	2M/1F	2M/1F
	3	$6,5 \times 10^{10}$	1F	2M/1F	2M/1F
Путь введения доз и частота	Инъекция в большую цистерну с применением полипропиленового шприца объемом 1-3 куб. см и спинальной иглы (Pencan 25 G x 2,5 см BBraun); однократная медленная болюсная инъекция с максимальной скоростью, составляющей 0,5 куб. см/мин.				
Составы	Раствор для введения доз поставлялся при концентрации, составляющей $4,01 \times 10^{12}$ vg/мл.				
Клинические признаки	Ежедневно (в том числе потребление пищи); подробные наблюдения еженедельно				
Значения веса тела	Еженедельно				
Неврологические, офтальмологические, ECG обследования	Однократно перед введением дозы и в течение недель 2 и 26				
Клиническое патологическое исследование	Все группы: гематологическое исследование, клиническое биохимическое исследование, параметры коагуляции				
Гематологическое исследование	количество эритроцитов гемоглобин гематокрит средний корпускулярный уровень гемоглобина средняя корпускулярная концентрация гемоглобина ретикулоцитов абсолютное количество эозинофилов видов лейкоцитов абсолютное количество базофилов средний корпускулярный объем количество тромбоцитов количество лейкоцитов абсолютное количество нейтрофилов абсолютное количество лимфоцитов абсолютное количество моноцитов абсолютное количество количество отдельных мазок крови				
Клиническое биохимическое исследование	глюкоза азот мочевины креатинин общий белок альбумин Глобулин альбумин/глобулин холестерин общий билирубин креатинкиназа аланинаминотрансфераза щелочная фосфатаза гамма-глутамилтрансфераза аспартатаминотрансфераза кальций неорганический фосфор натрий калий хлорид триглицериды соотношение				

Коагуляция	протромбиновое время фибриноген активированное частичное тромбопластиновое время			
Выделение векторов (моча/фекалии)	При умерщвлении			
Вскрытие	День 7, день 30, день 183			
Сохранение тканей для гистопатологического анализа	Следующие ткани от каждого животного будут собирать в 10% нейтральном забуференном формалине (если не указано иное) или регистрировать как отсутствующие, если применимо.			
Сохранение тканей, продолжение	Надпочечник ^a Аорта Кость, бедренная кость с костным мозгом Кость, грудина с костным мозгом Головной мозг ^a Слепая кишка Шейка матки Ободочная кишка Двенадцатиперстная кишка Эпидидимис ^a Пищевод Глаз ^b Желчный пузырь GALT (Пейерова бляшка) Сердце ^a Подвздошная кишка	Место инъекции (покрывающая кожа) Тошная кишка Почка ^a Очаги поражения Печень ^a Легкое с крупными бронхами Лимфатический узел (нижнечелюстной) Лимфатический узел (мезентериальный) Молочная железа Мышца, двуглавая бедра Зрительный нерв Яичник ^a Яйцеводы Поджелудочная железа Питуитарная железа ^a Предстательная железа ^a	Прямая кишка Слюнная железа Седалищный нерв Семенные пузырьки ^a Кожа/подкожная клетчатка Спинной мозг (шейный, грудной, поясничные отделы) Селезенка ^a Желудок Яичко ^a Тимус ^a Щитовидная железа с парашитовидными железами ^a Язык Трахея Мочевой пузырь Матка ^a Влагалище	
	^a Органы (при наличии) будут взвешивать или отмечать как отсутствующие; ^b Собирали в модифицированном фиксаторе Дэвидсона и хранили в 10% нейтральном забуференном формалине			
Гистопатологическое исследование	Все группы – все ткани			
Биораспределение	Следующие ткани/биологические жидкости будут анализировать в отношении биораспределения посредством qPCR: Лобная кора Гиппокамп Вентральная область среднего мозга Перивентрикулярное серое			Печень DRG (шейный отдел) DRG (грудной отдел) DRG (поясничный отдел) Спинной мозг (грудной отдел)

	вещество	Спинной мозг (поясничный отдел)
	Скорлупа	Спинной мозг (шейный отдел)
	Яичко	Селезенка
	Яичник	Сердце (верхушка)
	Почка	CSF
	Желудок (привратник)	
	Кровь	
	Легкое	
Трансгенная экспрессия	Все образцы, которые являются положительными согласно qPCR, будут оценивать в отношении экспрессии програнулина.	

Сокращения: F - самка; ICM - в большую цистерну; M - самец; MgCl₂ - хлорид магния; NaCl - хлорид магния; vg - геном(геномы) векторов; DRG - ганглии задних корешков; GALT - лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником.

[351] NHP на примере яванских макаков оценивали путем многочисленных наблюдений и измерений в течение жизни, в том числе смертности/заболеваемости (ежедневно), клинических наблюдений (ежедневно), веса тела (на исходном уровне и еженедельно после этого), визуального осмотра потребления пищи (ежедневно), неврологических наблюдений (на исходном уровне и в течение недель 2 и 26), не прямой офтальмоскопии (на исходном уровне и в течение недель 2 и 26) и электрокардиографического измерения (ECG) (на исходном уровне и в течение недель 2 и 26).

[352] Анализ нейтрализующих антител (nAb) к капсиду AAV9 проводили на исходном уровне и при умерщвлении в дни 7, 30 или 183. Клиническое патологическое исследование, состоящее из гематологического исследования, анализа коагуляции, клинического биохимического исследования и анализа мочи, выполняли дважды на исходном уровне (анализы крови; один раз для анализа мочи) и один раз в течение недель 1 и 13 фазы введения доз.

[353] Животных подвергали эвтаназии, и ткани собирали в день 7, день 30 или день 183. Ткани, изложенные в таблице 11, если присутствуют, собирали у всех животных, взвешивали (если применимо) и разделяли на повторности. Одну повторность сохраняли в 10% нейтральном забуференном формалине (за исключением случаев, когда для оптимальной фиксации требуются специальные фиксаторы) для гистопатологической оценки (всех животных). Собирали дополнительные повторности для qPCR и анализа экспрессии трансгена.

Незапланированных смертей не было, и все животные дожили до запланированного вскрытия. Не было никаких нежелательных клинических наблюдений, связанных с PR006A, изменений веса тела, офтальмологических наблюдений или результатов физического или неврологического обследования; макроскопическое исследование при вскрытии не выявило аномалий, связанных с приемом лекарственных средств, ни в одной из когорт. Кроме того, никакие связанные с PR006A изменения в интервале PR, продолжительности QRS, интервале QT, скорректированном интервале QT (QTc) или частоте сердечных сокращений не наблюдали у самцов или представителей обоих полов, которым вводили $6,5 \times 10^9$ или $6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга. Никаких аномальных форм волн или аритмий ECG не наблюдали в ходе количественной оценки ECG.

Биораспределение

[354] Анализ биораспределения трансгена PR006A проводили с применением анализа на основе qPCR. В день 183 в группе с высокой дозой ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) наблюдали обширную трансдукцию во всей ЦНС и периферии, при этом все ткани являлись положительными в отношении присутствия вектора при пороге отсечения, составляющем 50 vg/мкг ДНК — нижний предел количественного определения для анализа qPCR. Данные из выбранных репрезентативных областей из дня 183 показаны на фиг. 54А; данные дня 30 не показаны. В день 30 в группе с высокой дозой ($6,5 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) все исследуемые ткани ЦНС являлись положительными в отношении трансдукции, за исключением скорлупы. Ткани от животных, обработанных с помощью низкой дозы ($6,5 \times 10^9$ vg/г головного мозга), являлись положительными в ЦНС в день 183, но только селезенка и печень являлись положительными из периферических тканей. Кроме того, одна самка NHP, обработанная с помощью высокой дозы PR006A, являлась положительной в яичниках в день 7 и самец, обработанный с помощью высокой дозы, являлся положительным в яичках в день 30 и день 183. Трансдукция PR006A являлась наиболее устойчивой в печени и тканях нервной системы и неизменно более низкой в других исследуемых периферических органах. В головном мозге трансдукция вектора стабилизировалась в день 183 по сравнению с днем 30, демонстрируя устойчивую и продолжительную трансдукцию трансгена.

[355] У NHP, получающих ICM введение PR006A, наблюдался значительный аллогенный иммунный ответ на трансгенный продукт програнулин с антителами к програнулину, выявленными в образцах сыворотки крови и CSF, собранных в день 30 и 183 после обработки; иммунный ответ указывает на то, что белок програнулин человека экспрессировался у NHP. Уровень антител к лекарственному средству определяли с применением установленных технологий иммуноанализа. Данные проиллюстрированы на фиг. 54B.

[356] Экспрессию PR006A (*GRN*) измеряли на уровне мРНК с применением анализа на основе RT-qPCR и на уровне белка с применением анализа Simple Western™ (Jess). Одновременно с уровнями трансдукции PR006A экспрессию трансгена наблюдали с помощью измерений мРНК с применением RT-qPCR в выбранных областях головного мозга (фиг. 54C), печени, гонадах, спинном мозге и DRG, собранных в день 183.

[357] Экспрессия трансгена являлась измеримой в головном мозге и печени при обеих дозах PR006A, и уровни экспрессии являлись дозозависимыми и продолжительными. В гонадах экспрессия являлась измеримой у самцов только при высокой дозе; при обеих дозах у самок экспрессия являлась измеримой в день 7 и день 30, но не в день 183.

[358] Для подтверждения того, что програнулин человека продуцировался у обработанных NHP, уровни белка в CSF оценивали на платформе Simple Western™ (Jess) Simple Western™ (Jess). Детали способа представлены в примере 14. Способ квалифицировали посредством измерения уровней в образцах CSF от пациентов с FTD-GRN и установления того, что они составляют примерно половину уровней, измеренных в образцах CSF от контрольных здоровых людей и от пациентов с FTD без мутации *GRN*. Результаты из CSF указывают на то, что уровни програнулина повышены дозозависимым образом в животных, обработанных с помощью как низкой, так и высокой доз PR006A (фиг. 54D). Эти результаты указывают на то, что эффективная и обширная трансдукция PR006A в NHP после ICM введения приводит к повышенным уровням програнулина.

[359] Измерения белка програнулина сосредоточены на CSF, поскольку анализ Simple Western™ (Jess) не является подходящим для измерения уровней

програнулина в ткани головного мозга вследствие высокого уровня неспецифических фоновых полос. Доступные в настоящее время анализы надежно не измеряют уровни програнулина человека, полученного из трансгенов, в тканях NHP вследствие высоких уровней неспецифического фона. Обычно считается, что уровни CSF отражают релевантные концентрации головного мозга и они представляют особую ценность в качестве трансляционных биомаркеров для клинических исследований.

Сводная информация

[360] Ни в одном из неклинических исследований, в том числе в небольшом пилотном исследовании, отличном от исследования GLP на NHP, и исследовании GLP на NHP до дня 183, не выявили нежелательных последствий для безопасности или опасений по поводу токсичности, что препятствует началу клинического исследования. Патологические результаты в исследовании GLP постоянно являлись минимальными по степени тяжести с небольшим числом пораженных клеток в обеих дозовых группах. Других нежелательных результатов, связанных с PR006A, при жизни или после смерти не выявили.

Испытание фазы 1/2 у субъектов-людей с FTD-GRN

[361] Субъекты-люди ($n = 15$) будут включены в открытое исследование рекомбинантного AAV PR006. Критерии включения субъекта включают: возраст 30-80 лет (включительно), характеризуется патогенной мутацией *GRN*, находится на симптоматической стадии заболевания и характеризуется стабильным применением фоновых лекарственных препаратов до введения доз исследуемого продукта. Каждый субъект получит исследуемый продукт в виде одной ICM инъекции (в большую цистерну). Испытание будет включать 3-месячное считывание биомаркеров, 12-месячное клиническое считывание, а также 5-летнее наблюдение в отношении безопасности и последующее клиническое наблюдение. Испытание будет анализировать: (1) безопасность и переносимость; (2) ключевые биомаркеры, в том числе програнулин, NfL (легкие цепи нейрофиламентов) и волуметрическую MRI (магнитно-резонансную томографию); и (3) эффективность: показатели поведения, познавательной способности, речи, функционирования и QoL (качества жизни) согласно CDR и NACC FTLD (клинической оценке деменции и оценке лобно-

височной деменции от Национального координационного центра по изучению болезни Альцгеймера).

Таблица 12. Примеры нейродегенеративных заболеваний

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

Таблица 13. Примеры синуклеинопатий

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

Таблица 14. Примеры таупатий

Заболевание	Ассоциированные гены
Болезнь Альцгеймера	<i>APP, PSEN1, PSEN2, APOE</i>
Первичная возрастная таупатия	<i>MAPT</i>
Прогрессирующий надъядерный паралич	<i>MAPT</i>

Кортикобазальная дегенерация	<i>MAPT, GRN, C9orf72, VCP, CHMP2B, TARDBP, FUS</i>
Лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17	<i>MAPT</i>
Подострый склерозирующий панэнцефалит	<i>SCN1A</i>
Болезнь Литико-Бодига	
Гангиоглиома, ганглиоцитомы	
Менингиоангиоматоз	
Постэнцефалитический паркинсонизм	
Хроническая травматическая энцефалопатия	

Таблица 15. Примеры лизосомных болезней накопления

Заболевание	Ассоциированные гены
Болезнь Ниманна-Пика	<i>NPC1, NPC2, SMPD1</i>
Болезнь Фабри	<i>GLA</i>
Болезнь Краббе	<i>GALC</i>
Болезнь Гоше	<i>GBA</i>
Болезнь Тея-Сакса	<i>HEXA</i>
Метахроматическая лейкодистрофия	<i>ARSA, PSAP</i>
Болезнь Фарбера	<i>ASAHI</i>
Галактосиалидоз	<i>CTSA</i>
Болезнь Шиндлера	<i>NAGA</i>
Ганглиозидоз GM1	<i>GLB1</i>
Ганглиозидоз GM2	<i>GM2A</i>
Болезнь Сандхоффа	<i>HEXB</i>
Дефицит лизосомальной кислой липазы	<i>LIPA</i>
Множественная сульфатазная недостаточность	<i>SUMF1</i>
Мукополисахаридоз I типа	<i>IDUA</i>
Мукополисахаридоз II типа	<i>IDS</i>
Мукополисахаридоз III типа	<i>GNS, HGSNAT, NAGLU, SGSH</i>
Мукополисахаридоз IV типа	<i>GALNS, GLB1</i>
Мукополисахаридоз VI типа	<i>ARSB</i>
Мукополисахаридоз VII типа	<i>GUSB</i>
Мукополисахаридоз IX типа	<i>HYAL1</i>
Муколипидоз II типа	<i>GNPTAB</i>
Муколипидоз альфа/бета III типа	<i>GNPTAB</i>
Муколипидоз гамма III типа	<i>GNPTG</i>
Муколипидоз IV типа	<i>MCOLN1</i>
Нейрональный цереоидный липофусциноз	<i>PPT1, TPP1, CLN3, CLN5, CLN6, MFSD8, CLN8, CTSD, DNAJC5, CTSF, ATP13A2, GRN, KCTD7</i>
Альфа-маннозидоз	<i>MAN2B1</i>

Бета-маннозидоз	<i>MANBA</i>
Аспартилглюкозаминурия	<i>AGA</i>
Фукозидоз	<i>FUCAI</i>

Пример 14. Автоматизированный вестерн-блот-анализ для выявления програнулина в цереброспинальной жидкости

[362] Целью этого эксперимента являлось количественное определение уровней белка програнулина (PGRN) в цереброспинальной жидкости (CSF) с применением автоматизированной платформы для вестерн-блоттинга Jess от ProteinSimple (Сан-Хосе, Калифорния). Этот тестовый способ можно применять для анализа образцов CSF примата, отличного от человека (NHP). Для определения уровней экспрессии белка програнулина человека, трансгенного продукта PR006A, образцы CSF из субъектов приматов, отличных от человека, анализировали на платформе Simple Western™ (Jess) с применением антитела, которое позволяет специфично выявлять белок програнулин человека. Платформа Simple Western™ представляет собой капиллярную платформу для автоматизированного иммуноанализа методом вестерн-блоттинга, где все стадии, включая разделение белков, их иммунозондирование, промывание и выявление с помощью хемилюминесценции, происходят в капиллярном картридже. Образцы (при 4-кратном разведении) и первичное антитело к програнулину человека (AdipoGen PG-359-7, при 10-кратном разведении) в дополнение к вторичным антителам и всем буферам, произведенным ProteinSimple, загружали на индивидуальный картридж, который запускали на платформе Jess. Полуколичественный анализ данных выполняли автоматически после завершения каждого прогона, где параметры, такие как интенсивность сигнала, площадь пика и отношение сигнала к шуму, рассчитывали с применением прибора Jess. Для каждого отдельного образца уровень програнулина измеряли как площадь пика иммунореактивности к антителу. Все анализы проводили с образцами в слепом режиме.

[363] Анализ, описанный в данном документе, проводили на образцах CSF из исследования на животных-приматах, отличных от человека. Образцы CSF тестировали в отношении присутствия или уровней белка програнулина для исследования эффективности генной терапии с применением конструкции rAAV

(PR006; см. фиг. 64), кодирующей белок програнулин (PGRN). В данном исследовании вспомогательное вещество либо PR006 доставляли при низкой дозе PR006 ($1,8 \times 10^{10}$ vg/г веса головного мозга) или высокой дозе PR006 ($1,8 \times 10^{11}$ vg/г веса головного мозга) посредством инъекции в большую цистерну (ICM) животным NHP. Каждая группа состояла из 3 животных. Девять животных NHP умерщвляли в день 180 после инфицирования (таблица 16), и образцы CSF анализировали с применением анализа на основе Jess.

Таблица 16. Сводная информация о животных NHP с разделением на группы и введением доз

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

Таблица 17. Материалы для автоматизированного анализа методом вестерн-блоттинга

Описание материала	Производитель	Номер элемента
Сепарационный модуль Jess на 12-230 кДа, 25 капиллярных картриджей	ProteinSimple	SM-W004
EZ Standard Pack 1, 12-230 кДа	ProteinSimple	PS-ST01EZ-8
Модуль выявления антител к белкам мыши для Jess	ProteinSimple	DM-002
Моноклональное антитело к програнулину (человек), клон PG359-7 (первичное антитело)	AdipoGen	AG-20A-0052-C100

Примечание: все реагенты необходимо нагревать до комнатной температуры до открытия флаконов.

[364] При выполнении этого способа соблюдали следующие процедуры.

Получение исходных растворов.

1. Получали 400 мМ раствора DTT путем добавления 40 мкл воды в чистую пробирку в сепарационном модуле EZ Standard Pack. Аккуратно перемешивали.

2. Для получения мастер-микса добавляли 20 мкл 10X буфера для образца и 20 мкл 400 мМ DTT в розовую пробирку для мастер-микса EZ. Аккуратно перемешивали.

3. Для получения биотинилированного лэддера вносили пипеткой 20 мкл воды в чистую пробирку для биотинилированного лэддера с помощью розовой пеллеты. Аккуратно перемешивали.

4. Получали смесь люминола и пероксида путем добавления равного количества каждого. Для одного прогона добавляли 200 мкл люминола к 200 мкл пероксида.

5. Получали разведение первичного антитела (10-кратное разведение) путем смешивания 25 мкл первичного антитела и 225 мкл разбавителя антитела 2.

Получение образцов

1. Образцы разбавляли в 0,1X буфера для образца. Получали 0,1X буфер для образца путем добавления 10 мкл 10X буфера для образца в 990 мкл воды.

2. Разбавляли образцы при необходимости. Например, образцы CSF NHP разбавляли в 4 раза до добавления мастер-микса. Добавляли 5 мкл CSF NHP к 15 мкл 0,1X буфера для образца.

3. Получали образцы путем добавления 1X мастер-микса к 4X образца. Для прогона двух технических повторностей получали в общей сложности 15 мкл образца и мастер-микса на образец. Например, добавляли 3 мкл мастер-микса к 12 мкл разбавленного образца. Аккуратно перемешивали.

4. Кипятили образцы при 95°C в течение 5 минут.

5. Кратковременно центрифугировали образцы с помощью настольной мини-центрифуги. Перемешивали в вортексе перед загрузкой образца.

Загрузка реагентов и образцов в картридж.

1. Вносили пипеткой все образцы в соответствии с картой картриджа.

a. Вносили пипеткой 15 мкл смеси люминол+пероксид в каждую лунку в дорожке E.

b. Вносили пипеткой 10 мкл стрептавидина в первую лунку в дорожке D.

- c. Вносили пипеткой 10 мкл вторичного антитела в оставшиеся 24 лунки в дорожке D.
 - d. Вносили пипеткой 10 мкл разбавленного антитела в первую лунку в дорожке C.
 - e. Вносили пипеткой 10 мкл разбавленного первичного антитела в оставшиеся 24 лунки в дорожке C.
 - f. Вносили пипеткой 10 мкл разбавителя для антитела во все лунки в дорожке B.
 - g. Вносили пипеткой 10 мкл приготовленного лэддера EZ в первую лунку в дорожке A.
 - h. Вносили пипеткой 5 мкл образца и раствора мастер-микса для двух повторностей дорожек в дорожке A.
2. Центрифугировали содержимое картриджа при комнатной температуре при 2500 об./мин в течение 5 минут.

Загрузка капилляров и образцов в прибор.

- 1. Загружали капилляры в слот. Убеждались, что индикатор становится голубым.
- 2. Загружали картридж после центрифугирования в прибор.
- 3. Нажимали кнопку старта после того, как голубой индикатор перестанет мигать на приборе.

[365] Пригодность системы для анализа считалось приемлемым, если процент CV (коэффициент дисперсии) для двух повторностей составлял $\leq 30\%$.

[366] Перед тем, как анализ применяли для выявления програнулина в образцах CSF NHP, анализ тестировали следующим образом. Квалификация анализов Jess включала оценку линейности разведения, селективность и специфичность. Нормальные образцы CSF из BioIVT применяли для определения линейности разведения в анализе Jess. Образцы CSF от пациентов с лобно-височной деменцией (FTD) с мутацией PGRN (полученные из Национального централизованного репозитория для болезни Альцгеймера и связанных с ней деменций (NCRAD;

Индианаполис, Индиана)) применяли для определения селективности и специфичности анализа Jess.

Таблица 18. Обобщенные результаты

	Элементы	Критерии приемлемости	Результаты
Линейность разведения	- Исследование эндогенных уровней PGRN в не подвергавшихся воздействию образцах CSF (BioIVT). - Проведение анализа холостого образца в матрице. - Минимальное требуемое разведение (MRD) определяется посредством разбавления чистой матрицы в 2-кратном серийном разведении. - Если эндогенные уровни PGRN являются слишком низкими в матрице, разбавления будут проводить с применением матрицы с добавлением.	- MRD определяли как самое низкое требуемое разведение, где наблюдаются линейный исходный сигнал или концентрация. В пределах линейного диапазона скорректированные наблюдаемые концентрации должны составлять $\pm 30\%$ от MRD.	Соответствие -Все тестируемые матрицы были приняты, имея диапазон линейного разведения с $\pm 30\%$ MRD (см. раздел «Результаты и обсуждение», <u>Линейность разведения</u>).
Селективность и специфичность	- Исследование уровней PGRN в образцах CSF пациента с FTD.	- MRD определяли посредством теста линейности разведения.	Соответствие -Все тестируемые матрицы были приняты, имея % CV технической повторности с 20% (см. раздел «Результаты и обсуждение», <u>Селективность и специфичность</u>).

Результаты и обсуждение

Линейность разведения

[367] Линейность разведения белка PGRN, выявленную посредством Jess, тестировали в образцах CSF от коммерчески доступных (BioIVT) нормальных индивидуумов. Эндогенные уровни PGRN в образцах CSF измеряли для определения линейности разведения. Двух индивидуумов тестировали в 2-кратном серийном разведении в диапазоне от 2 до 64-кратного разведения.

[368] В таблице 19 сообщалось о площади пика белка PGRN при 58 кДа, определенной посредством Jess, и % различий каждого разведения из 16-кратного разведения. Результаты в диапазоне линейности выделены жирным шрифтом (разница $100 \pm 30\%$). Было установлено, что линейность разведения находится в пределах от 4- до 16-кратного разведения.

Таблица 19. Линейность разведения в образцах CSF

	CSF № 1		CSF № 2	
Коэффициент разведения	Площадь пика при 58 кДа (с поправкой на разведение)	% разницы	Площадь пика при 58 кДа (с поправкой на разведение)	% разницы
1:2	3915099	-41,2	6392991	-38,8
1:4	6040885	-9,2	8020821	-23,2
1:8	5773987	-13,3	12615004	20,8
1:16	6656474	0,0	10446186	0,0
1:32	8911479	33,9	11782404	12,8
1:64	12056943	81,1	6795118	-35,0

[369] Таким образом, все тестируемые матрицы характеризовались приемлемым линейным диапазоном, соответствующим критериям приемлемости % разницы, которая составляет $0 \pm 30\%$, хотя размер диапазона и величина разведения варьировались между матрицами. Линейность MRD образца устанавливали в пределах 4-кратного разведения. Линейность разведения устанавливали в пределах от 4- до 16-кратного разведения. Обобщенные данные MRD и диапазона линейного разведения, которые соответствуют критериям приемлемости для CSF, представлены в таблице 20.

Таблица 20. MRD и диапазон линейного разведения CSF

Ткань	Линейность MRD	Диапазон линейного разведения
CSF	1:4	1:4 - 1:16

Селективность и специфичность

[370] Селективность и специфичность белка PGRN, выявленного посредством Jess, тестировали в образцах CSF из образцов пациента с FTD PR006 из NCRAD. Три группы (группа А, В и С) образцов CSF собирали от гетерозиготных пациентов с FTD (группа А), семейных не являющихся носителями (группа В или С) и нормальных индивидуумов (группа В или С). Шесть образцов анализировали для каждой группы. Группы образцов перечислены в таблице 16 «Информация об образцах CSF пациентов с FTD».

[371] Образцы CSF разбавляли в 4 раза в 0,1X буфере для образца, предоставленном ProteinSimple, и тестировали в двух технических повторностях. Образцы в двух повторностях с результатом % CV, составляющим более 20%, повторно анализировали. Результаты с % CV, составляющим менее 20%, представлены в таблице 22. В таблице 22 сообщалось о площади пика белка PGRN при 58 кДа, определенной посредством Jess, и % CV между образцами в двух повторностях. Результаты демонстрировали в приблизительно два раза более высокие уровни PGRN в группах В и С по сравнению с группой А, что указывает на селективность и специфичность анализа Jess в определении уровней PGRN для образцов CSF (фиг. 55).

Таблица 21. Информация об образцах CSF пациентов с FTD

Штрих-код	Альтернативный MRN	Визит	Номер набора	Тип образца	Название блока	Положение	Группа
0003355598	ST-20000108	Цикл 2 - CSF	257282	CSF	27488 - CSF	1	С
0004777338	ST-20000118	Цикл 2 - CSF	267633	CSF	27488 - CSF	2	С
0004777329	ST-20000306	Цикл 1 - CSF	260551	CSF	27488 - CSF	3	А
0004777326	ST-20000328	Цикл 2 - CSF	260544	CSF	27488 - CSF	4	С
0004777335	ST-20000386	Цикл 1 - CSF	267110	CSF	27488 - CSF	5	А

0004777345	ST-20000590	Цикл 2 - CSF	267859	CSF	27488 - CSF	6	B
0004777332	ST-20000621	Цикл 1 - CSF	266413	CSF	27488 - CSF	7	B
0004628923	ST-20000757	Цикл 1 - CSF	269817	CSF	27488 - CSF	8	B
0004695103	ST-20001142	Цикл 1 - CSF	308149	CSF	27488 - CSF	9	A
0004074629	ST-20000107	Цикл 2 - CSF	258212	CSF	27488 - CSF	10	C
0003358475	ST-20000110	Цикл 2 - CSF	258210	CSF	27488 - CSF	11	C
0003358463	ST-20000274	Цикл 2 - CSF	257292	CSF	27488 - CSF	12	A
0004788828	ST-20000309	Цикл 2 - CSF	303093	CSF	27488 - CSF	13	C
0003358781	ST-20000615	Цикл 1 - CSF	257278	CSF	27488 - CSF	14	B
0003358793	ST-20000616	Цикл 1 - CSF	257305	CSF	27488 - CSF	15	A
0004777321	ST-20000637	Цикл 1 - CSF	257307	CSF	27488 - CSF	16	B
0004777341	ST-20000768	Цикл 1 - CSF	267857	CSF	27488 - CSF	17	B
0004695106	ST-20001165	Цикл 1 - CSF	317396	CSF	27488 - CSF	18	A

Таблица 22. Результаты анализа селективности и специфичности

Группы	Штрих-код образца	Площадь пика при 58 кДа (с поправкой на разведение)	% CV
Группа (А) Гетерозиготные пациенты с FTD	0004777329	2838645	5,08
	0004777335	4293344	1,20
	0004695103	6738165	1,08
	0003358463	3594249	11,10
	0003358793	5992434	2,49
	0004695106	2472462	10,40
Группа (В) Нормальные или семейные не являющиеся носителями	0004777345	3836185	11,18
	0004777332	6006224	3,05
	0004628923	3758940	1,44
	0003358781	7860294	17,08
	0004777321	7187172	0,69
	0004777341	8450410	0,50
Группа (С)	0003355598	2981005	1,70

Нормальные или семейные не являющиеся носителями	0004777338	6803428	0,18
	0004777326	5030695	3,56
	0004074629	5448863	3,47
	0003358475	7892529	1,17
	0004788828	6944800	1,85

[372] Образцы CSF из исследования пациентов с FTD (таблица 21) также анализировали с помощью набора для ELISA PGRN человека (AdipoGen, AG-45A-0018YEK-KI01). Результаты из ELISA (фиг. 56) демонстрировали аналогичные Jess тенденции для уровней PGRN между группами и демонстрировали, что анализ Jess является подходящим для применения для оценки уровней PGRN в образцах CSF.

[373] В заключение, этот автоматизированный анализ методом вестерн-блоттинга Jess от ProteinSimple был признан подходящим для применения для оценки уровней PGRN в образцах CSF NHP.

[374] Данные Jess для образцов CSF NHP показаны в таблице 23. Каждый образец представляет собой среднее значение для двух технических повторностей. Сообщается о площади пика для полосы 58 кДа в дорожке с образцом. Данные представлены как средняя площадь пика в технической повторности с поправкой на кратность разведения.

Таблица 23. Данные Jess для образцов CSF NHP

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

[375] Целью данного исследования являлось подтверждение уровней экспрессии уровня белка програнулина (PGRN) после трансдукции PR006 в областях ткани, представляющих интерес, для исследования на NHP. Это выполняли с применением автоматизированной платформы для вестерн-блоттинга, в которой

белок програнулин выявляли с применением моноклонального антитела. Экспрессия програнулина являлась измеримой в CSF как у контрольного NHP, так и NHP, обработанного с помощью PR006, анализ не различает эндогенный белок програнулин и белок програнулин, индуцированный PR006A.

Пример 15. Исследование фазы 1/2 для оценки безопасности и эффектов PR006A в отношении уровней програнулина и протокола иммунодепрессии у пациентов с FTD-GRN

[376] PR006A представляет собой средство экспериментальной генной терапии, в котором используется вирусный вектор на основе AAV9 для доставки ДНК, кодирующей *GRN* дикого типа, гена, кодирующего PGRN, в клетки пациента (см. фиг. 64). Пятнадцати пациентам будут вводить однократную дозу PR006A, инъецируемую субокципитально в большую цистерну процедурным врачом. Планируют три когорты с возрастающими дозами ($3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg PR006A). В каждой схеме однократную дозу rAAV (PR006A) вводят субъекту в день 0.

[377] Каждый включенный пациент должен иметь симптоматическую FTD в соответствии с оценкой поставщика медицинских услуг (bvFTD, PPA-FTD, FTD с кортикобазальным синдромом или комбинацией синдромов, позволяющих включение в исследование). Каждый включенный пациент должен иметь балл ≥ 1 и ≤ 15 в CDR с NACC FTLD SB (инструмент классификации для клинической оценки деменции с доменами лобно-височной долевого дегенерации Национального координационного центра по изучению болезни Альцгеймера). Каждый включенный пациент должен являться носителем патогенной мутации *GRN*. Патогенные мутации включают все нулевые мутации, в том числе нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания или мутации сайта сплайсинга или полную или частичную делецию (экзона) гена:

- Все ранее опубликованные патогенные мутации с подтвержденным функциональным вредным эффектом (могут быть включены выбранные миссенс-мутации при условии, что известно, что они являются патогенными)
- Все патогенные мутации, перечисленные в базе данных Molgen FTD
- Все новые мутации с низким уровнем PGRN в плазме крови (< 70 нг/мл) на основании измерений центральной лаборатории

[378] Введение иммунодепрессантов

[379] Введение кортикостероидов Пациенты будут получать нагрузочную дозу метилпреднизолона (MPS), составляющую 1000 мг IV, в импульсном режиме в день -1 (разрешается в день -1 или день 0 в зависимости от плана, принятого в исследовательском центре). См. раздел ниже в отношении информации о возможном IV введении 100 мг метилпреднизолона в период от дня -14 до дня -2 до введения ритуксимаба (RTX). Преднизон в дозе, составляющей 30 мг/день, будут вводить перорально в качестве сопутствующего лекарственного препарата, начиная со следующего дня после IV введения в импульсном режиме 1000 мг метилпреднизолона (день 0 или день 1) в течение 14 дней, и затем дозу будут постепенно снижать в течение следующих 7 дней. Более высокие дозы или более длительное постепенное снижение доз кортикостероидов могут применять по усмотрению поставщика медицинских услуг.

[380] Введение ритуксимаба Пациенты будут получать 1-кратную дозу, составляющую 1000 мг ритуксимаба IV, в любой отдельный день между днем -14 и днем -1. Чтобы снизить риск и тяжесть инфузионной реакции (IRR), ассоциированной с ритуксимабом, пациенты будут получать метилпреднизолон IV до получения ритуксимаба IV. Для введения дозы ритуксимаба в день -1 пациенты будут получать инфузию ритуксимаба через по меньшей мере 30 минут после вышеописанного IV введения в импульсном режиме 1000 мг метилпреднизолона. Для введения дозы ритуксимаба между днем -14 и днем -2 пациенты будут получать IV инфузию 100 мг метилпреднизолона за примерно 30 минут до получения ими ритуксимаба IV.

[381] Ацетаминофен и/или дифенгидрамин могут быть предоставлены дополнительно для профилактики IRR в соответствии с местной практикой и/или по усмотрению поставщика медицинских услуг.

[382] Введение сиролимуса Пациенты будут получать пероральную нагрузочную дозу сиролимуса, составляющую 6 мг, в день -1 (окно от дня -3 до дня -1). Последующую пероральную поддерживающую дозу сиролимуса, составляющую 2 мг/день, будут предоставлять в качестве сопутствующего лекарственного препарата, начиная с дня 0 (или на следующий день после нагрузочной дозы сиролимуса, если нагрузочная доза сиролимуса вводится в день -3 или день -2), и корректируют по мере

необходимости для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих 6 нг/мл (диапазон 4—9 нг/мл), в течение 90 дней. Затем дозу сиролимуса будут постепенно снижать в течение следующих 15—30 дней. Данные об остаточных уровнях сиролимуса будут собирать до введения дозы сиролимуса во время каждого визита. Более высокие дозы или более длительное постепенное снижение доз сиролимуса могут применять по усмотрению поставщика медицинских услуг.

[383] Критерии мониторинга иммунодепрессии В дополнение к мониторингу остаточных уровней сиролимуса будут оценивать клинический статус каждого пациента, лабораторные результаты и потенциальные побочные явления.

[384] Следует также учитывать необходимость повышения доз иммунодепрессивного средства, пролонгирования схемы постепенного снижения доз, добавления дополнительного средства или возобновления лечения на основании клинических признаков или симптомов, соответствующих иммунному ответу, в том числе:

- бессимптомного плеоцитоза с количеством лейкоцитов (WBC) $> 30 \text{ мм}^3$ и/или высоким содержанием белка в цереброспинальной жидкости (CSF) ($> 70 \text{ мг/дл}$);
- плеоцитоза в CSF и/или повышенного содержания белка, сопровождающегося клиническими симптомами (включая декомпенсацию первопричинных симптомов FTD);
- появления сенсорных симптомов на основании неврологического обследования и/или шкалы оценки нейропатии, вызванной лечением (TNAS);
- повышения уровня аланинаминотрансферазы (ALT) и/или аспартатаминотрансферазы (AST) $> 5 \times$ верхняя граница нормы (ULN) в сочетании с симптомами гепатита (*например*, желтухой, утомляемостью);
- повышения уровня ALT и/или AST $> 10 \times$ ULN независимо от наличия или отсутствия клинической симптоматики

[385] Поставщику медицинских услуг следует рассмотреть вопрос о более длительном постепенном снижении дозы преднизона в течение дополнительных 4 недель у пациентов, у которых проявляется ALT и/или AST $> 3 \times$ ULN в конце

первоначального 14-дневного постепенного снижения дозы. В случае повышения уровня AST/ALT, рефрактерного к лечению преднизонам, поставщику медицинских услуг следует обратиться за консультацией к гепатологу. При воспалительных изменениях CSF, требующих экстренной иммунодепрессии, следует провести внеплановую люмбальную пункцию через 1 и 2 месяца после возобновления иммунодепрессии/повышения дозы/введения дополнительного иммунодепрессивного средства.

[386] Процедуры перед цистернальной пункцией

[387] Пациенты будут проходить стандартные медицинские осмотры при подготовке к цистернальной пункции, включая консультацию анестезиолога. Процедурный врач и анестезиолог рассмотрят скрининговые клинические лабораторные анализы (включая документально подтвержденный отрицательный результат теста на беременность), MRI и MRA головного мозга и шейного отдела позвоночника (по запросу процедурного врача), а также результаты местной ECG. История болезни и назначенные на текущий момент и безрецептурные лекарственные препараты будут рассматриваться в отношении любых недавних изменений. По усмотрению анестезиолога могут быть проведены дополнительные клинические оценки (в зависимости от сопутствующих медицинских состояний).

[388] Интрацистернальная инъекция

[389] В день 0 процедурный врач введет PR006A в виде однократной дозы посредством субокципитальной инъекции в большую цистерну. Перед инъекцией будет удален объем интрацистернальной жидкости, эквивалентный объему вводимой дозы PR006A. Процедура будет осуществляться под общей анестезией или глубокой седацией и с применением визуализирующего контроля. Пациенты будут оставаться под наблюдением в течение 24 часов (в течение ночи пребывания в стационаре) после введения PR006A.

[390] План исследования

[391] Оно представляет собой 5-летнее исследование. На протяжении первого года пациентов будут оценивать в отношении эффекта PR006A в отношении безопасности, переносимости, иммуногенности, биомаркеров и эффективности. Пациенты будут в последующем наблюдаться в течение дополнительных 4 лет для

продолжения отслеживания параметров безопасности, выбранных биомаркеров и эффективности.

[392] Оценки эффективности

[393] Первичными целями являются оценка безопасности, переносимости и иммуногенности трех уровней доз PR006A, вводимых посредством субокципитальной инъекции в большую цистерну, и количественное определение уровней PGRN в крови и CSF.

[394] Вторичными целями являются оценка эффекта PR006A в отношении: CDR с NACC FTLD и NfL (легких цепей нейрофиламентов), уровней в крови и CSF.

[395] Поисковыми целями являются оценка эффекта PR006A в отношении: показателей познавательной способности, поведения, речи и повседневной жизни; выделения вируса; паттернов визуализации на основе vMRI и количественной оценки поражений белого вещества; а также выбранных биомаркеров нейровоспаления, астроглиальной патологии и лизосомальной функции (*например*, глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), YKL-40, бис(моноацилглицеро)фосфата (BMP)) в CSF, крови и моче.

[396] Настоящая заявка включает посредством ссылки содержания следующих документов во всей своей полноте: публикации заявки США № 2020/0332265; публикации международной заявки согласно PCT № WO 2019/070893; публикации международной заявки согласно PCT № WO 2019/070891; предварительной заявки на патент США под регистрационным номером 62/567296, поданной 3 октября 2017 г. под названием «GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS»; 62/567311, поданной 3 октября 2017 г. под названием «GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS»; 62/567319, поданной 3 октября 2017 г. под названием «GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS»; 62/567301, поданной 3 октября 2018 г. под названием «GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS»; 62/567310, поданной 3 октября 2017 г. под названием «GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS»; 62/567303, поданной 3 октября 2017 г. под названием «GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS»; и 62/567305, поданной 3 октября 2017 г. под названием «GENE THERAPIES FOR LYSOSOMAL DISORDERS».

[397] Таким образом, после описания нескольких аспектов по меньшей мере одного варианта осуществления настоящего изобретения должно быть понятно, что специалисты в данной области легко осуществляют различные изменения, модификации и усовершенствования. Предполагается, что такие изменения, модификации и усовершенствования являются частью данного раскрытия и находятся в пределах сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно, вышеприведенное описание и графические материалы приведены только в качестве примера.

[398] Хотя в данном документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалисты в данной области легко представляют себе множество других средств и/или структур для осуществления функций и/или получения результатов и/или одного или более из описанных в данном документе преимуществ, и при этом считается, что каждое из таких изменений и/или модификаций входит в объем настоящего изобретения. В более общем плане специалисты в данной области легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для иллюстрации, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых применяются идея/идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области узнают или смогут установить с применением не более чем обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Таким образом, должно быть понятно, что представленные выше варианты осуществления предусмотрены только в качестве примера и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов настоящее изобретение может быть реализовано на практике иначе, чем так, как было конкретно описано и заявлено. Настоящее изобретение относится к каждому отдельному признаку, системе, изделию, материалу и/или способу, описанным в данном документе. Кроме того, в объем настоящего изобретения включена любая комбинация из двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы и/или способы не являются взаимно несовместимыми.

[399] Формы единственного числа, используемые в данном документе в описании и в формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающие «по меньшей мере один».

[400] Фразу «и/или», используемую в данном описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую «либо один, либо оба» из элементов, соединенных таким образом, т. е. элементов, которые совместно присутствуют в одних случаях и отдельно присутствуют в других случаях. Необязательно могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно указанных в выражении «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на «А и/или В» при применении в сочетании с открытым выражением, таким как «содержащий», может относиться в одном варианте осуществления к А без В (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления к В без А (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления как к А, так и к В (необязательно включая другие элементы) и *т. д.*

[401] Как используется в данном документе в описании и в формуле изобретения, выражение «или» следует понимать как имеющее такое же значение, как и «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в перечне выражения «или» или «и/или» должны интерпретироваться как включающие, т. е. включение по меньшей мере одного, но также включение более чем одного из числа или перечня элементов и необязательно дополнительных элементов, не включенных в список. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как «только один из» или «точно один из» или, при использовании в формуле изобретения, «состоящий из», будут относиться к включению точно одного элемента из числа или перечня элементов. Как правило, термин «или», используемый в данном документе, следует толковать только как обозначающий исключаящие альтернативы (т. е. «один или другой, но не оба»), если ему предшествуют термины исключительности, такие как «любой», «один из», «только один из» или «точно один из».

[402] Как используется в данном документе в описании и в формуле изобретения, фразу «по меньшей мере один» в отношении перечня из одного или более элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент,

выбранный из любого одного или более элементов в перечне элементов, но не обязательно включающую по меньшей мере один из всех без исключения возможных элементов, конкретно указанных в перечне элементов, и не исключающую любые комбинации из элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что необязательно могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно идентифицированных в перечне элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны ли они или не связаны с этими конкретно идентифицированными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере один из А и В» (или, эквивалентно, «по меньшей мере один из А или В» или, эквивалентно, «по меньшей мере один из А и/или В») может относиться в одном варианте осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, А без присутствия В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, В без присутствия А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, А и по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, В (и необязательно включая другие элементы) и *т. д.*

[403] Использование порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и *т. д.*, в формуле изобретения для изменения элемента формулы изобретения само по себе не означает какой-либо приоритет, предшествование или порядок одного заявленного элемента перед другим или временным порядком, в котором выполняются действия способа, но они используются просто как метки, чтобы отличать один элемент пункта формулы изобретения, имеющий определенное название, от другого элемента, имеющего такое же название (за исключением использования порядкового термина), чтобы отличать элементы пунктов формулы изобретения.

[404] Следует также понимать, что если явно не указано обратное, то в любых заявленных в данном документе способах, которые включают более чем одну стадию или действие, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором перечислены стадии или действия способа.

[405] Каждый из патентов США, публикаций заявок на патент США, заявок на патент США, иностранных патентов, иностранных патентных заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящей заявке, включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

[406] В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии, кодирующая один или более продуктов генов (*например*, первый, второй и/или третий продукт гена), содержит последовательность или состоит из последовательности (или кодирует пептид, имеющий ее), изложенной под любым из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии, кодирующая один или более продуктов генов, содержит последовательность или состоит из последовательности, которая является комплементарной (*например*, комплементарной нитью) по отношению к последовательности, изложенной под любым из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии, кодирующая один или более продуктов генов, содержит последовательность или состоит из последовательности, которая является обратно комплементарной по отношению к последовательности, изложенной под любым из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления продукт гена кодируется частью (*например*, фрагментом) любого из SEQ ID NO: 1-91. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой смысловую нить нуклеиновой кислоты (*например*, нить 5'-3') или в контексте вирусных последовательностей плюс-нить (+). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой антисмысловую нить нуклеиновой кислоты (*например*, нить 5'-3') или в контексте вирусных последовательностей минус-нить (-).

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[407] Независимо от прилагаемой формулы изобретения в настоящем изобретении изложены следующие пронумерованные варианты осуществления.

[408] 1. Способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

[409] 2. Способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

[410] 3. Способ согласно вариантам осуществления 1 или 2, где rAAV вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 1×10^{13} геномов векторов (vg) до приблизительно 7×10^{14} vg.

[411] 4. Способ согласно вариантам осуществления 1 или 2, где rAAV вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg.

[412] 5. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—4, где rAAV вводят посредством инъекции в большую цистерну.

[413] 6. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—5, где промотор представляет собой промотор гена бета-актина курицы (CBA).

[414] 7. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—6, где вектор на основе rAAV дополнительно содержит энхансер цитомегаловируса (CMV).

[415] 8. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—7, где вектор на основе rAAV дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE).

[416] 9. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—8, где вектор на основе rAAV дополнительно содержит сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста.

[417] 10. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—9, где нуклеиновая кислота содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса, фланкирующие экспрессионную конструкцию.

[418] 11. Способ согласно варианту осуществления 10, где каждая последовательность ITR представляет собой последовательность ITR AAV2.

[419] 12. Способ согласно вариантам осуществления 10 или 11, где вектор на основе rAAV дополнительно содержит область TRY между 5'-ITR и экспрессионной конструкцией, где область TRY содержит SEQ ID NO: 28.

[420] 13. Способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' - к 3'-концу:

(a) ITR аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 2;

(b) энхансер цитомегаловируса (CMV);

(c) промотор гена бета-актина курицы (CBA);

(d) трансгенную вставку, кодирующую белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68;

(e) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE);

(f) сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста и

(g) инвертированный концевой повтор (ITR) AAV2; и

(ii) капсидный белок AAV9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

[421] 14. Способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' - к 3'-концу:

(a) ITR аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 2;

(b) энхансер цитомегаловируса (CMV);

(c) промотор гена бета-актина курицы (CBA);

(d) трансгенную вставку, кодирующую белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68;

(e) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE);

(f) сигнал для присоединения поли(А)-хвоста бычьего гормона роста и

(g) инвертированный концевой повтор (ITR) AAV2; и

(ii) капсидный белок AAV9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

[422] 15. Способ согласно вариантам осуществления 13 или 14, где гAAV вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 1×10^{13} vg до приблизительно 7×10^{14} vg.

[423] 16. Способ согласно вариантам осуществления 13 или 14, где гAAV вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg.

[424] 17. Способ согласно любому из вариантов осуществления 13—16, где гAAV вводят посредством инъекции в большую цистерну.

[425] 18. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—17, где гAAV вводят в составе, содержащем приблизительно 20 mM Tris, pH 8,0, приблизительно 1 mM $MgCl_2$, приблизительно 200 mM NaCl и приблизительно 0,001% вес/об. полоксамера 188.

[426] 19. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—18, где метилпреднизолон вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, за один день до введения гAAV либо в тот же день с ним.

[427] 20. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—19, где преднизон вводят перорально:

(A) в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения приблизительно 1000 мг метилпреднизолона, и

(В) постепенно снижают его дозу в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из (А).

[428] 21. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—20, где ритуксимаб вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, в любой отдельный день между 14 днями до и 1 днем до введения гAAV.

[429] 22. Способ согласно варианту осуществления 21, где метилпреднизолон вводят до введения ритуксимаба.

[430] 23. Способ согласно варианту осуществления 22, где метилпреднизолон вводят за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения ритуксимаба.

[431] 24. Способ согласно варианту осуществления 21, где как метилпреднизолон, так и ритуксимаб вводят за день до введения гAAV; и где метилпреднизолон вводят за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения ритуксимаба.

[432] 25. Способ согласно варианту осуществления 21, где ритуксимаб вводят в любой отдельный день между 14 днями до и 2 днями до введения гAAV, и где метилпреднизолон вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения ритуксимаба в тот же день, в который вводят ритуксимаб.

[433] 26. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—25, где сиролimus вводят перорально:

(А) в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV; и

(В) в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV;

где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса.

[434] 27. Способ согласно варианту осуществления 26, где вводимую дозу сиролимуса постепенно снижают в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода после введения гAAV.

28. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—27, при этом способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг;

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение гAAV посредством инъекции в большую цистерну на следующий день после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iv) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (i), и

(v) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (iv);

(vi) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV на стадии (iii);

(vii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV на стадии (iii); где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(viii) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (vii).

[435] 29. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—27, при этом способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, в любой отдельный день между 14 днями до и 2 днями до введения гAAV на стадии (iv);

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, за один день до введения гAAV на стадии (iv) либо в тот же день с ним;

(iv) введение гAAV посредством инъекции в большую цистерну;

(v) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (iii), и

(vi) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (v);

(vii) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV на стадии (iv);

(viii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV на стадии (iii); где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(ix) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (viii).

[436] 30. Способ согласно вариантам осуществления 2 или 14, где иммунный ответ представляет собой иммунный ответ на гAAV.

[437] 31. Способ согласно любому из вариантов осуществления 2, 14 и 30, где иммунный ответ представляет собой Т-клеточный ответ.

[438] 32. Способ согласно любому из вариантов осуществления 2, 14 и 30, где иммунный ответ представляет собой В-клеточный ответ.

[439] 33. Способ согласно любому из вариантов осуществления 2, 14 и 30, где иммунный ответ представляет собой ответ с образованием антител.

[440] 34. Способ согласно любому из вариантов осуществления 2, 14 и 30, где иммунный ответ представляет собой плеоцитоз.

[441] 35. Способ согласно варианту осуществления 34, где плеоцитоз представляет собой плеоцитоз в цереброспинальной жидкости (CSF).

[442] 36. Способ согласно любому из вариантов осуществления 2, 14 и 30, где иммунный ответ представляет собой аномальный уровень белка CSF.

[443] 37. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1—36, где субъекту дополнительно вводят дополнительный иммунодепрессант, который не представляет собой сиролимус, метилпреднизолон, ритуксимаб или преднизон.

[444] 38. Терапевтическая комбинация

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона,

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

[445] 39. Терапевтическая комбинация

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона,

для применения в способе подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие.

[446] 40. Терапевтическая комбинация для применения согласно варианту осуществления 39, где комбинация содержит от приблизительно 1×10^{13} vg до приблизительно 7×10^{14} vg rAAV.

[447] 41. Терапевтическая комбинация для применения согласно варианту осуществления 39, где комбинация содержит приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg rAAV.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

2. Способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где rAAV вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 1×10^{13} геномов векторов (vg) до приблизительно 7×10^{14} vg.

4. Способ по п. 1 или п. 2, где rAAV вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg.

5. Способ по любому из пп. 1—4, где rAAV вводят посредством инъекции в большую цистерну.

6. Способ по любому из пп. 1—5, где промотор представляет собой промотор гена бета-актина курицы (CBA).

7. Способ по любому из пп. 1—6, где вектор на основе rAAV дополнительно содержит энхансер цитомегаловируса (CMV).

8. Способ по любому из пп. 1—7, где вектор на основе rAAV дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE).

9. Способ по любому из пп. 1—8, где вектор на основе rAAV дополнительно содержит сигнал для присоединения поли(А)-хвоста бычьего гормона роста.

10. Способ по любому из пп. 1—9, где нуклеиновая кислота содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса, фланкирующие экспрессионную конструкцию.

11. Способ по п. 10, где каждая последовательность ITR представляет собой последовательность ITR AAV2.

12. Способ по п. 10 или п. 11, где вектор на основе rAAV дополнительно содержит область TRY между 5'-ITR и экспрессионной конструкцией, где область TRY содержит SEQ ID NO: 28.

13. Способ лечения субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5'- к 3'-концу:

(a) ITR аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 2;

(b) энхансер цитомегаловируса (CMV);

(c) промотор гена бета-актина курицы (CBA);

(d) трансгенную вставку, кодирующую белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68;

(e) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE);

(f) сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста и

(g) инвертированный концевой повтор (ITR) AAV2; и

(ii) капсидный белок AAV9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуза;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона.

14. Способ подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие, при этом способ включает введение субъекту:

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5'- к 3'-концу:

(a) ITR аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 2;

- (b) энхансер цитомегаловируса (CMV);
- (c) промотор гена бета-актина курицы (CBA);
- (d) трансгенную вставку, кодирующую белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68;
- (e) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесных сурков (WPRE);
- (f) сигнал для присоединения поли(A)-хвоста бычьего гормона роста и
- (g) инвертированный концевой повтор (ITR) AAV2; и
- (ii) капсидный белок AAV9; и одного или более из следующих:
 - (A) сиролимуса;
 - (B) метилпреднизолона;
 - (C) ритуксимаба и
 - (D) преднизона.

15. Способ по п. 13 или п. 14, где гAAV вводят субъекту в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 1×10^{13} vg до приблизительно 7×10^{14} vg.

16. Способ по п. 13 или п. 14, где гAAV вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg.

17. Способ по любому из пп. 13—16, где гAAV вводят посредством инъекции в большую цистерну.

18. Способ по любому из пп. 1—17, где гAAV вводят в составе, содержащем приблизительно 20 mM Tris, pH 8,0, приблизительно 1 mM $MgCl_2$, приблизительно 200 mM NaCl и приблизительно 0,001% вес/об. полоксамера 188.

19. Способ по любому из пп. 1—18, где метилпреднизолон вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, за один день до введения гAAV либо в тот же день с ним.

20. Способ по любому из пп. 1—19, где преднизон вводят перорально:

(А) в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения приблизительно 1000 мг метилпреднизолона, и

(В) постепенно снижают его дозу в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из (А).

21. Способ по любому из пп. 1—20, где ритуксимаб вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, в любой отдельный день между 14 днями до и 1 днем до введения гAAV.

22. Способ по п. 21, где метилпреднизолон вводят до введения ритуксимаба.

23. Способ по п. 22, где метилпреднизолон вводят за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения ритуксимаба.

24. Способ по п. 21, где как метилпреднизолон, так и ритуксимаб вводят за день до введения гAAV; и где метилпреднизолон вводят за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения ритуксимаба.

25. Способ по п. 21, где ритуксимаб вводят в любой отдельный день между 14 днями до и 2 днями до введения гAAV, и где метилпреднизолон вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, за по меньшей мере приблизительно 30 минут до введения ритуксимаба в тот же день, в который вводят ритуксимаб.

26. Способ по любому из пп. 1—25, где сиролimus вводят перорально:

(А) в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV; и

(В) в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV;

где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса.

27. Способ по п. 26, где вводимую дозу сиролимуса постепенно снижают в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода после введения гAAV.

28. Способ по любому из пп. 1—27, при этом способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг;

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение гAAV посредством инъекции в большую цистерну на следующий день после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iv) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (i), и

(v) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (iv);

(vi) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV на стадии (iii);

(vii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV на стадии (iii);

где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(viii) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (vii).

29. Способ по любому из пп. 1—27, при этом способ включает:

(i) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, в любой отдельный день между 14 днями до и 2 днями до введения гAAV на стадии (iv);

(ii) введение ритуксимаба внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, через приблизительно 30 минут после введения метилпреднизолона на стадии (i);

(iii) введение метилпреднизолона внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 1000 мг, за один день до введения гAAV на стадии (iv) либо в тот же день с ним;

(iv) введение гAAV посредством инъекции в большую цистерну;

(v) введение преднизона перорально в дозе, составляющей приблизительно 30 мг в день, в течение 14 дней, начиная со следующего дня после введения метилпреднизолона на стадии (iii), и

(vi) постепенное снижение вводимой дозы преднизона в течение 7 дней после окончания 14-дневного периода из стадии (v);

(vii) введение сиролимуса перорально в виде однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг, за три дня, два дня или один день до введения гAAV на стадии (iv);

(viii) введение сиролимуса перорально в дозе, составляющей приблизительно 2 мг в день, для поддержания остаточных уровней в сыворотке крови, составляющих от приблизительно 4 нг/мл до приблизительно 9 нг/мл, в течение приблизительно 90 дней после введения гAAV на стадии (iv);

где первую дозу, составляющую приблизительно 2 мг сиролимуса в день, вводят на следующий день после однократной дозы, составляющей приблизительно 6 мг сиролимуса; и

(ix) постепенное снижение вводимой дозы сиролимуса в течение от 15 дней до 30 дней после окончания 90-дневного периода из стадии (viii).

30. Способ по п. 2 или п. 14, где иммунный ответ представляет собой иммунный ответ на гAAV.

31. Способ по любому из пп. 2, 14 и п. 30, где иммунный ответ представляет собой Т-клеточный ответ.

32. Способ по любому из пп. 2, 14 и п. 30, где иммунный ответ представляет собой В-клеточный ответ.

33. Способ по любому из пп. 2, 14 и п. 30, где иммунный ответ представляет собой ответ с образованием антител.

34. Способ по любому из пп. 2, 14 и п. 30, где иммунный ответ представляет собой плеоцитоз.

35. Способ по п. 34, где плеоцитоз представляет собой плеоцитоз в цереброспинальной жидкости (CSF).

36. Способ по любому из пп. 2, 14 и п. 30, где иммунный ответ представляет собой аномальный уровень белка CSF.

37. Способ по любому из пп. 1—36, где субъекту дополнительно вводят дополнительный иммунодепрессант, который не представляет собой сиролимус, метилпреднизолон, ритуксимаб или преднизон.

38. Терапевтическая комбинация

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

(C) ритуксимаба и

(D) преднизона,

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

39. Терапевтическая комбинация

рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с трансгенной вставкой, кодирующей белок програнулин (PGRN), где трансгенная вставка содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 68, и

(ii) капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 9; и одного или более из следующих:

(A) сиролимуса;

(B) метилпреднизолона;

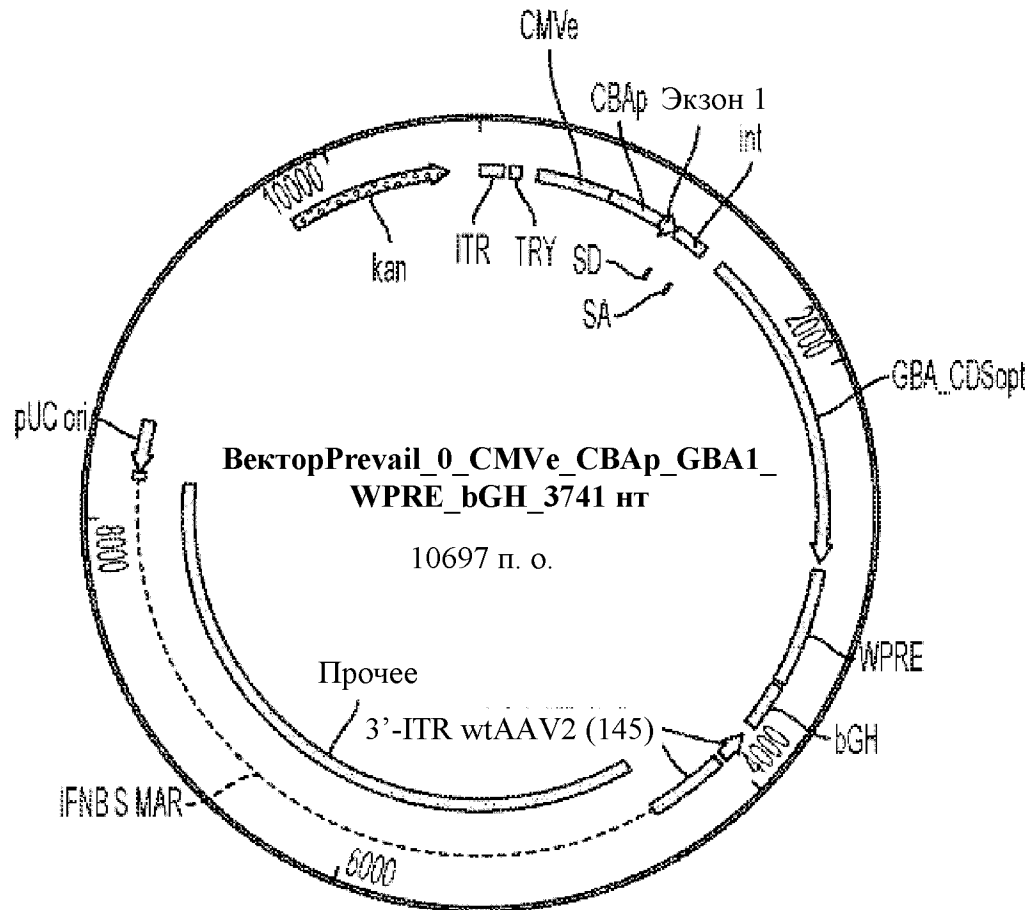
(C) ритуксимаба и

(D) преднизона,

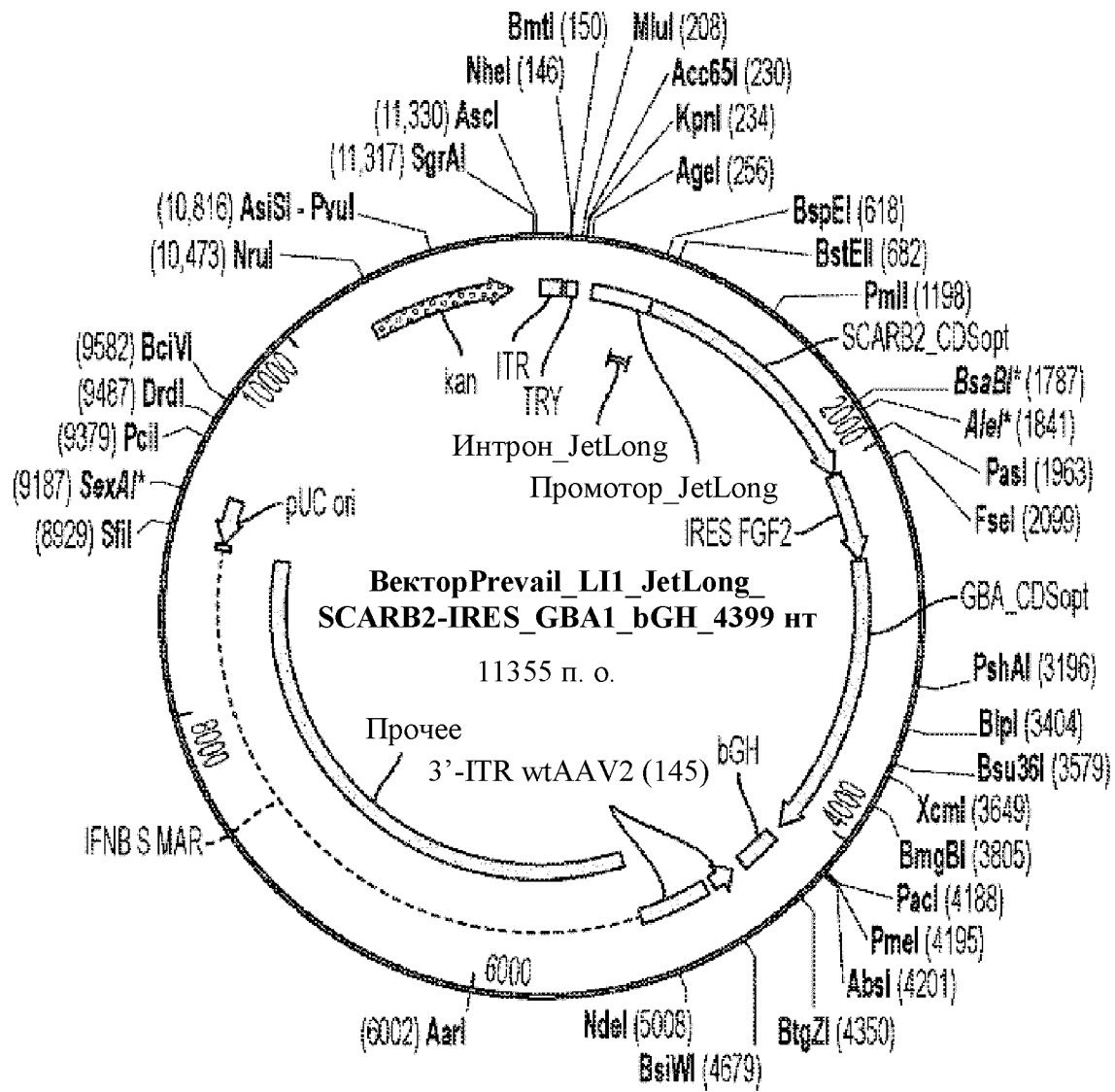
для применения в способе подавления иммунного ответа у субъекта, у которого имеется лобно-височная деменция с мутацией *GRN* или подозрение на ее наличие.

40. Терапевтическая комбинация для применения по п. 39, где комбинация содержит от приблизительно 1×10^{13} vg до приблизительно 7×10^{14} vg rAAV.

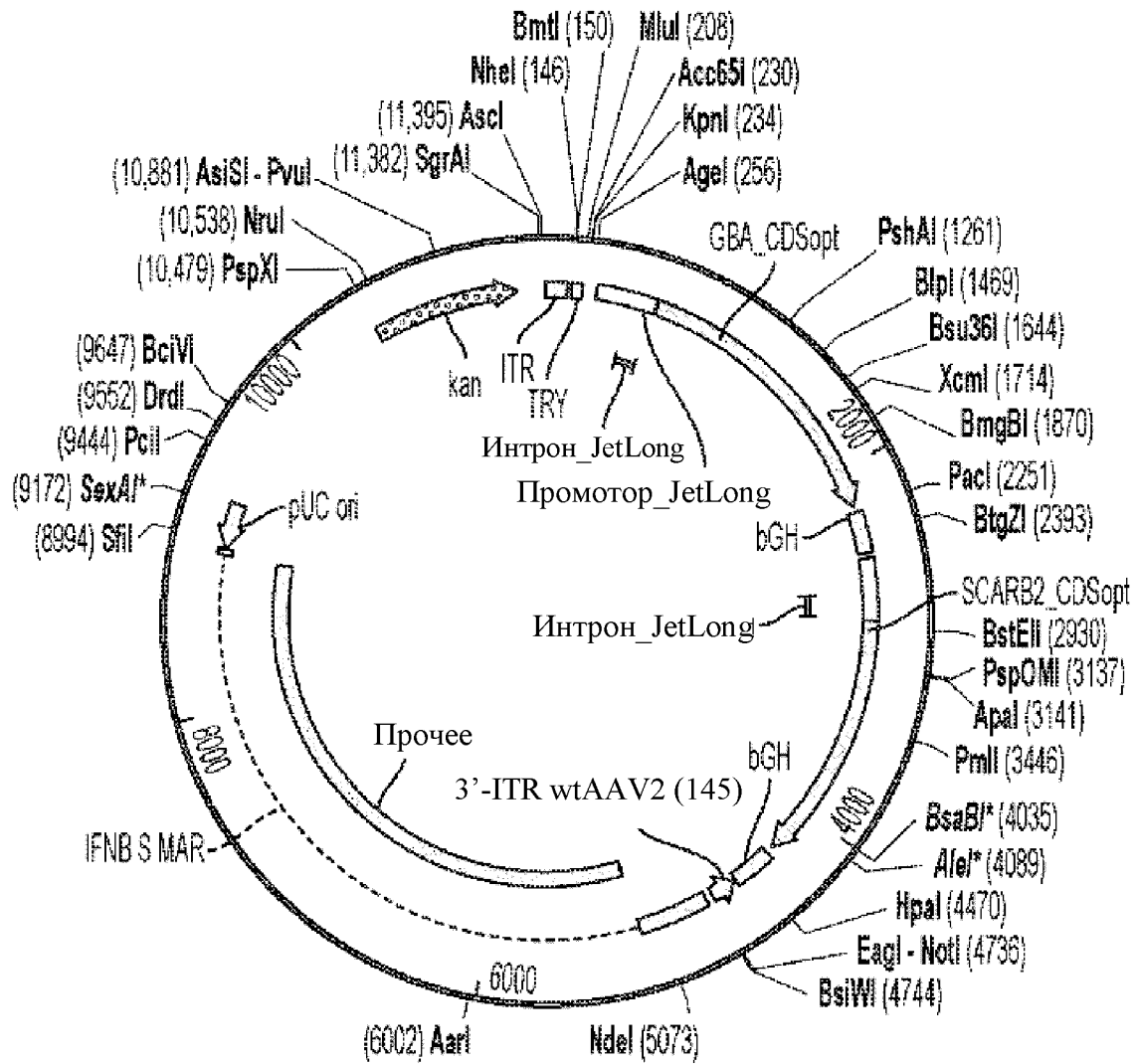
41. Терапевтическая комбинация для применения по п. 39, где комбинация содержит приблизительно $3,5 \times 10^{13}$ vg, приблизительно $7,0 \times 10^{13}$ vg или приблизительно $1,4 \times 10^{14}$ vg rAAV.



ФИГ. 1



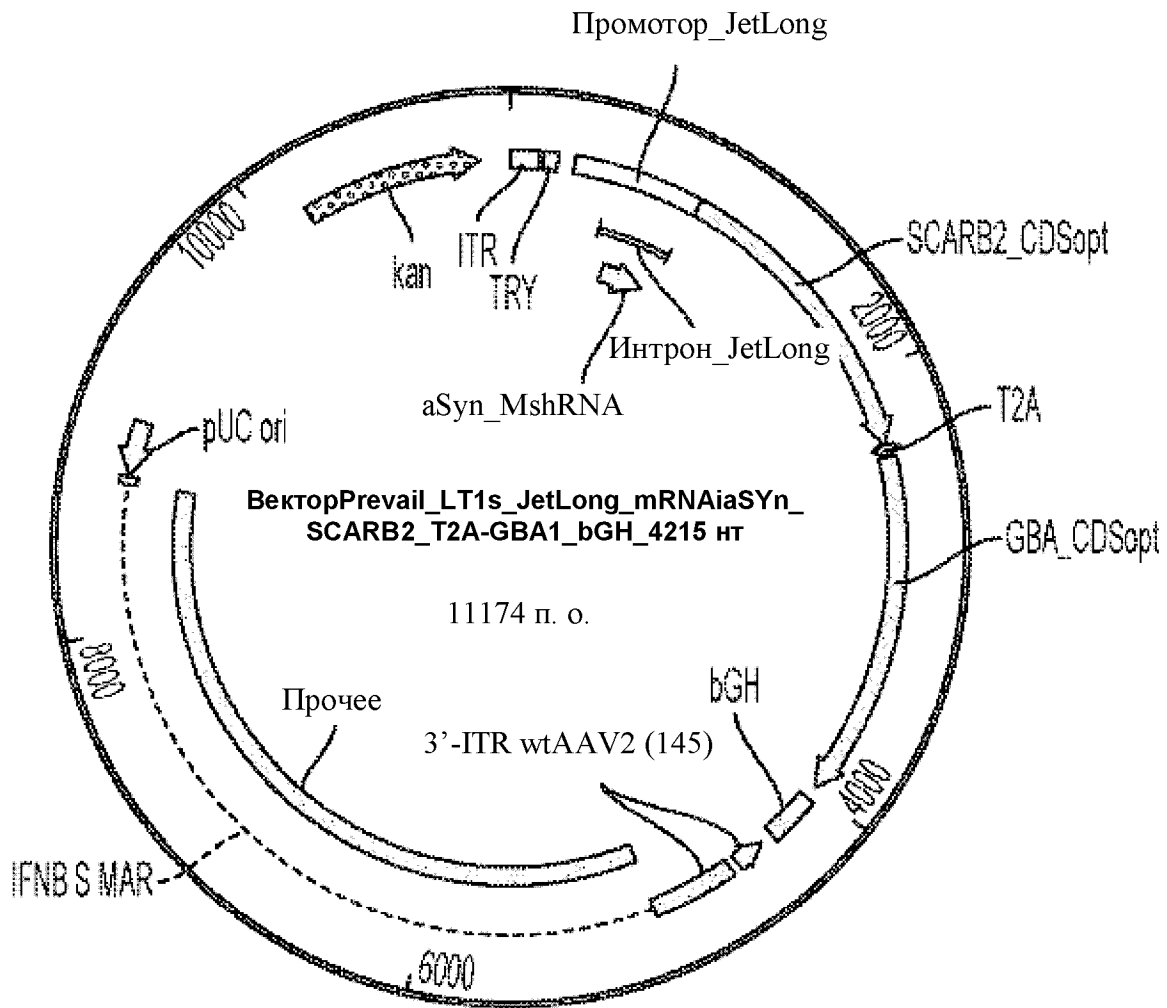
ФИГ. 2



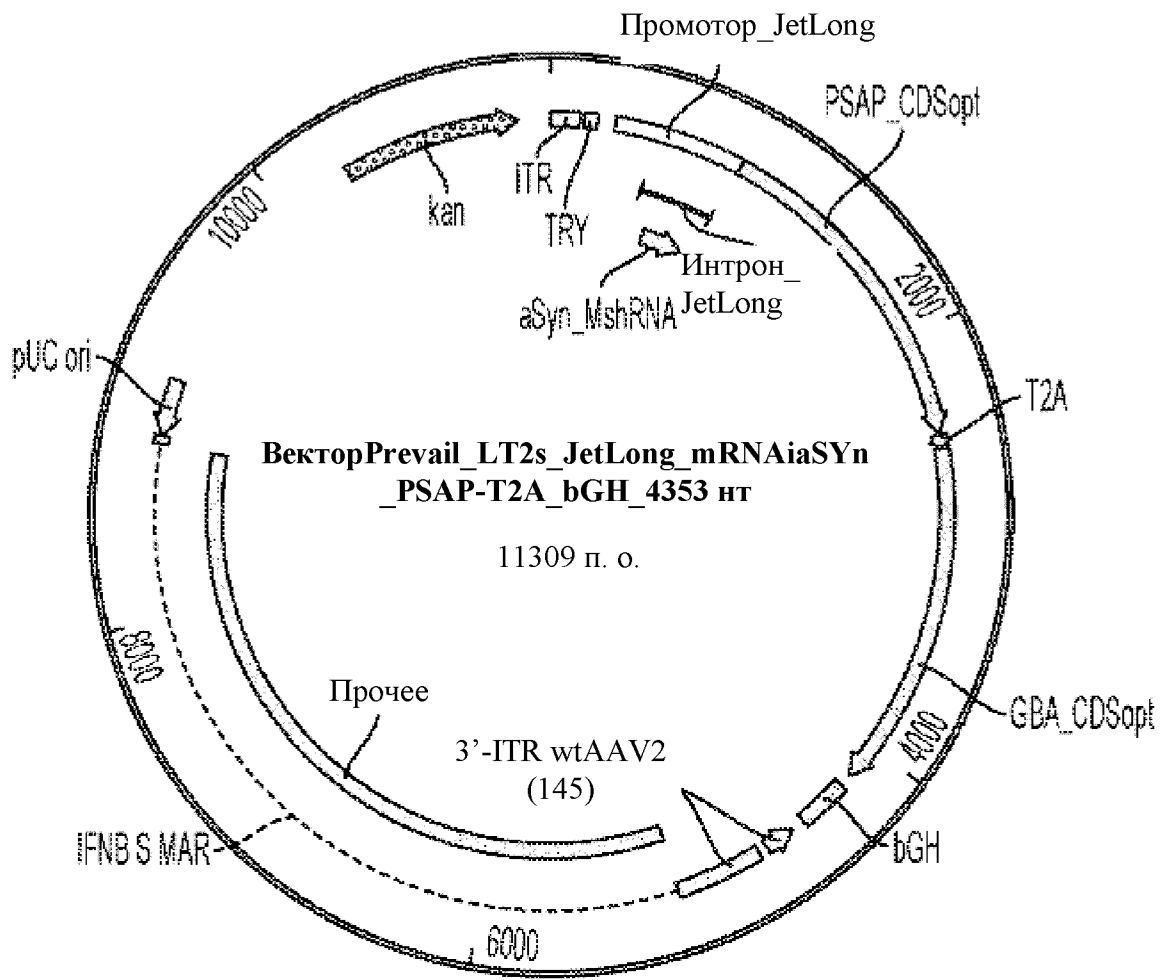
ВекторPrevail_FP1_JetLong_GBA1_bGH_JetLong_SCARB2_SV40L_4464 нт

11420 п. о.

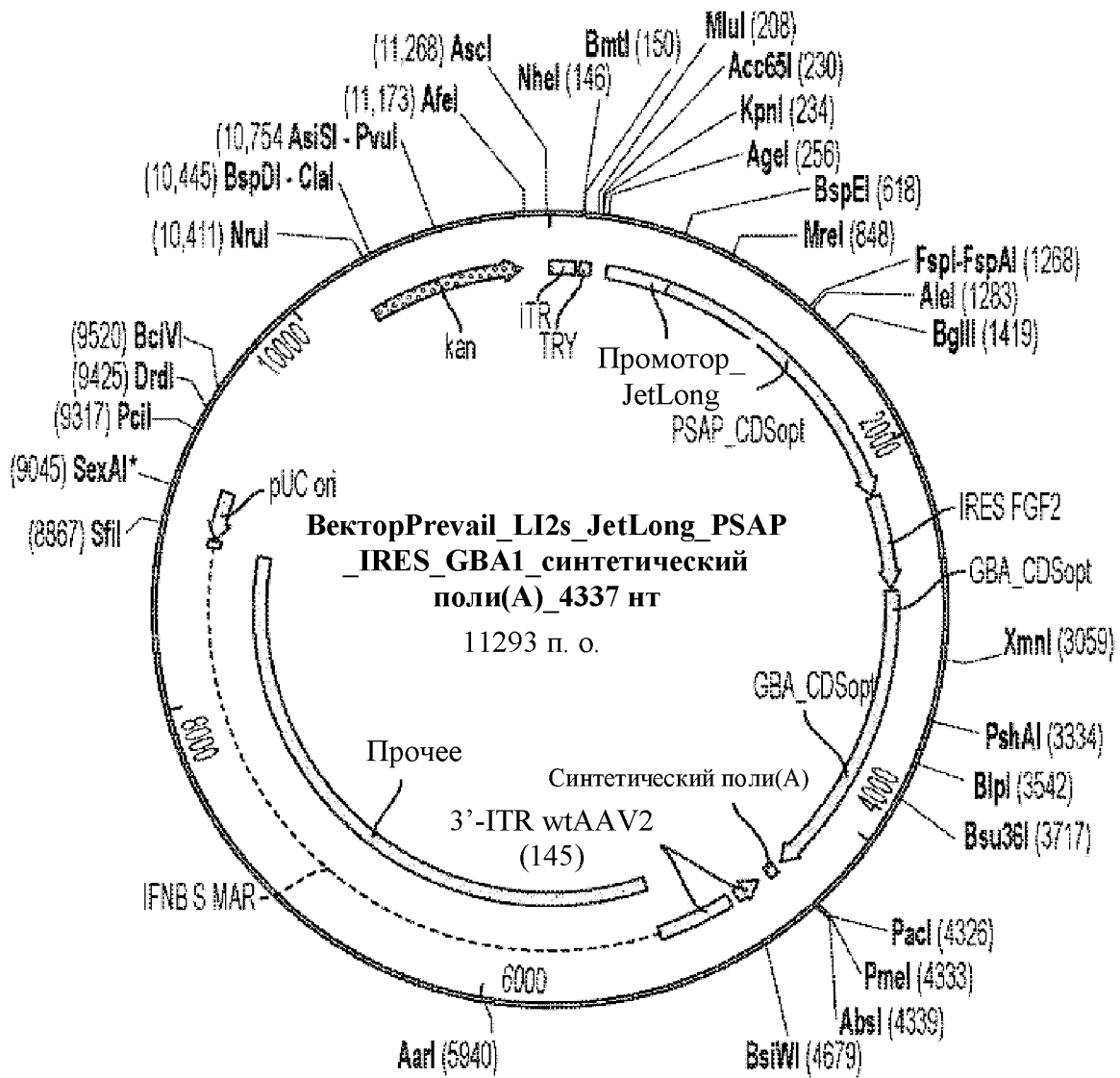
ФИГ. 3



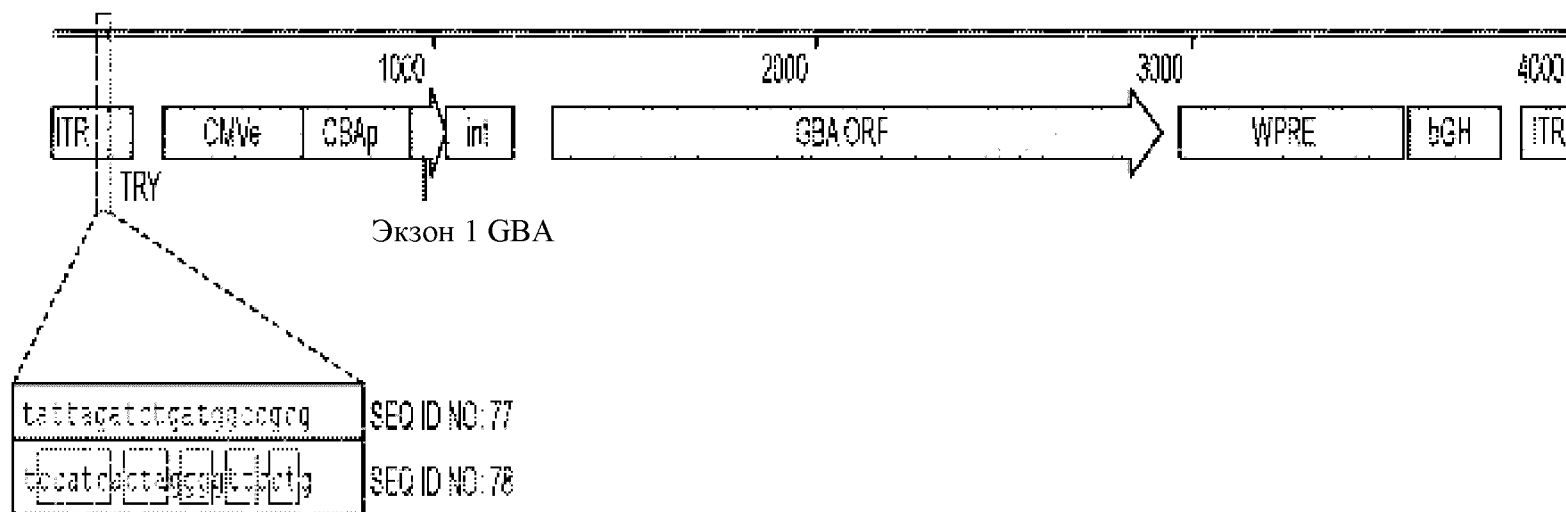
ФИГ. 4



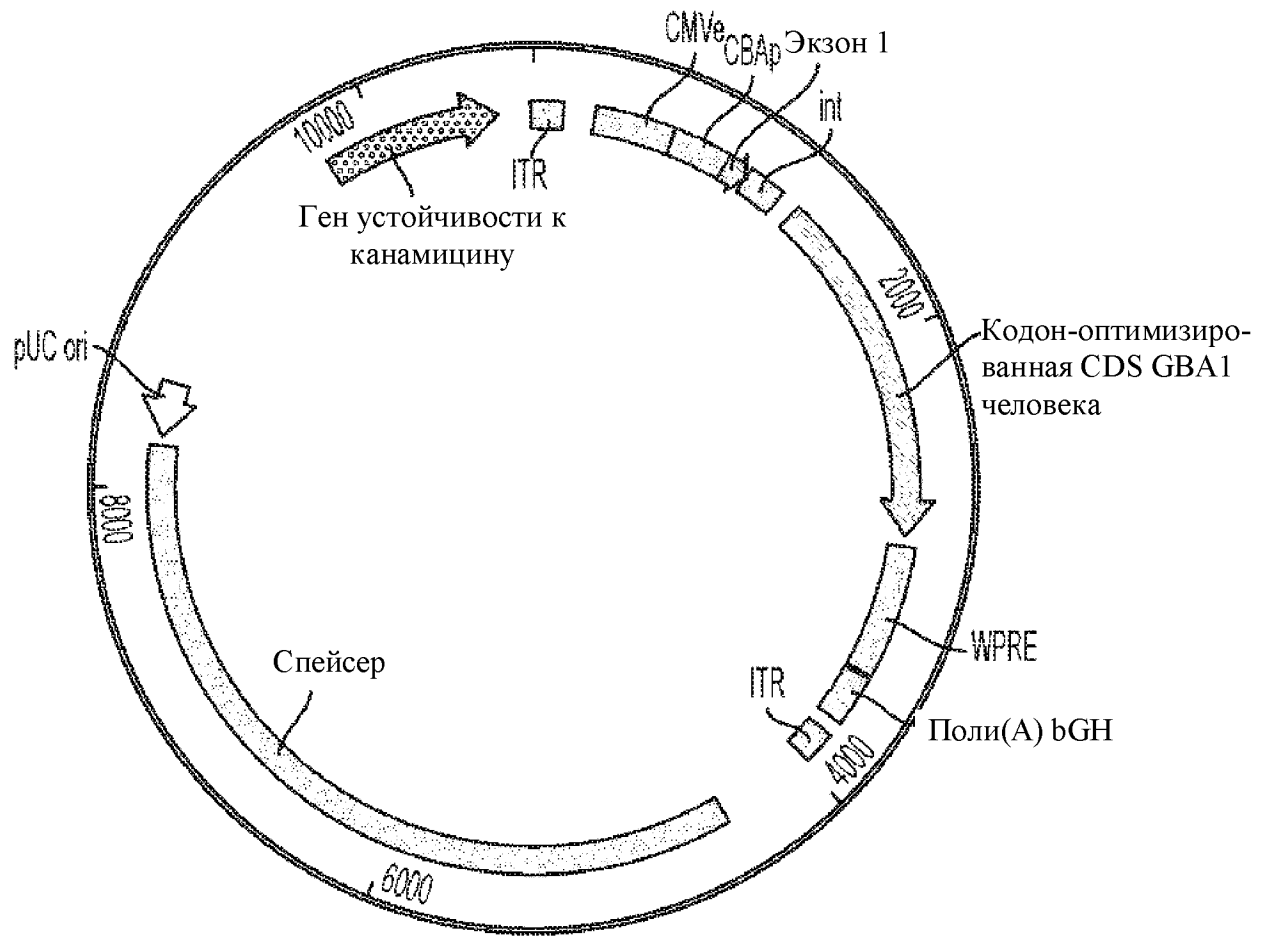
ФИГ. 5



ФИГ. 6

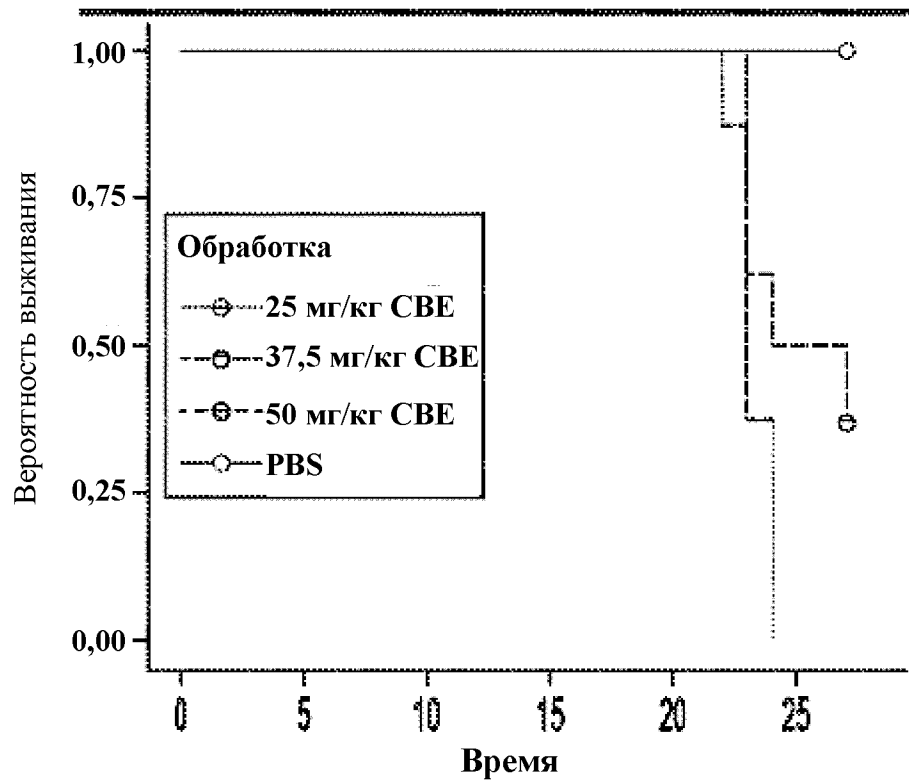


ФИГ. 7

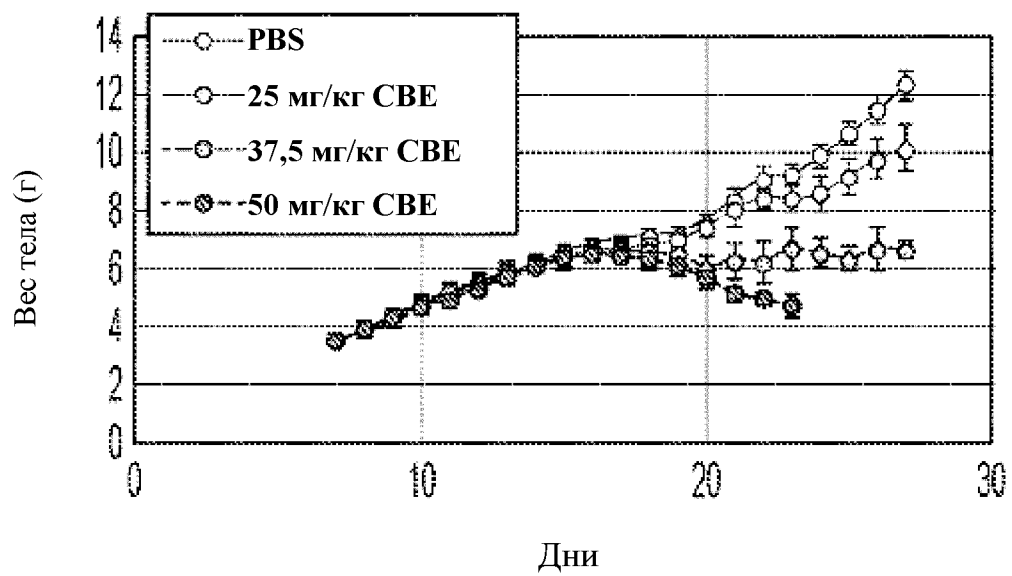


ФИГ. 8

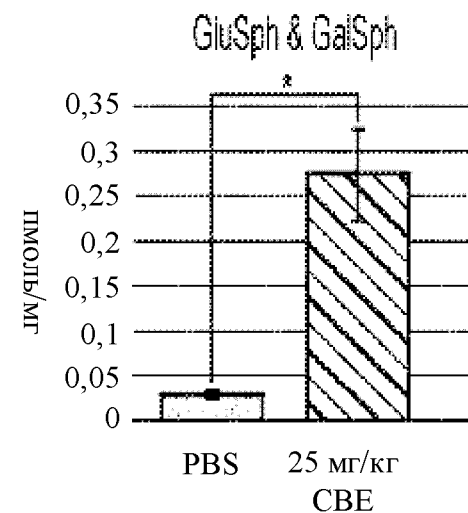
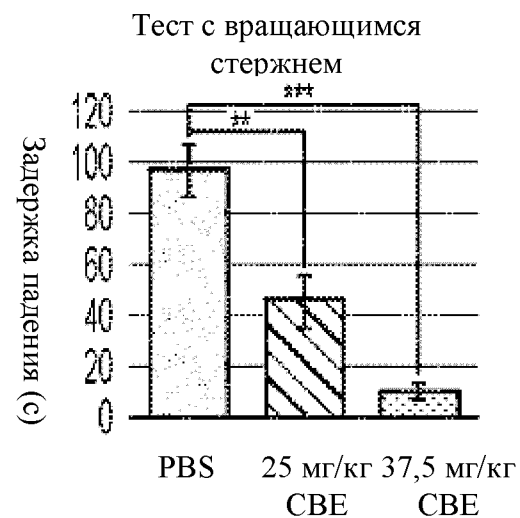
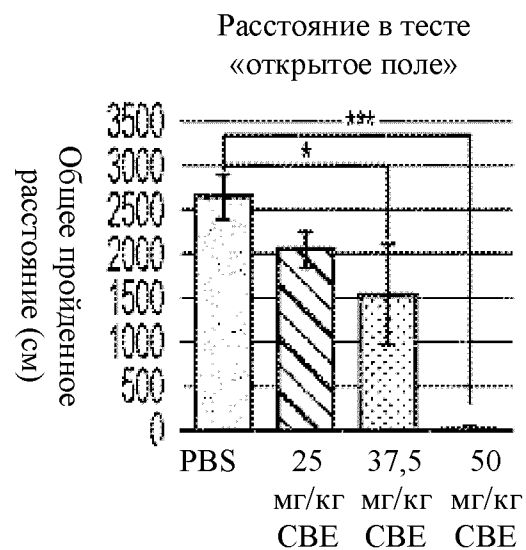
Кривая выживаемости Каплана-Мейера



Изменение веса тела



ФИГ. 9

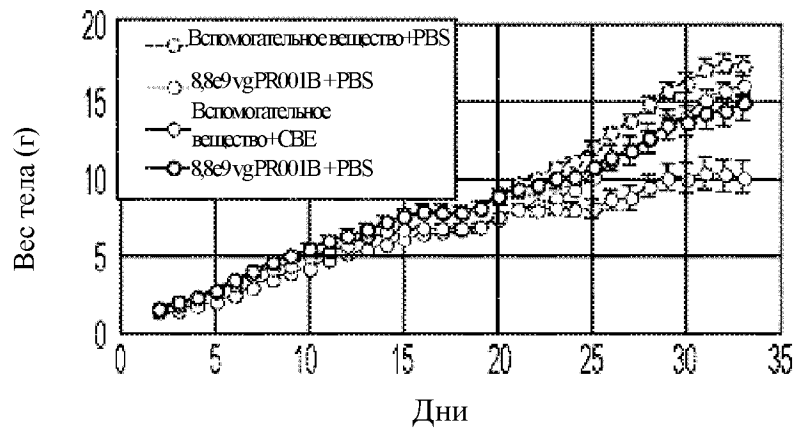


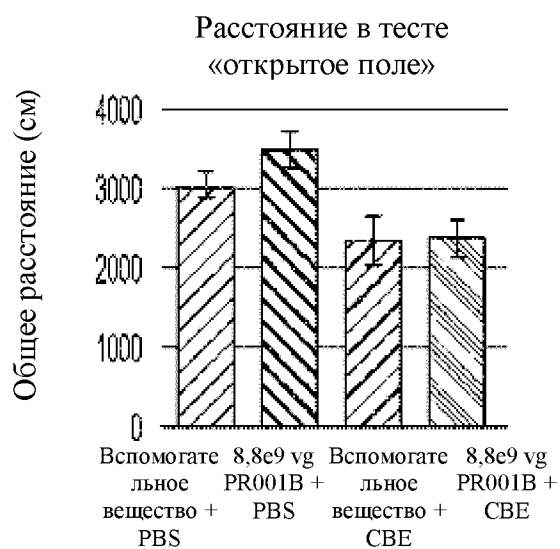
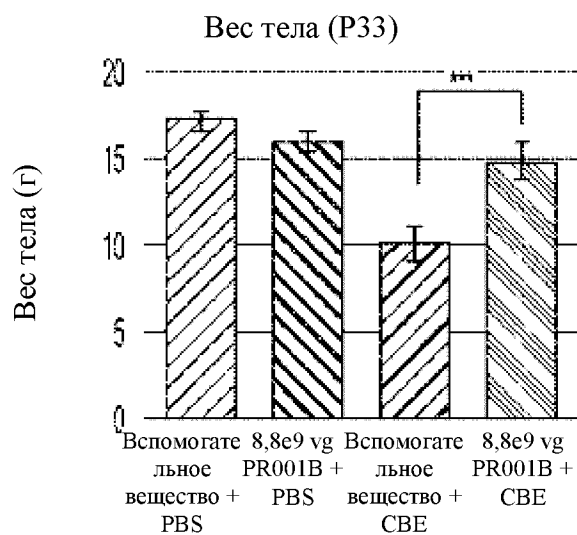
ФИГ. 9,
продолжение

Доставка
PR001 (ICV)

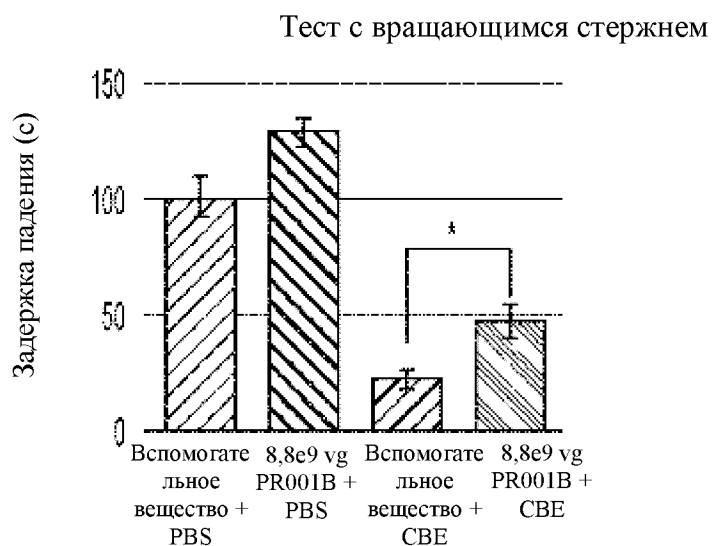


Изменение веса тела





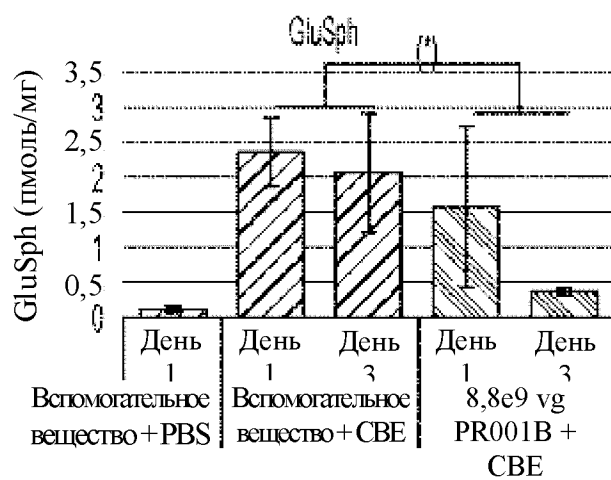
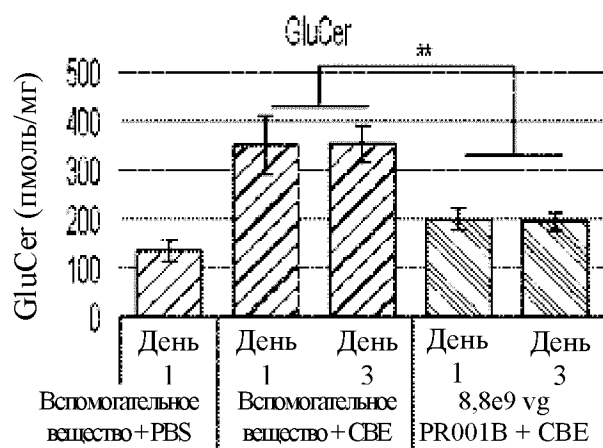
ФИГ. 11,
продолжение



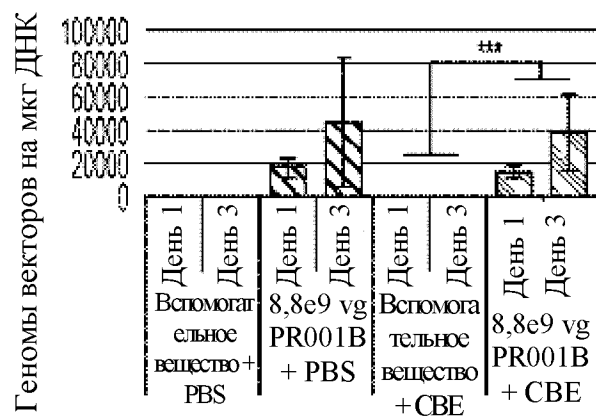
ФИГ. 11, продолжение



ФИГ. 12

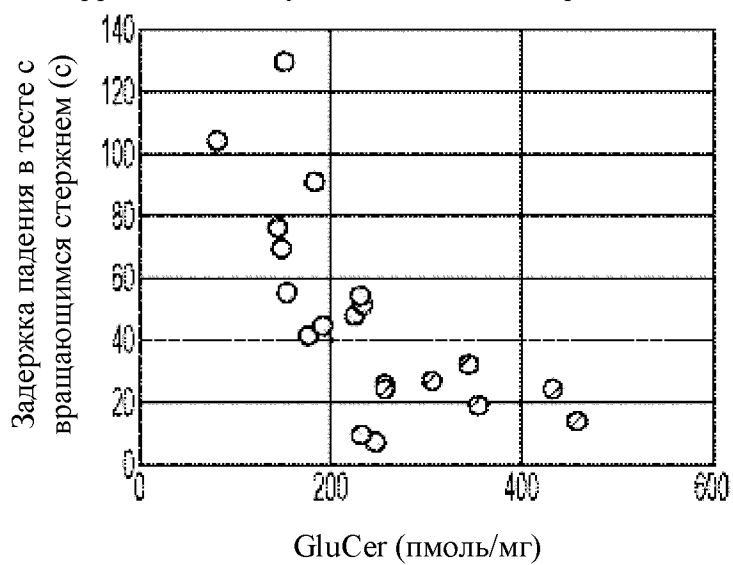


Биораспределение – кора головного мозга



ФИГ. 12, продолжение

Корреляция между поведением и содержанием липидов



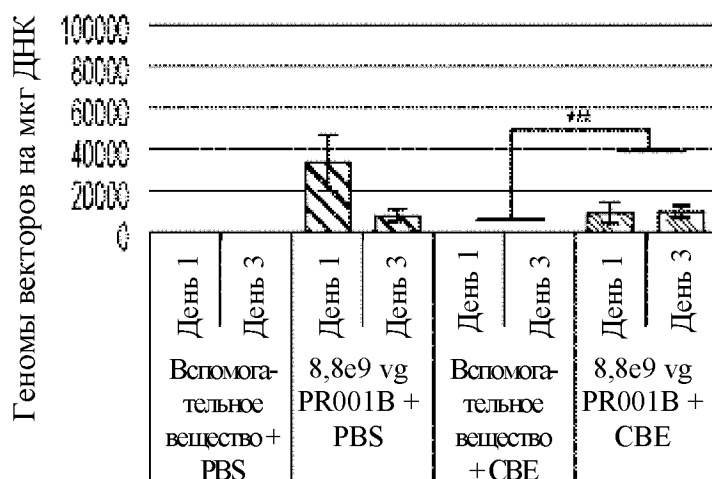
Корреляция между содержанием липидов и ферментативной активностью



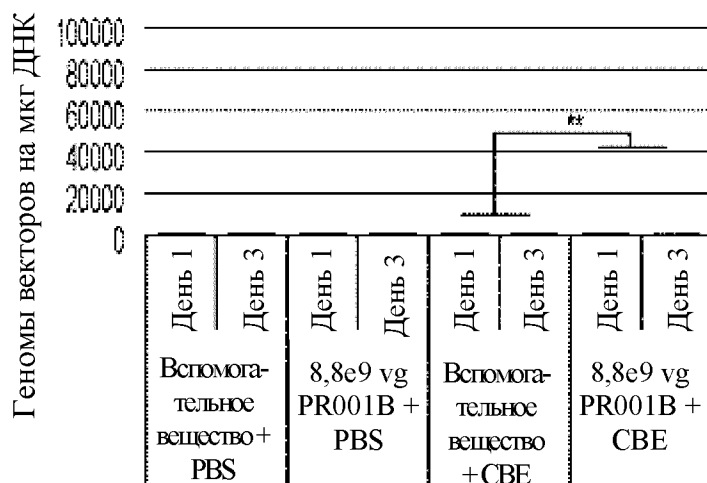
○ Вспомогательное вещество + PBS ◐ Вспомогательное вещество + CBE ⊗ 8,8e9 vg PR001B + CBE

ФИГ. 13

Биораспределение – печень

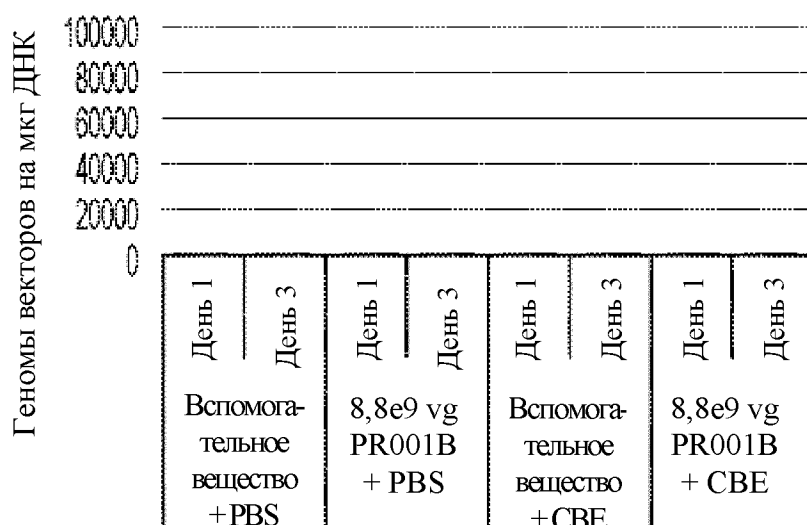


Биораспределение - селезенка

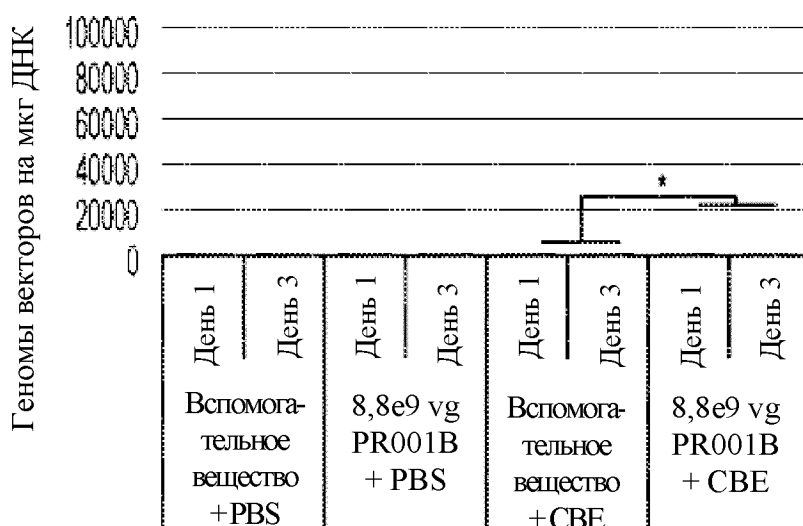


ФИГ. 14

Биораспределение - гонады

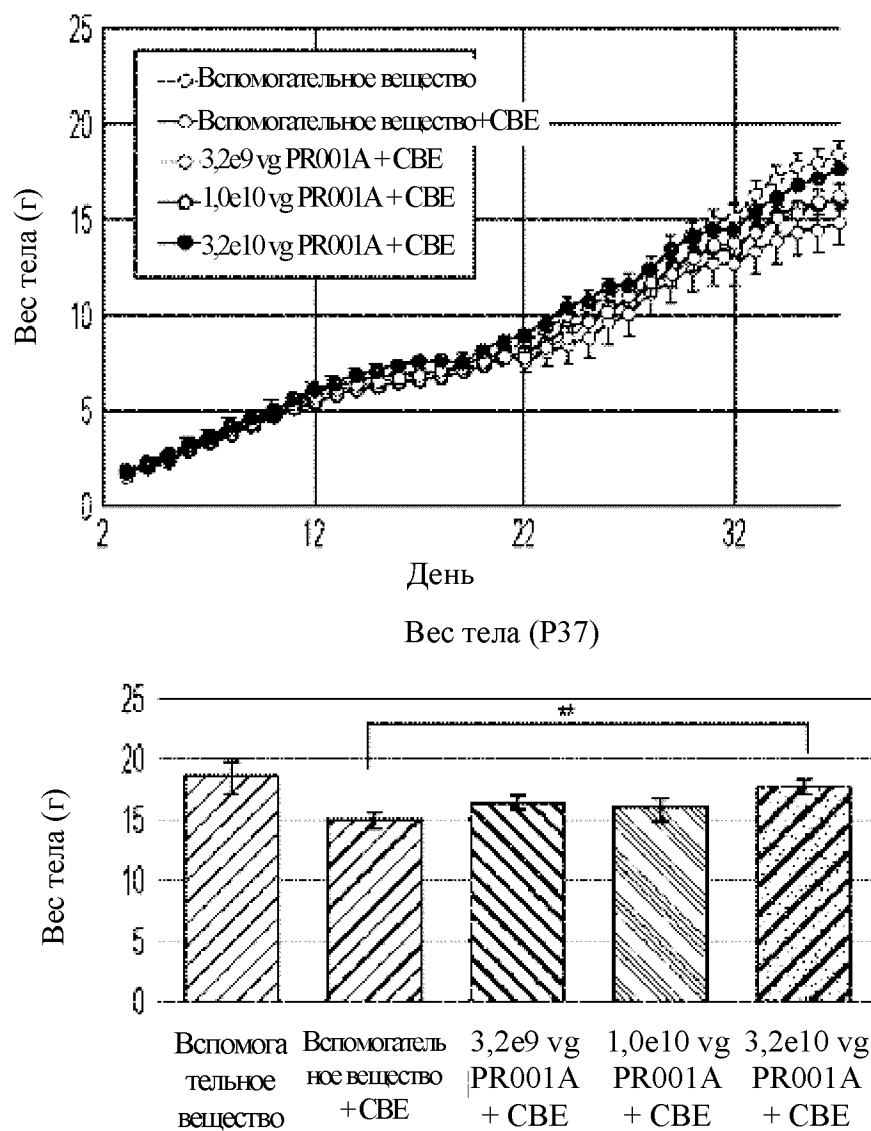


Биораспределение – почка

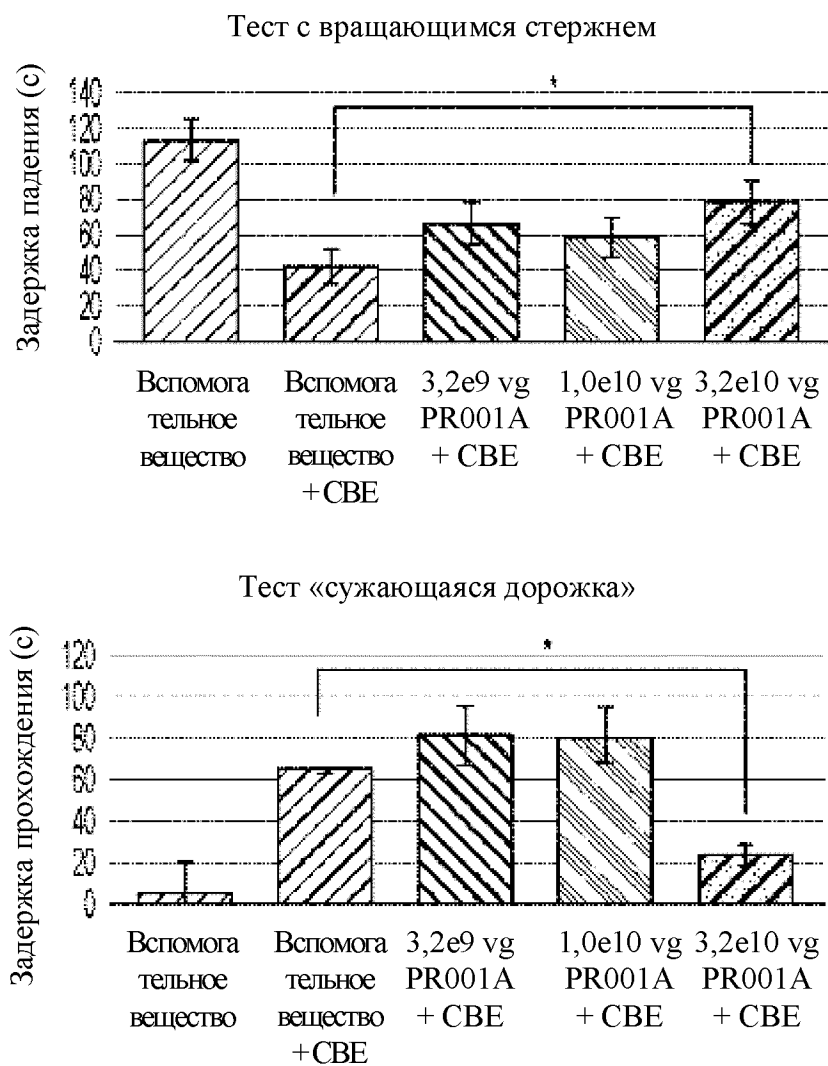


ФИГ. 14, продолжение

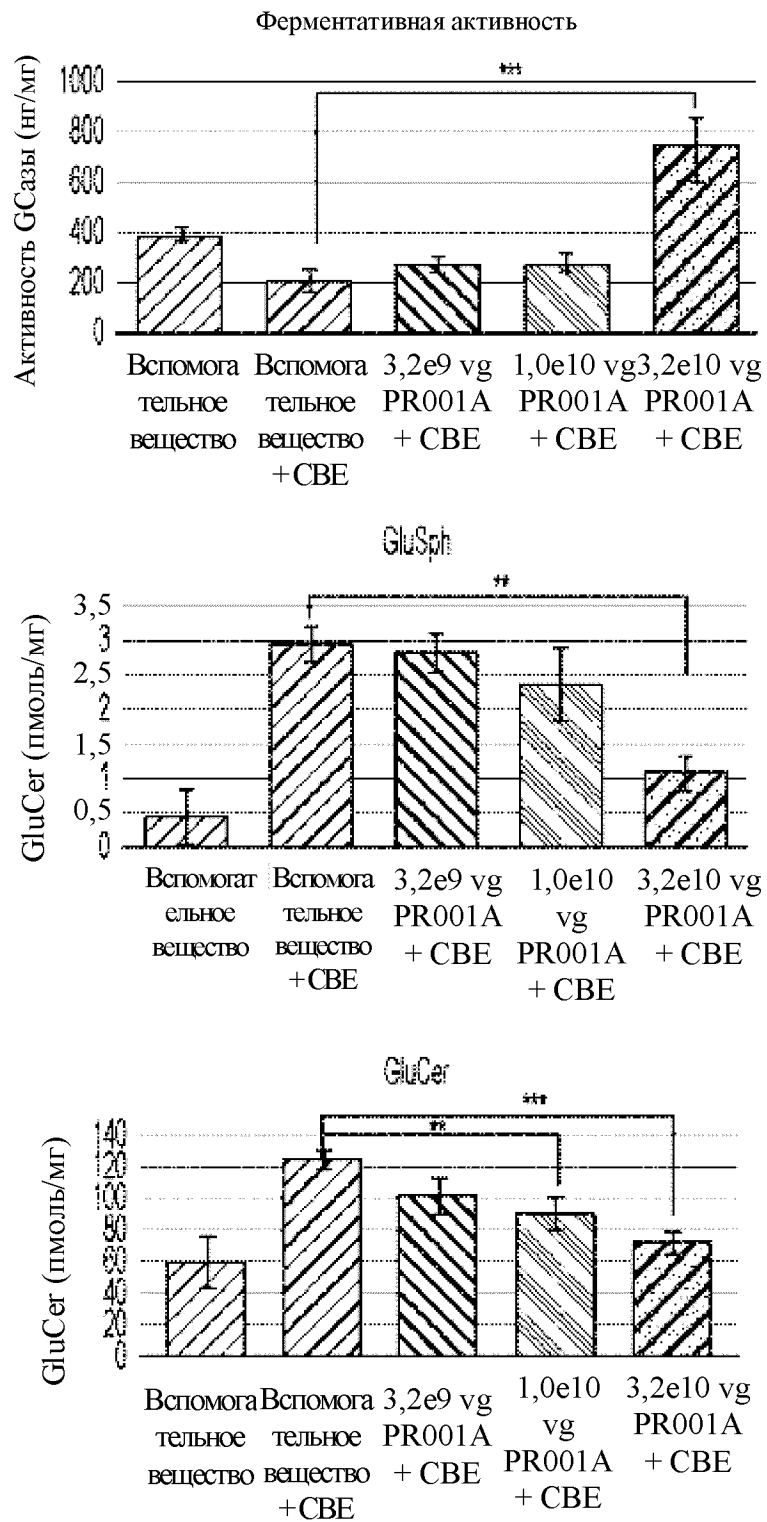
Изменение веса тела



ФИГ. 15

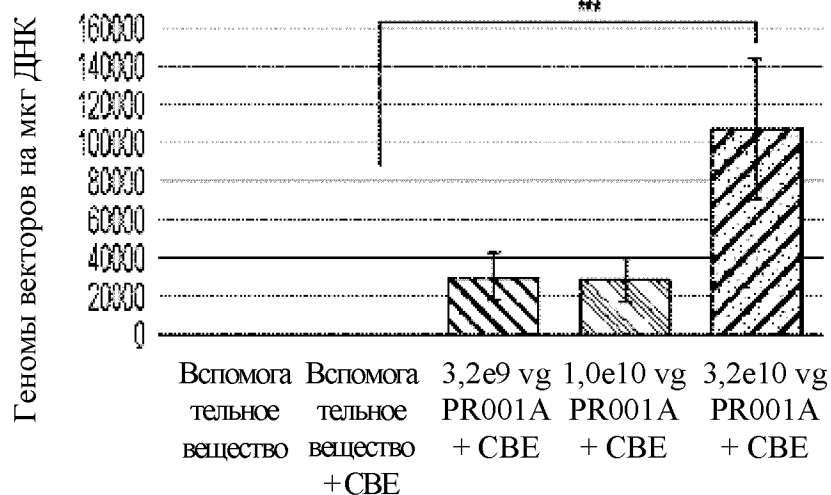


ФИГ. 15, продолжение

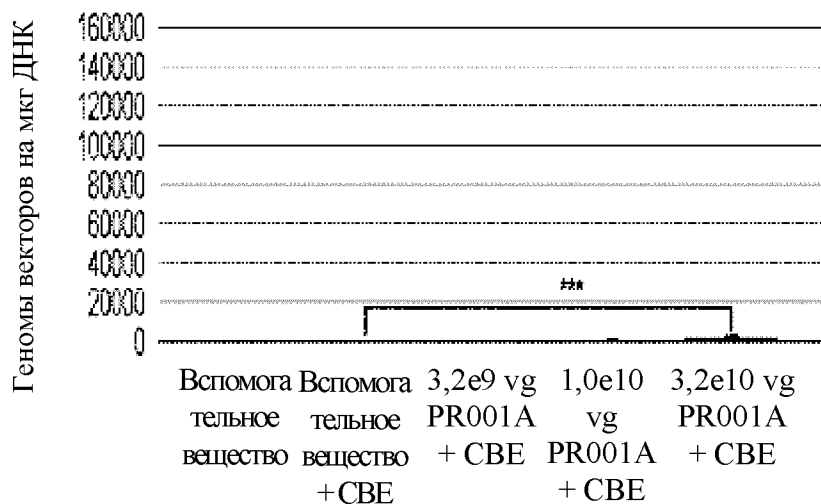


ФИГ. 16

Биораспределение – кора головного мозга

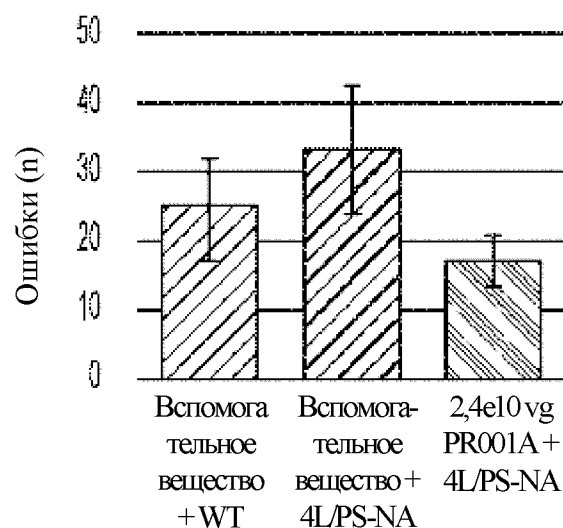


Биораспределение – печень

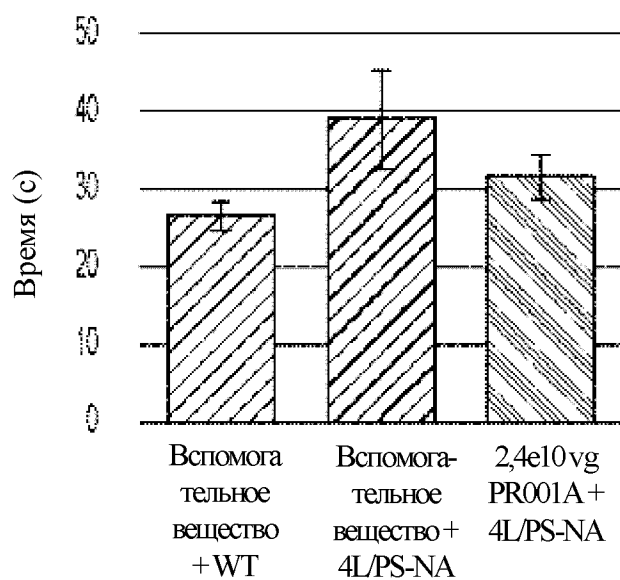


ФИГ. 16, продолжение

Тест с прогулкой по сужающейся дорожке – общее количество ошибок

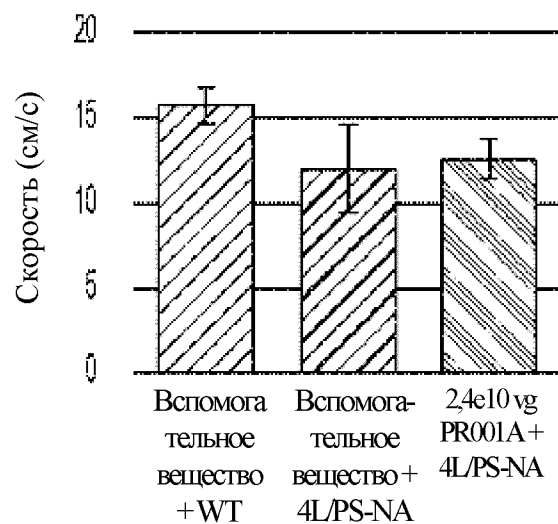


Тест с прогулкой по сужающейся дорожке – активное время

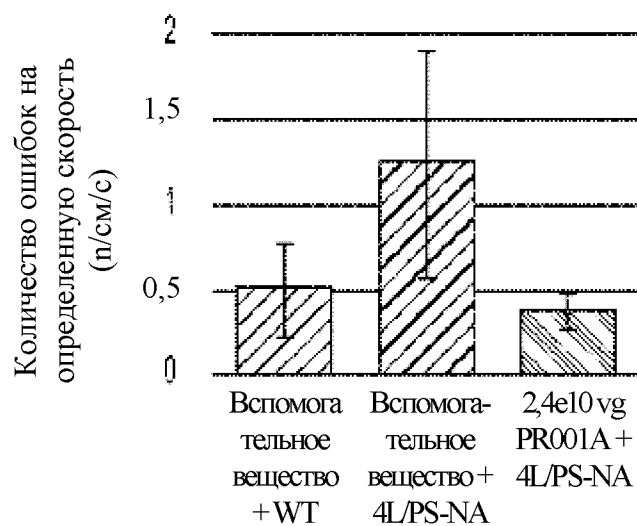


ФИГ. 17

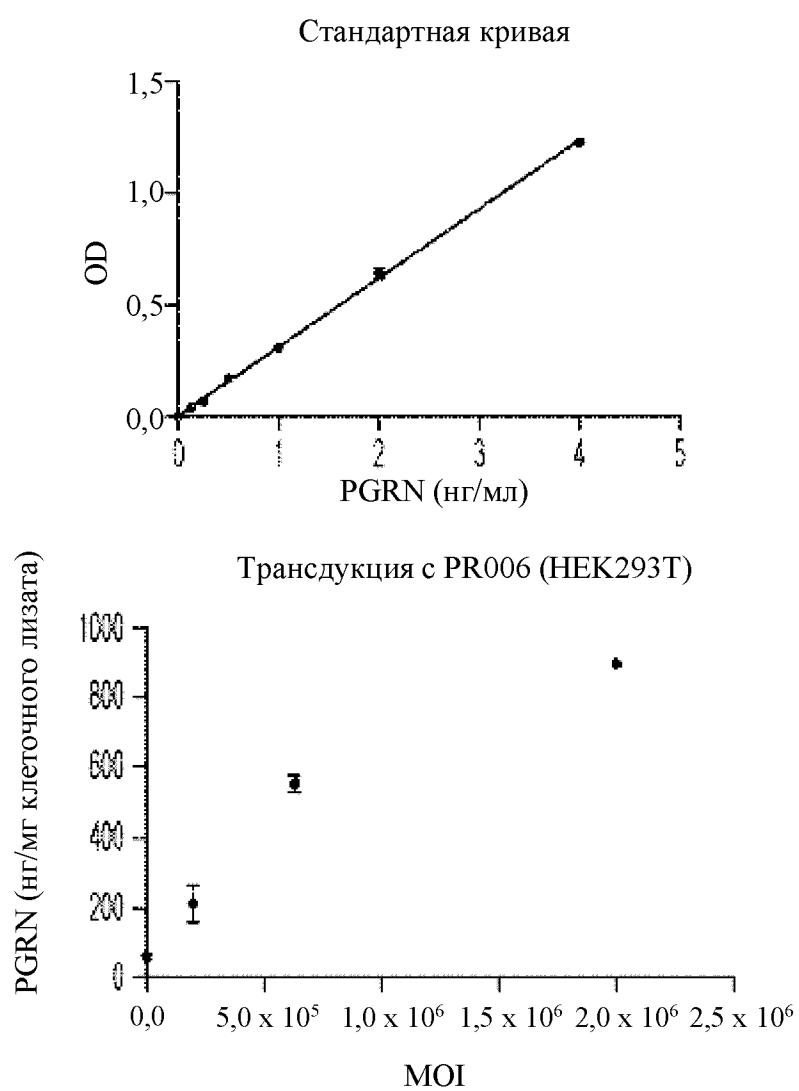
Тест с прогулкой по сужающейся дорожке – скорость



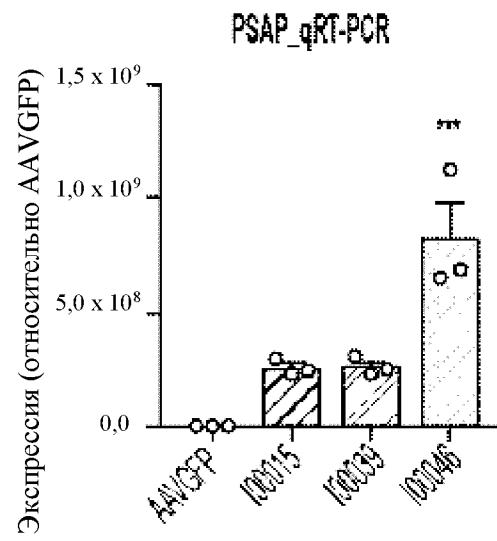
Тест с прогулкой по сужающейся дорожке – количество ошибок на определенную скорость



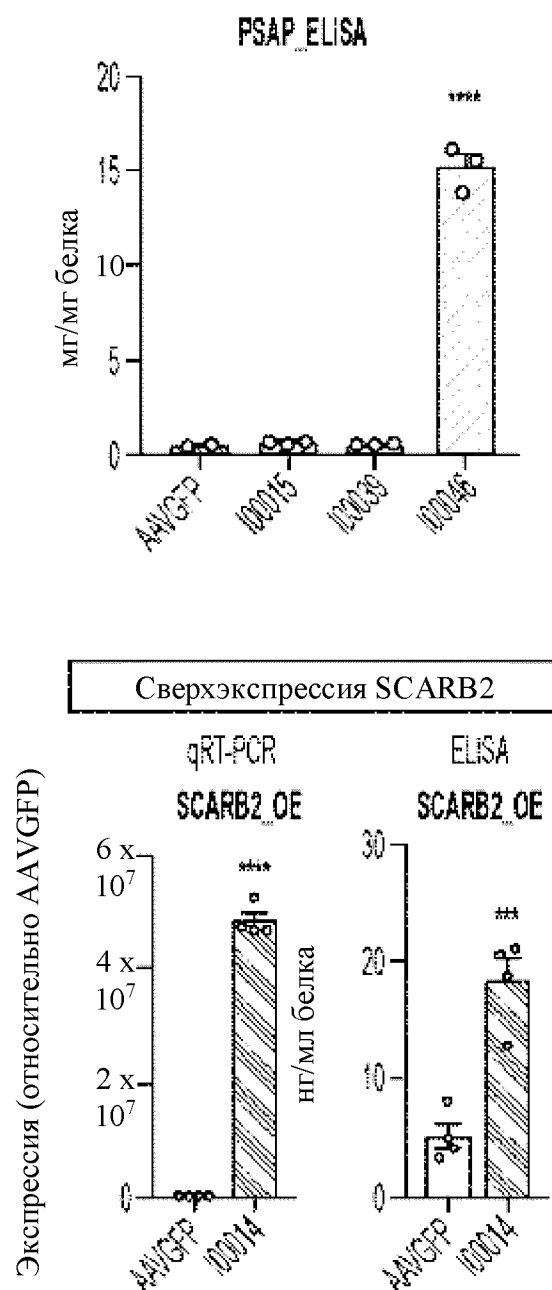
ФИГ. 17, продолжение



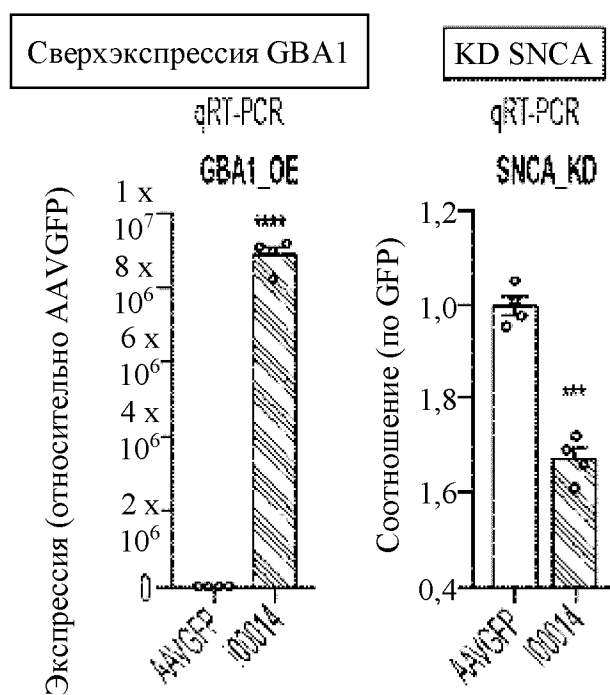
ФИГ. 18



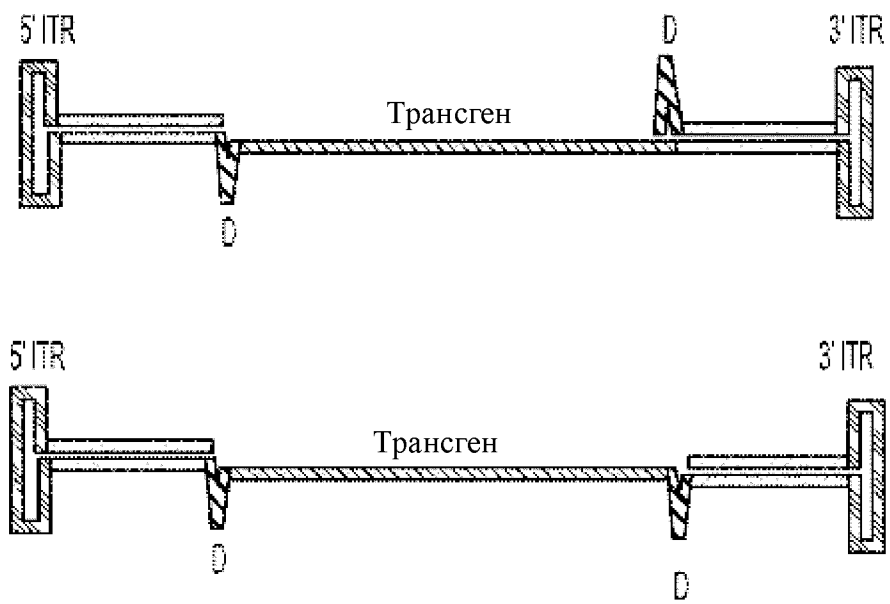
ФИГ. 19



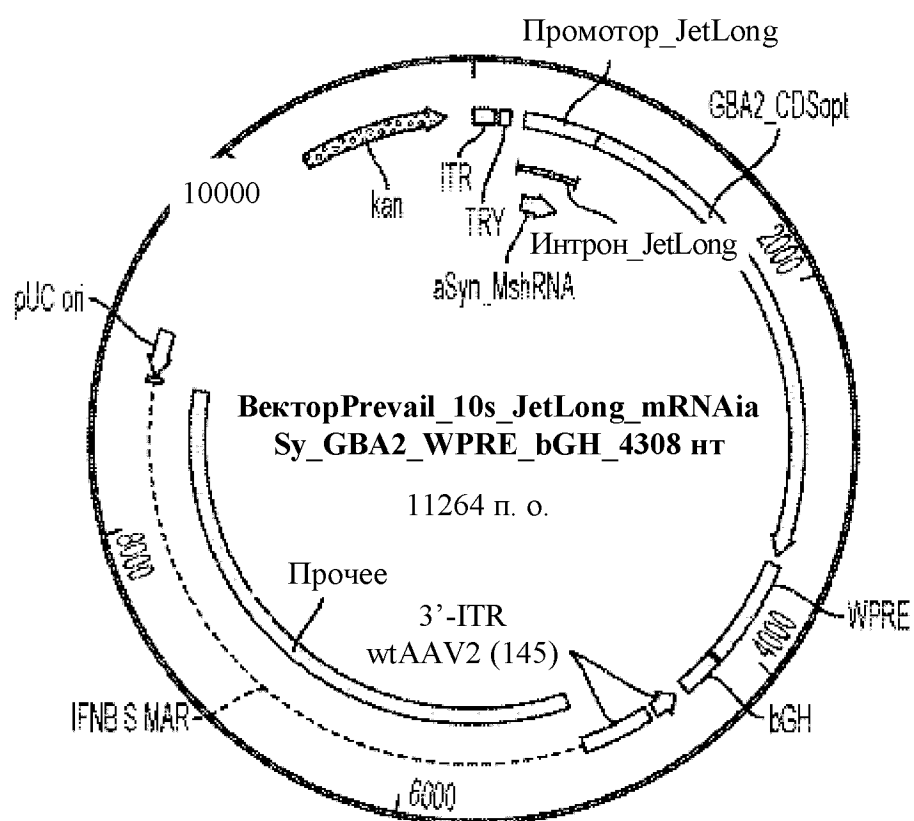
ФИГ. 19, продолжение



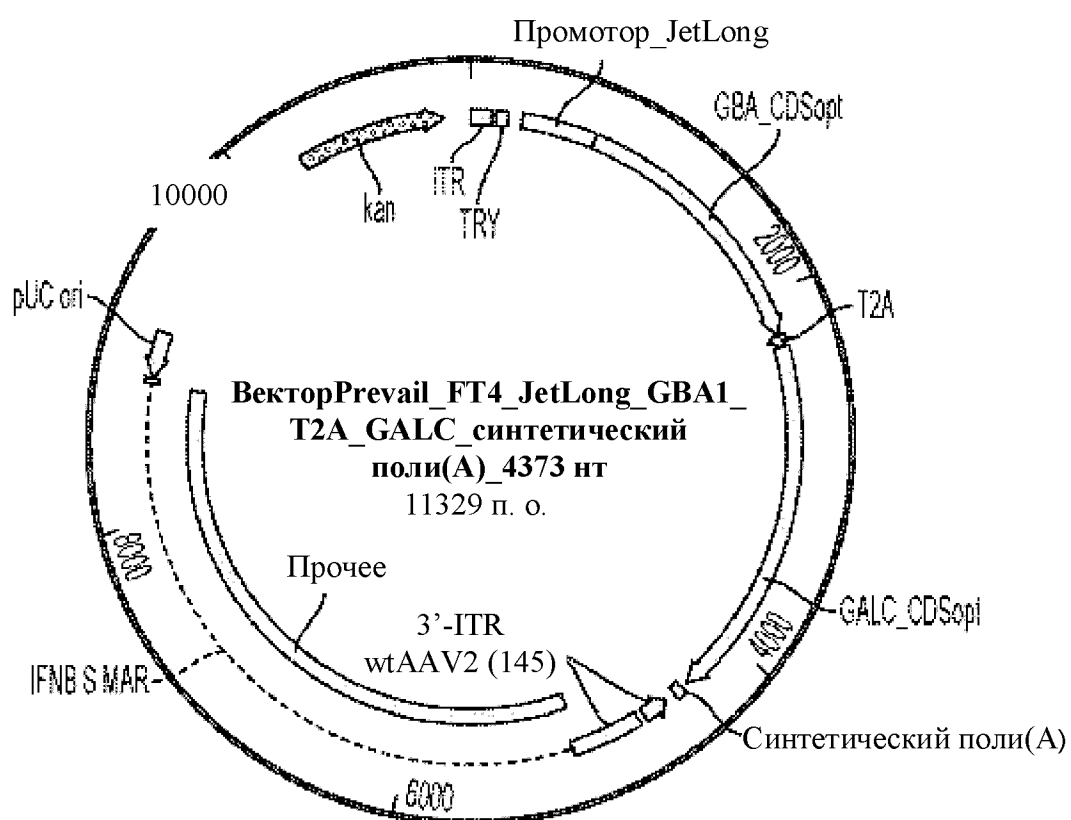
ФИГ. 19, продолжение



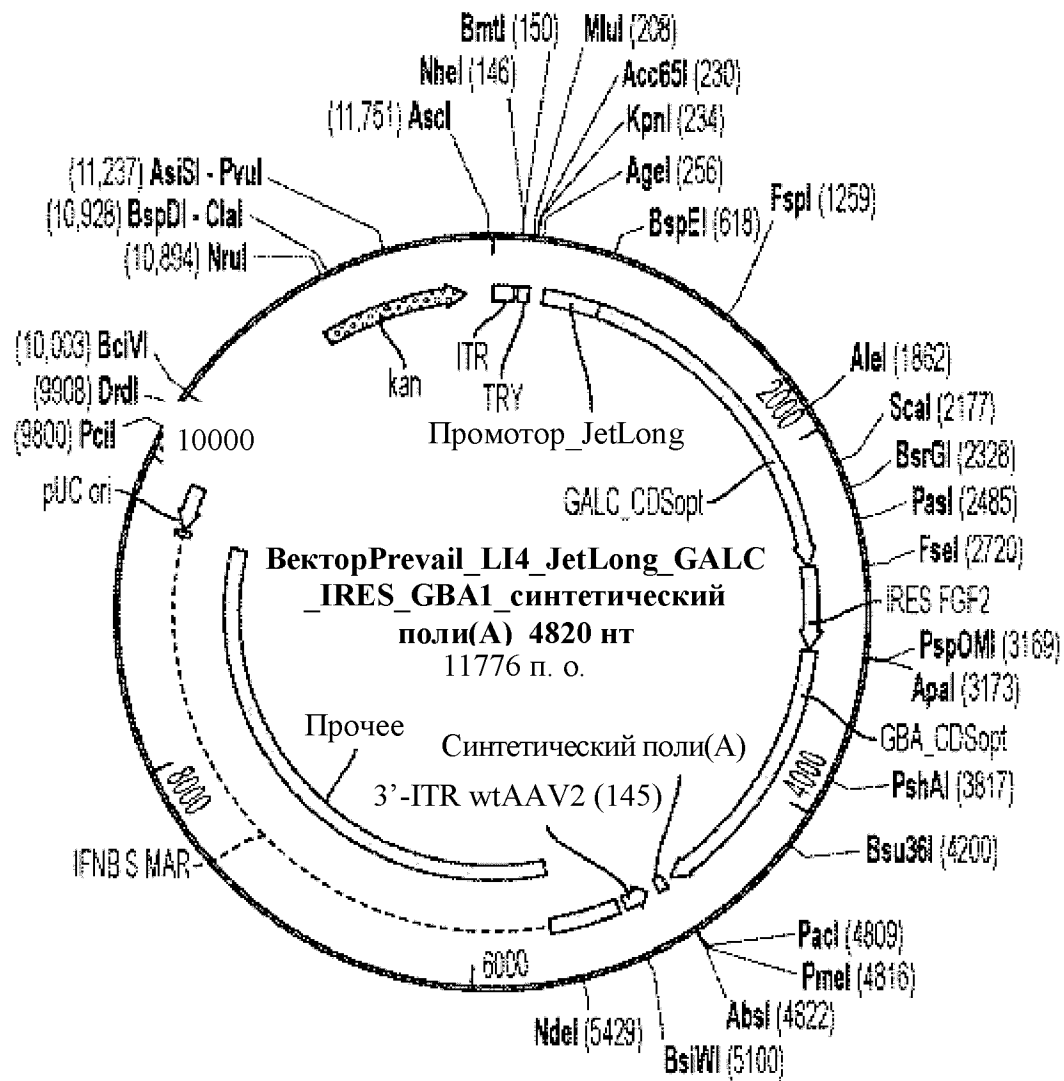
ФИГ. 20



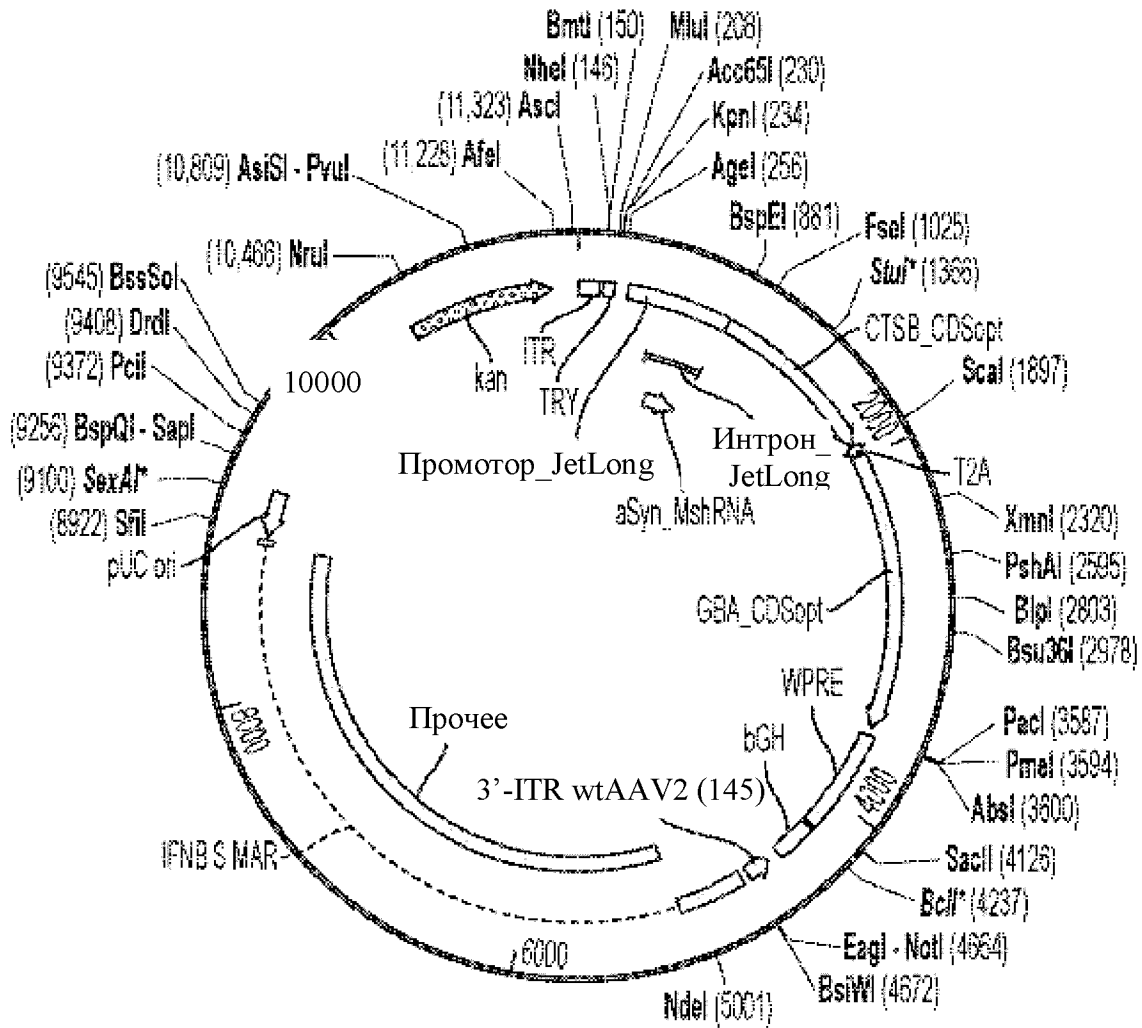
ФИГ. 21



ФИГ. 22

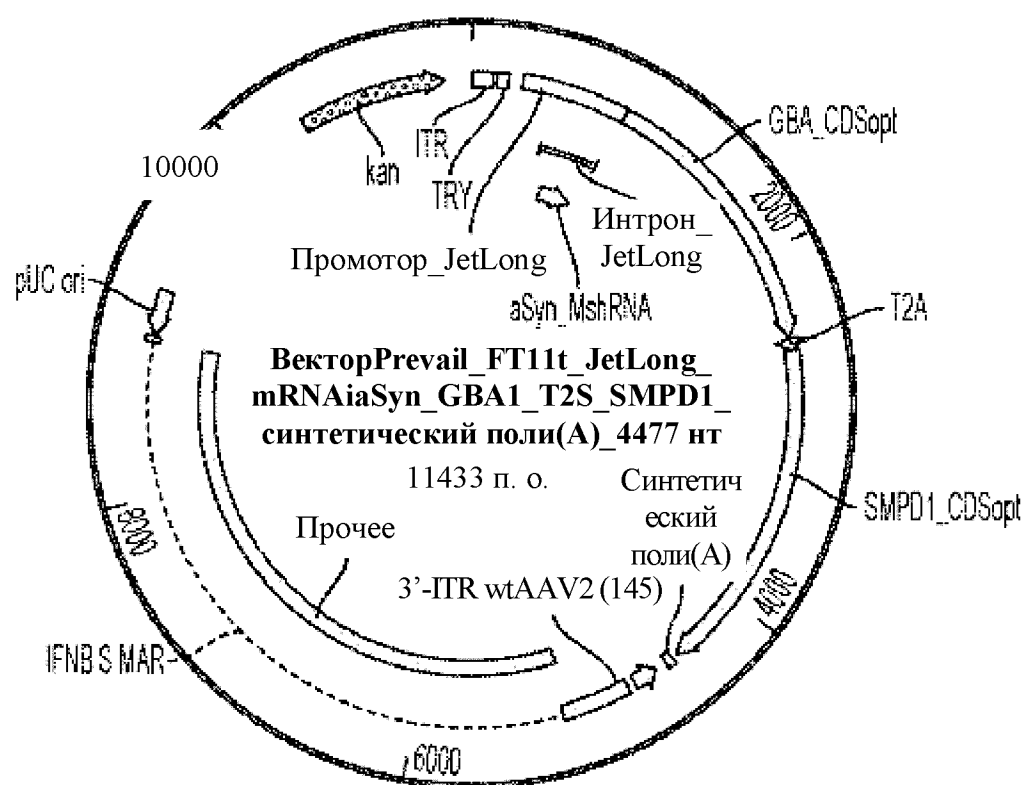


ФИГ. 23

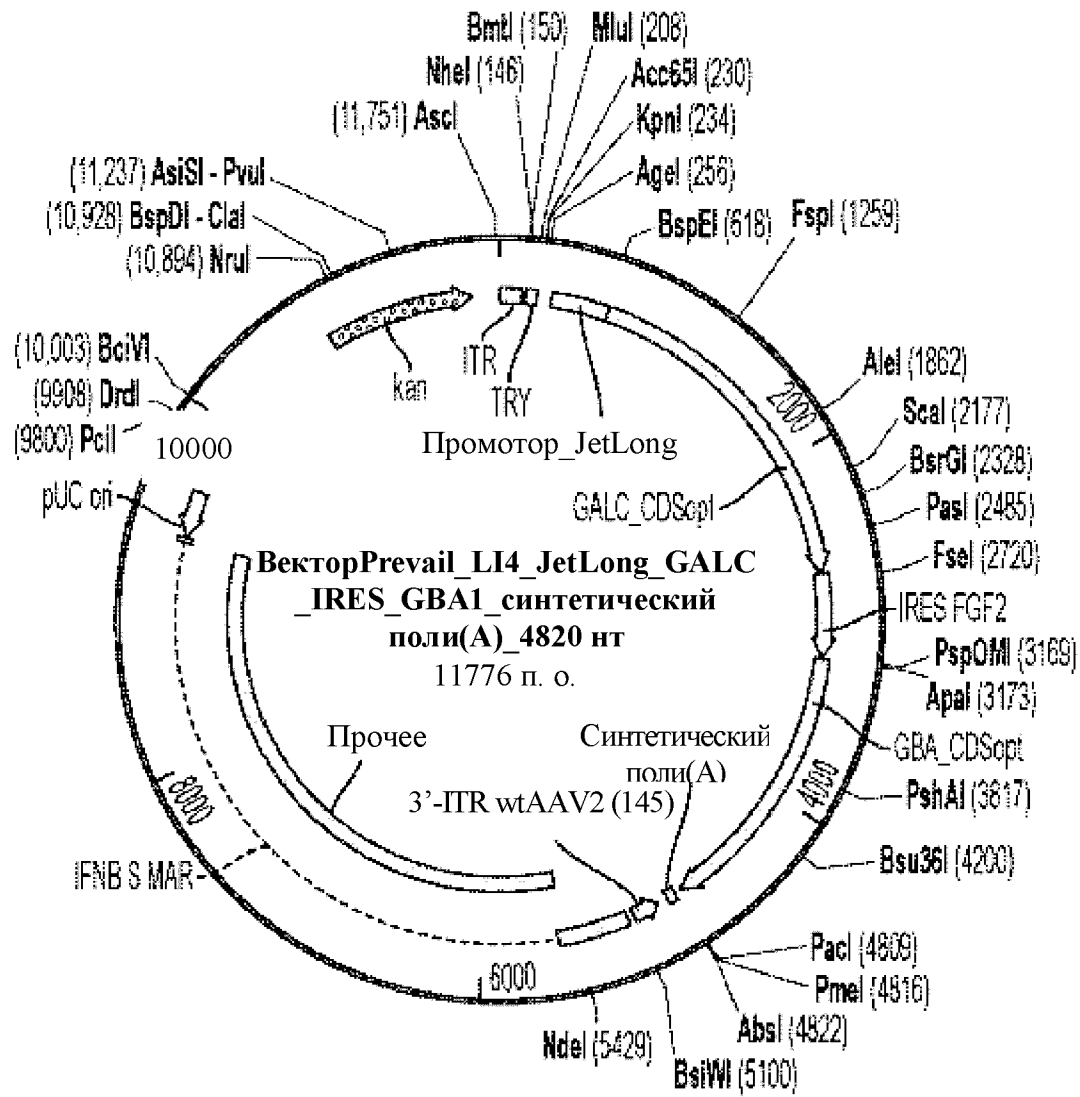


ВекторPrevail_LTSs_JetLong_mRNAiaSyn_CTSB-T2A-GBA1_WPRE_bGH_4392 нт
11348 п. о.

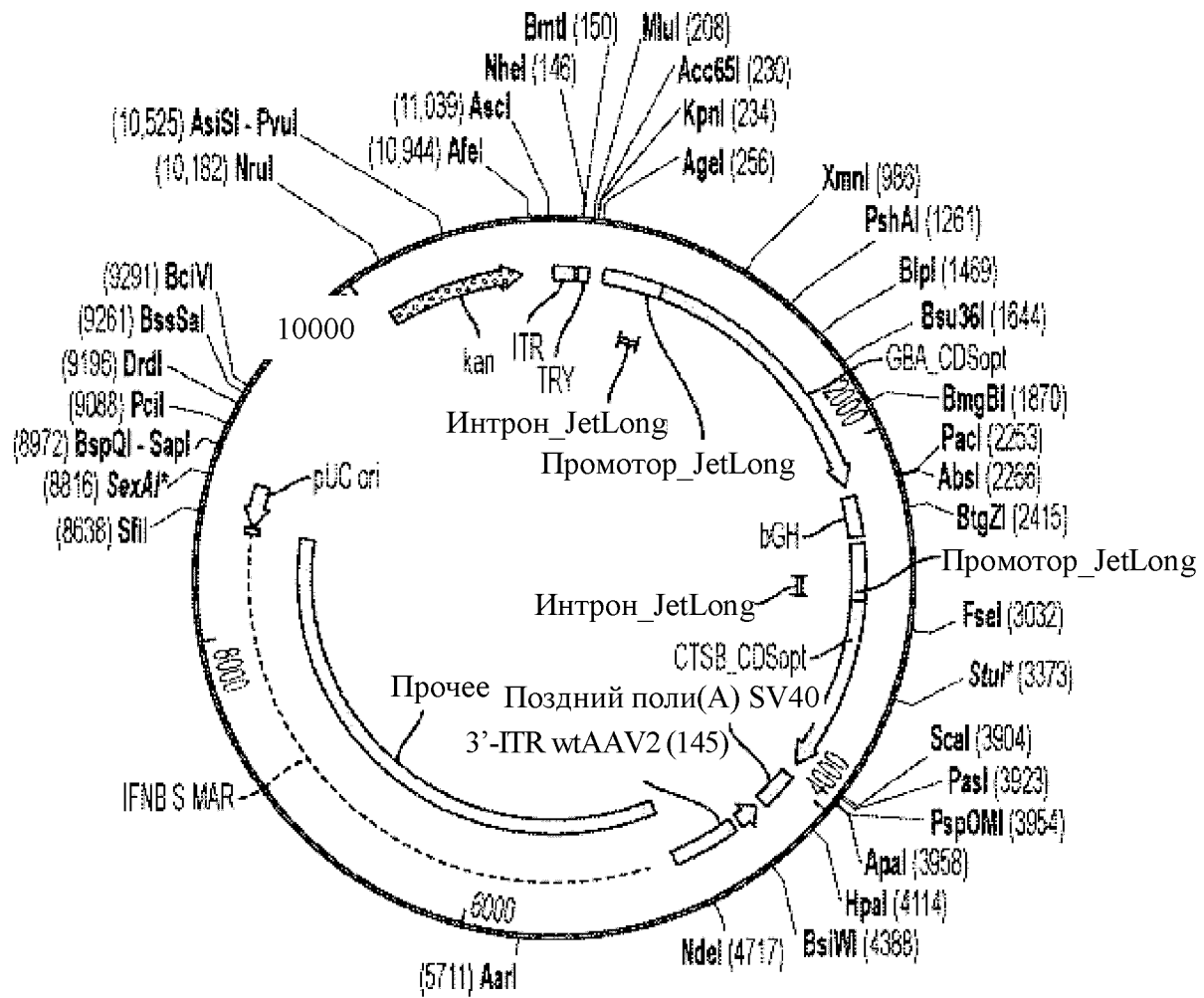
ФИГ. 24

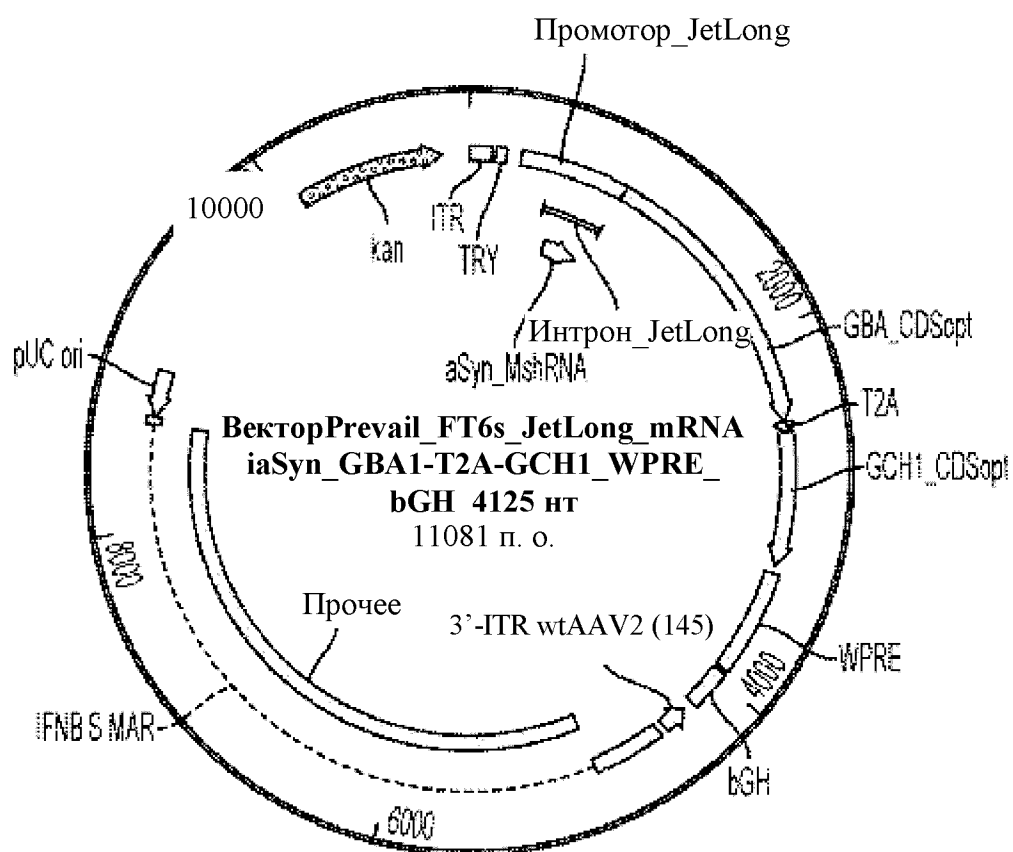


ФИГ. 25

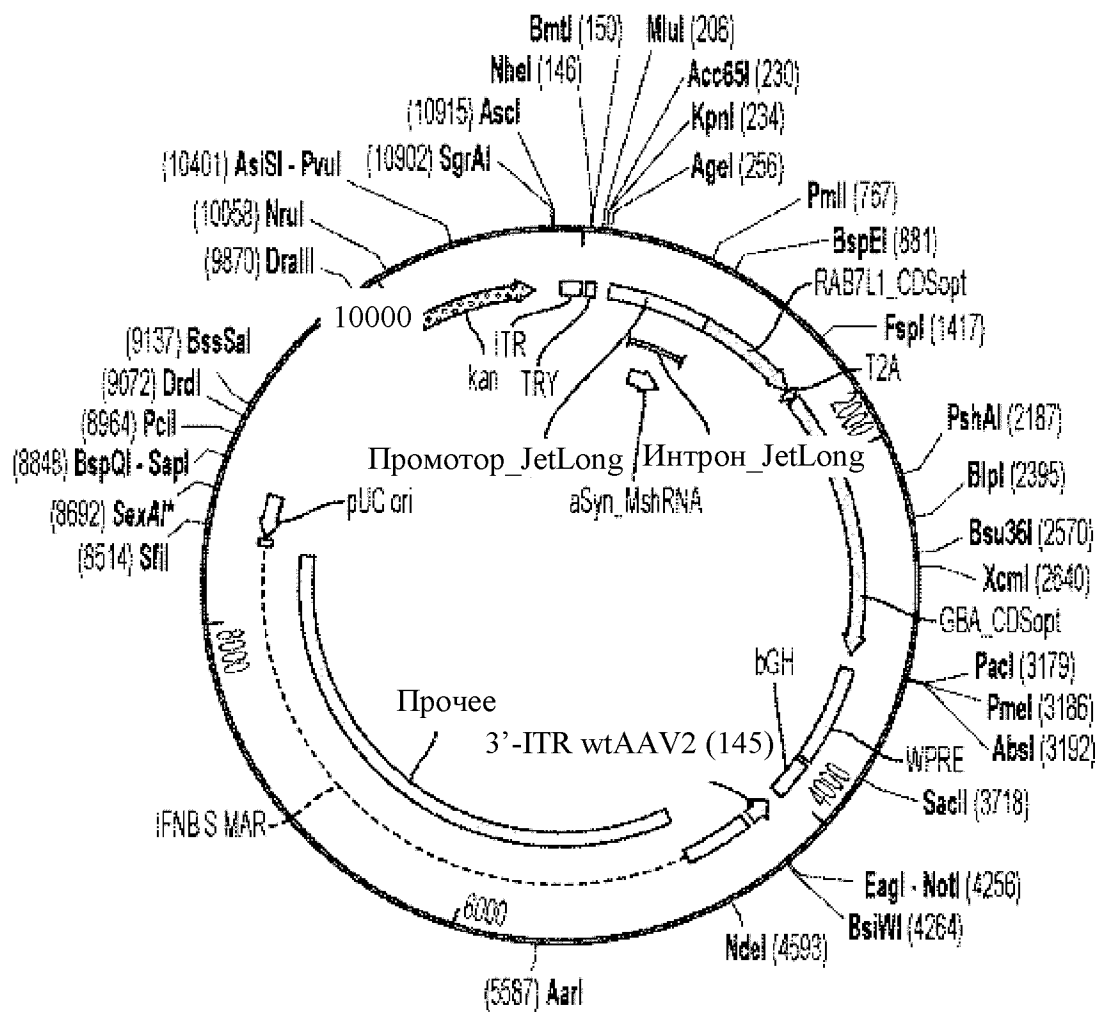


ФИГ. 26





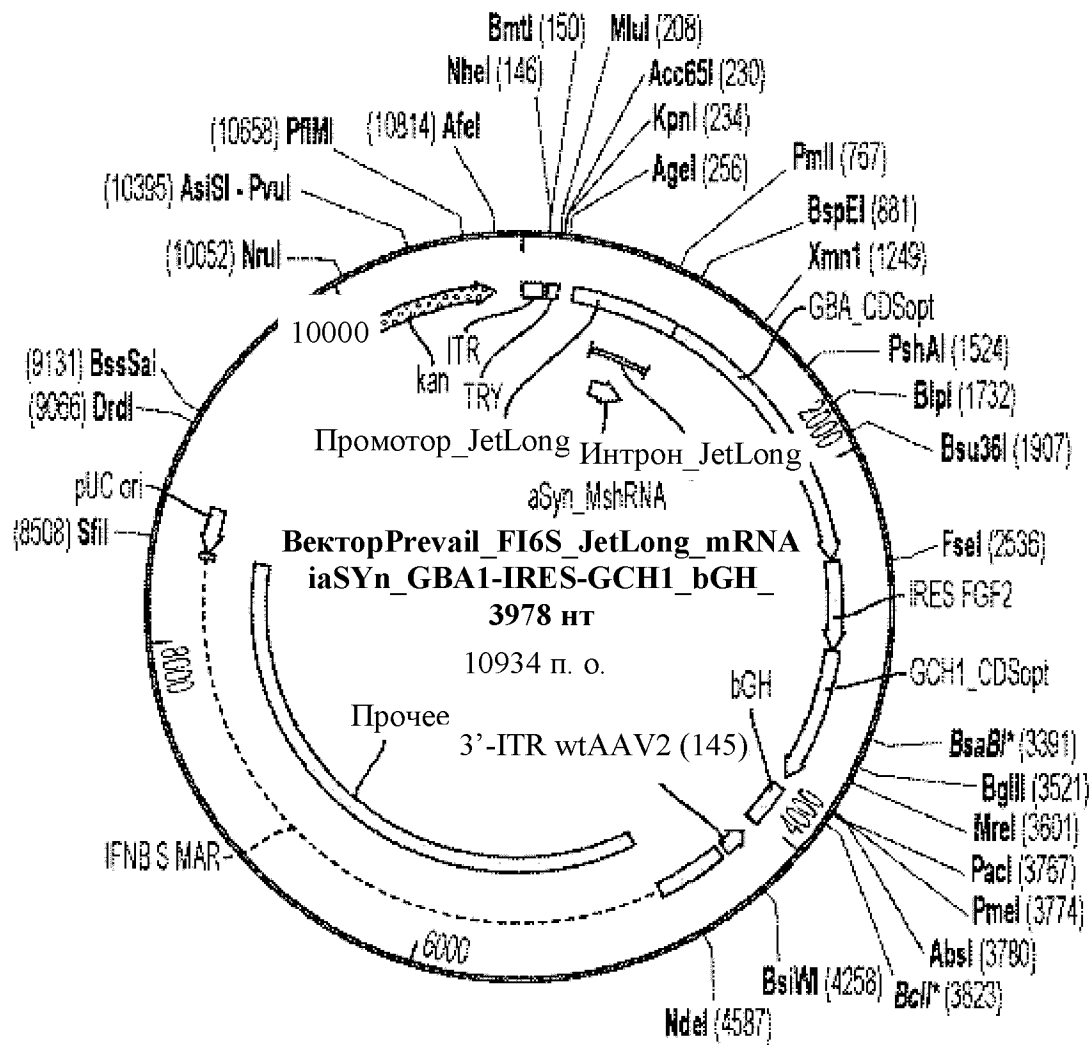
ФИГ. 28



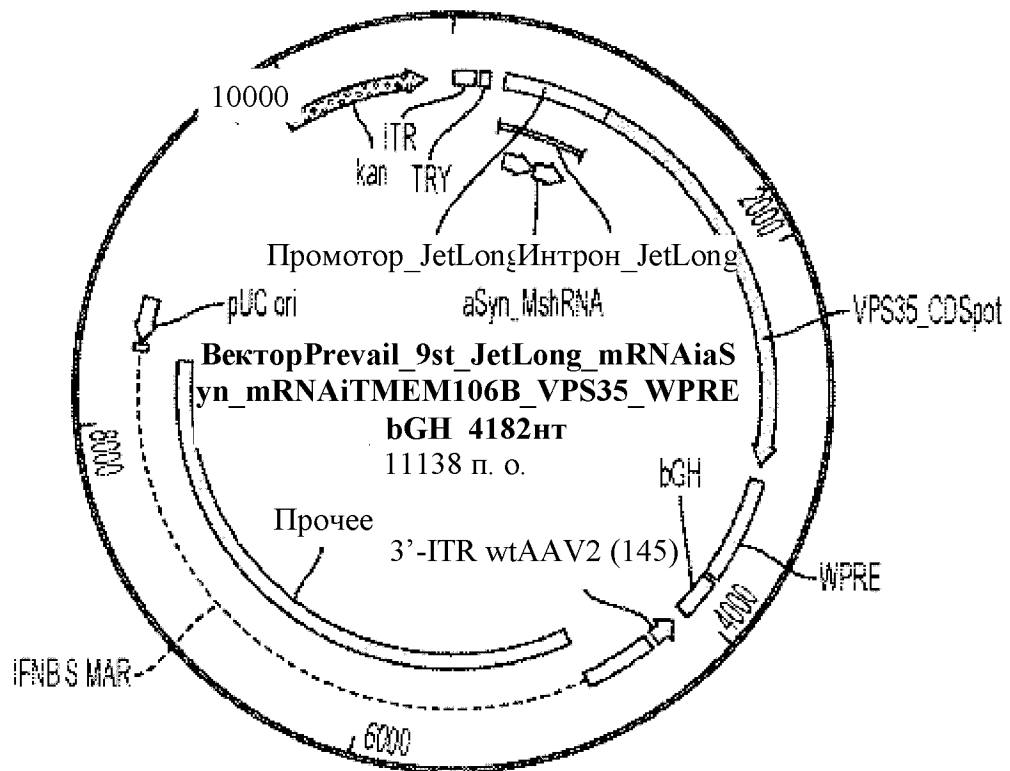
ВекторPrevail_LT7s_JetLong_mRNAiaSyn_RAB7L1-T2A-GBA1_WPRE_bGH_3984 HT

10940 п. о.

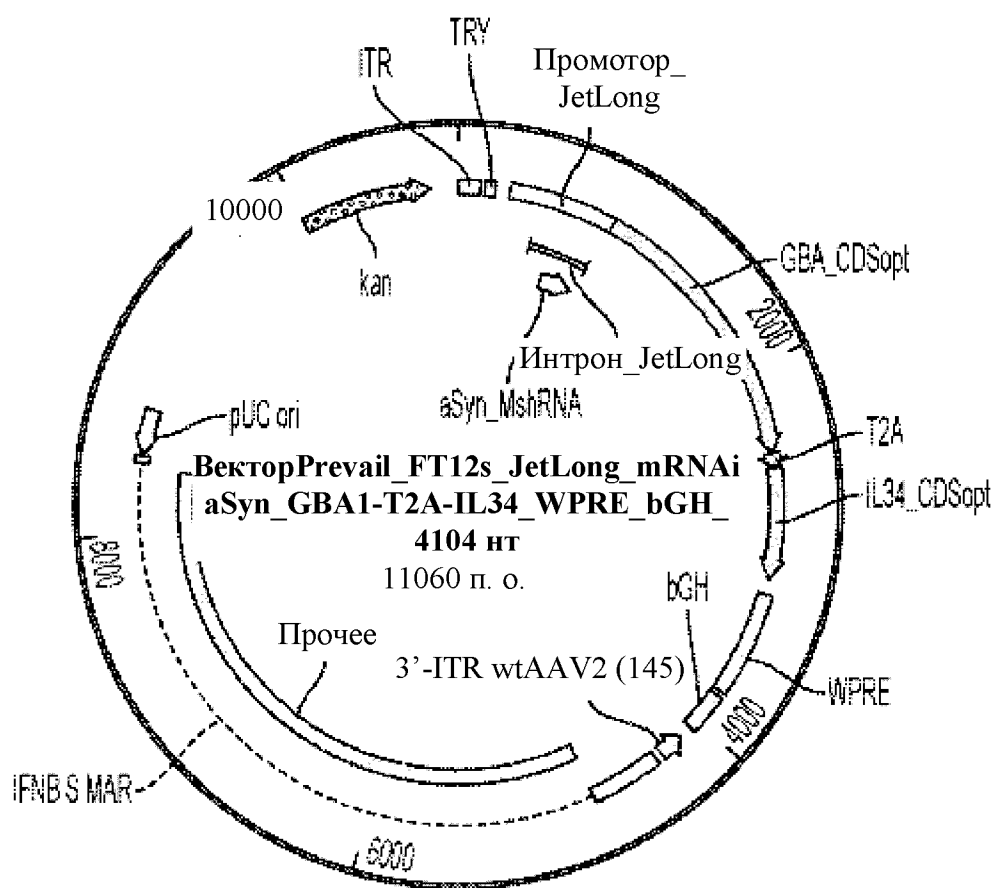
ФИГ. 29



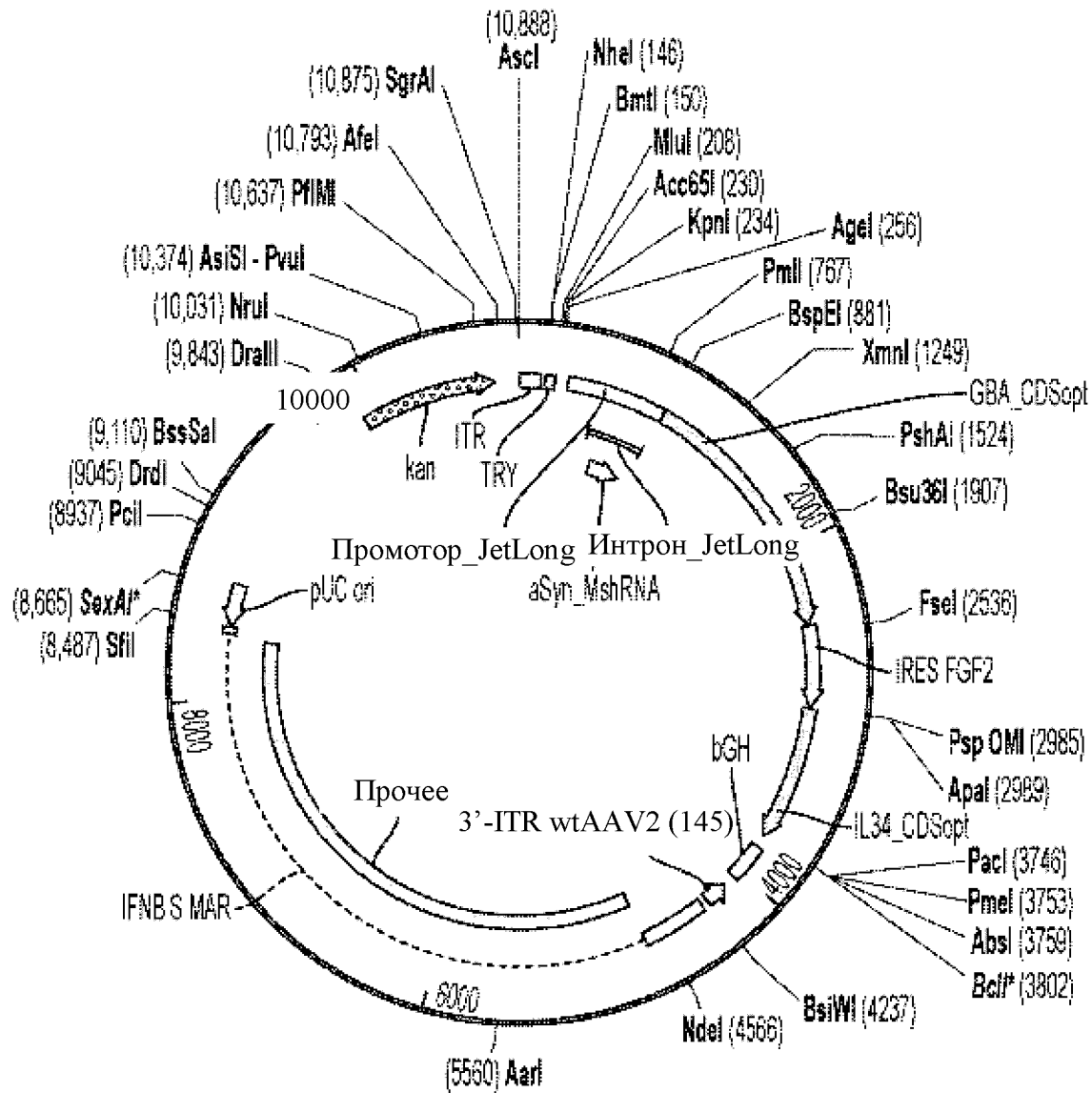
ФИГ. 30



ФИГ. 31

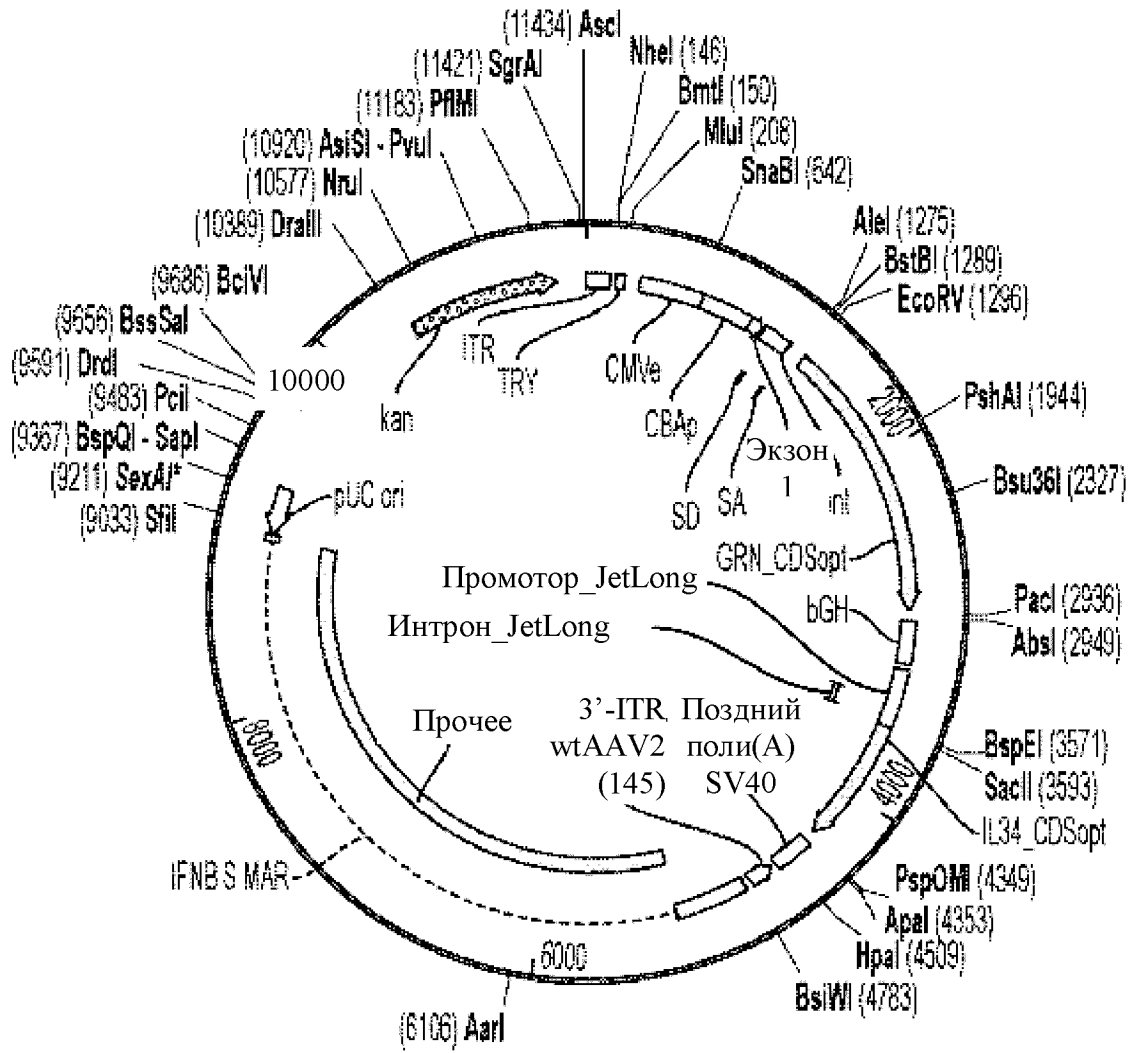


ФИГ. 32



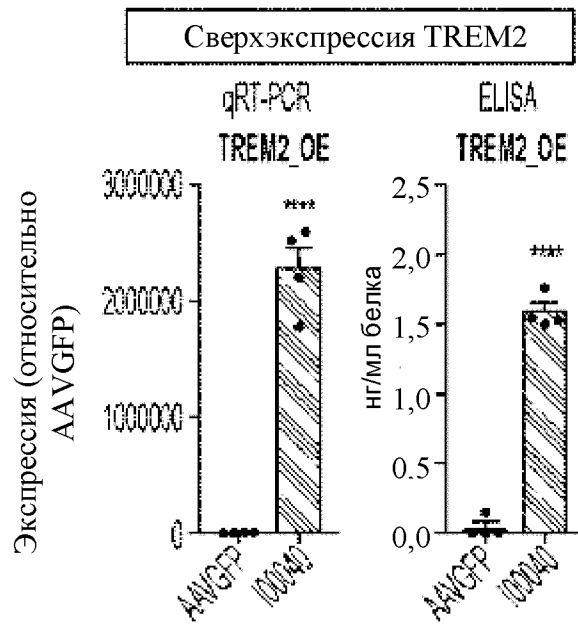
ВекторPrevail_FI12s_JetLong_mRNAiaSYn_GBA1-IRES-IL34_bGH_3957 нт
10913 п. о.

ФИГ. 33

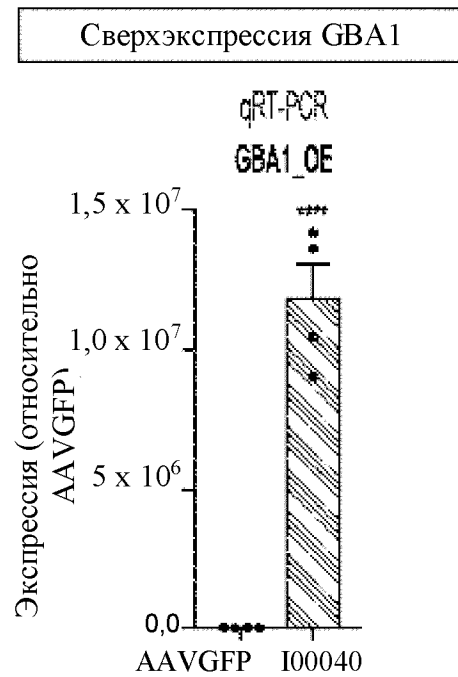


ВекторPrevail_FP12_CMVe_CBA_GBA1_bGH_JetLong_IL34_SV401_4503 нт
11459 п. о.

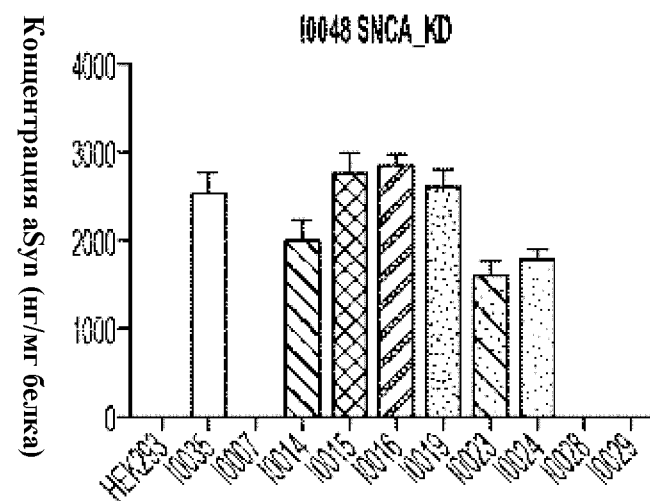
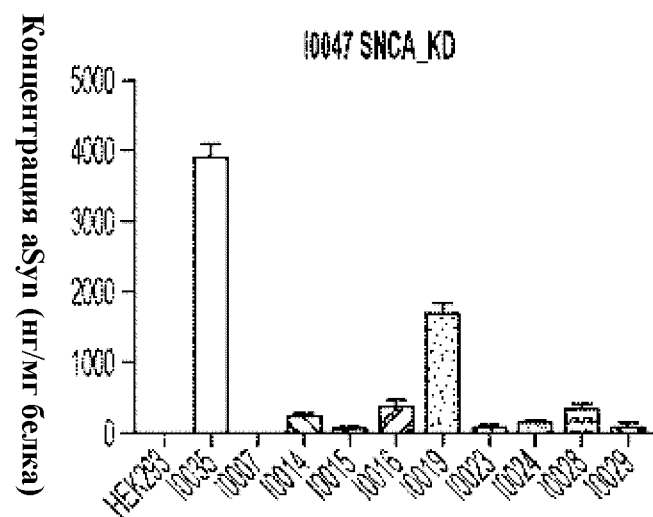
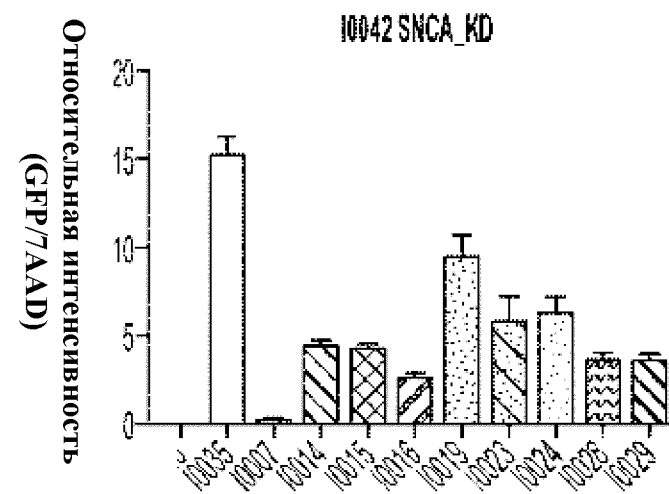
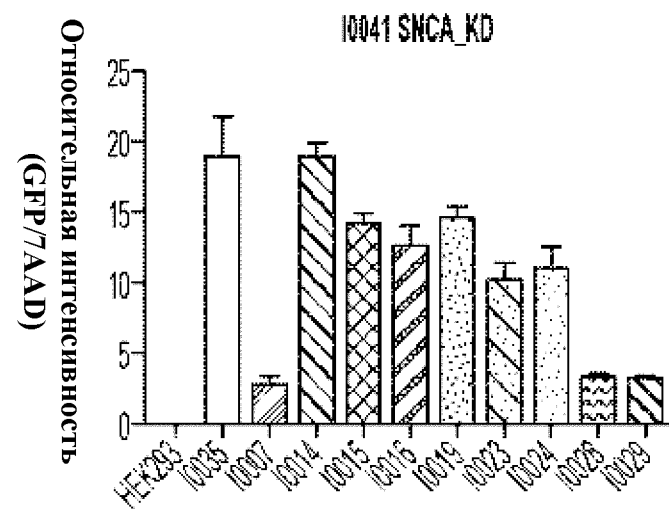
ФИГ. 35



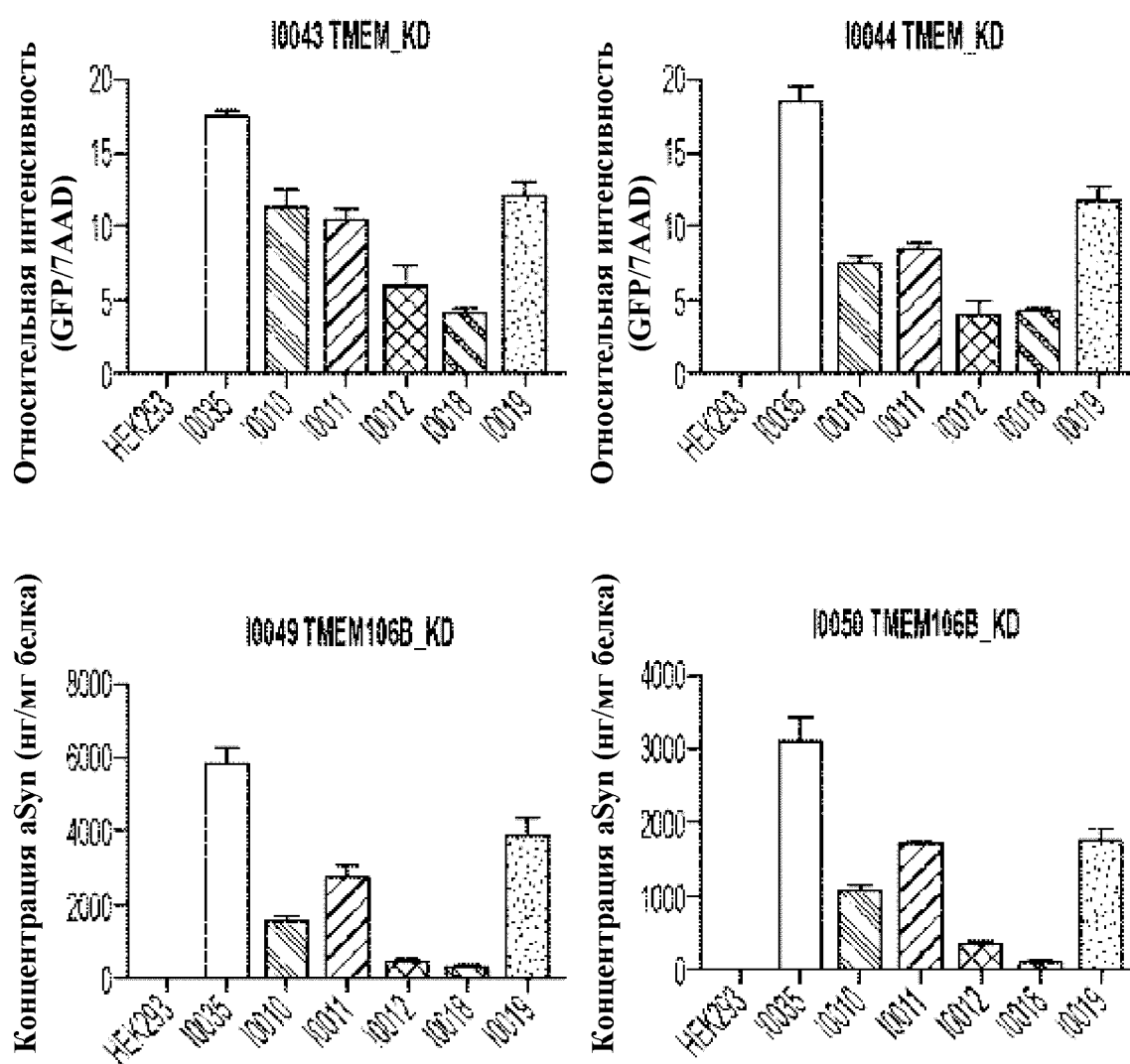
ФИГ. 36А



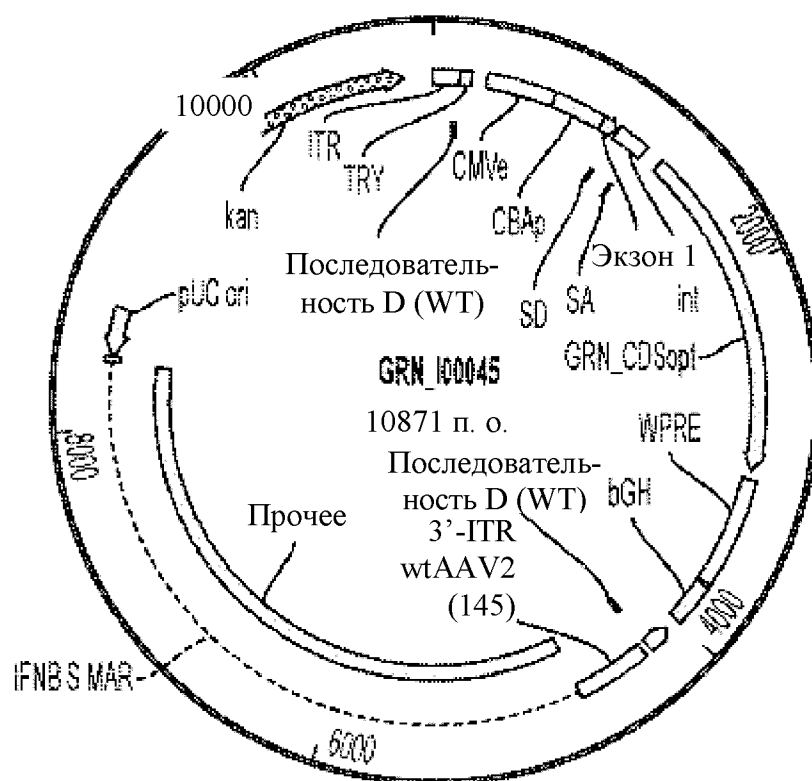
ФИГ. 36В



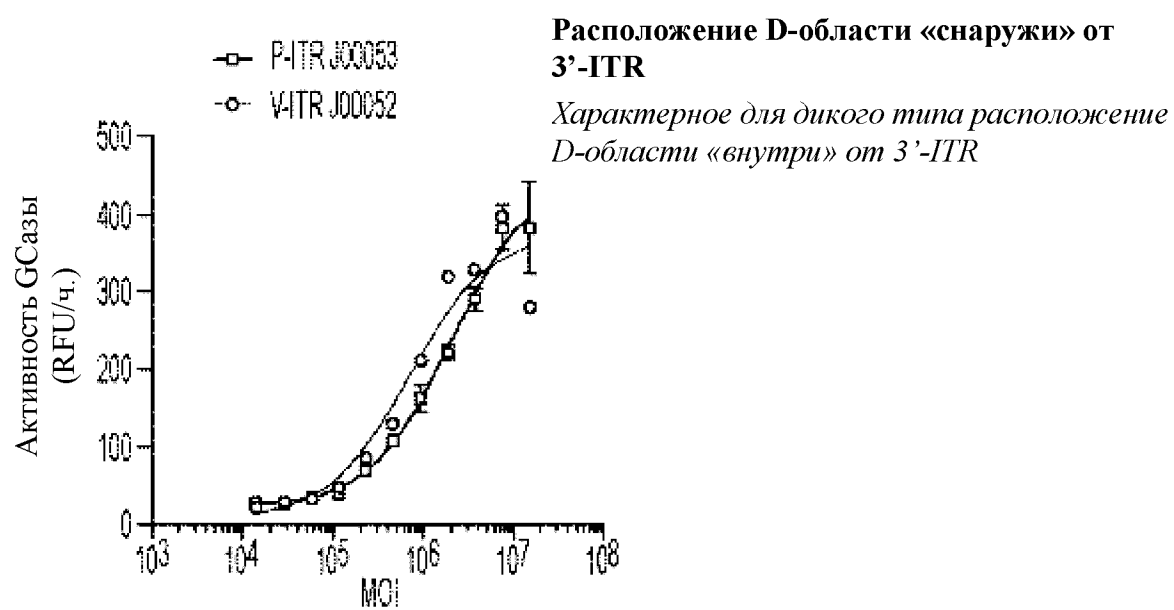
ФИГ. 37



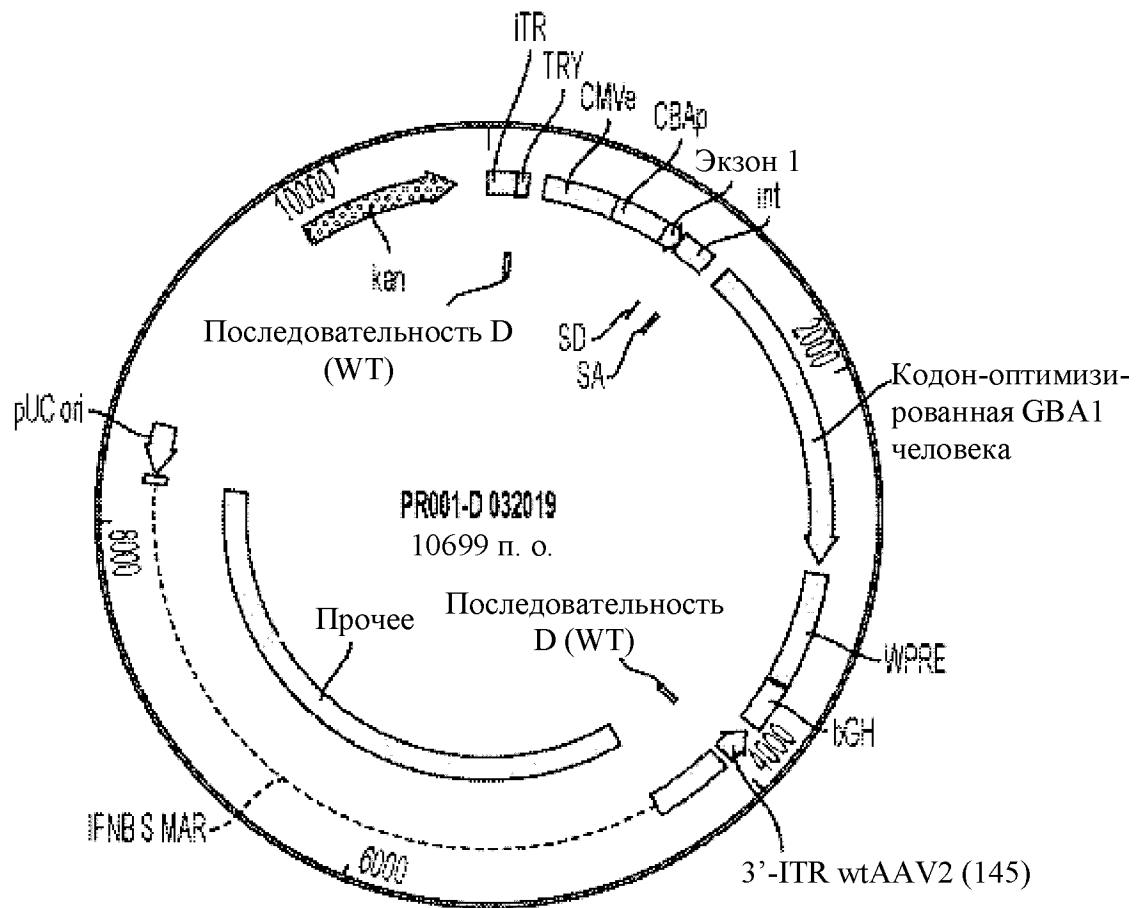
ФИГ. 38



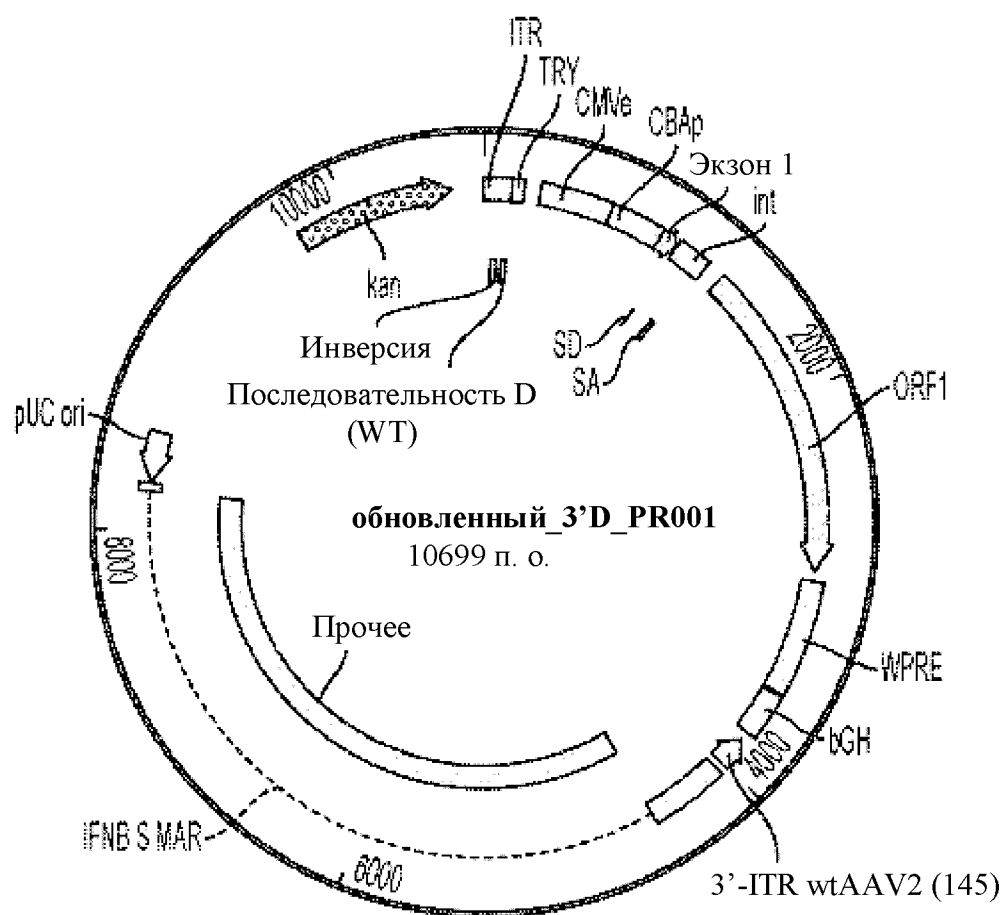
ФИГ. 39



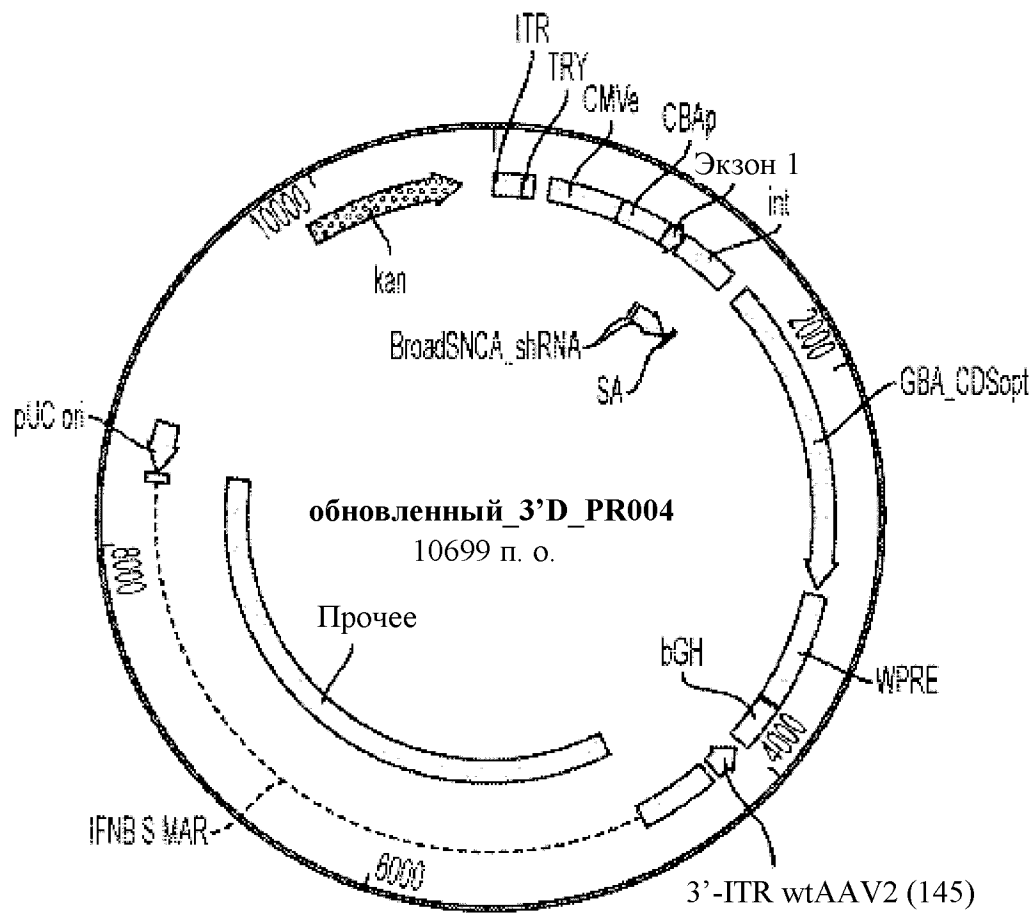
ФИГ. 40



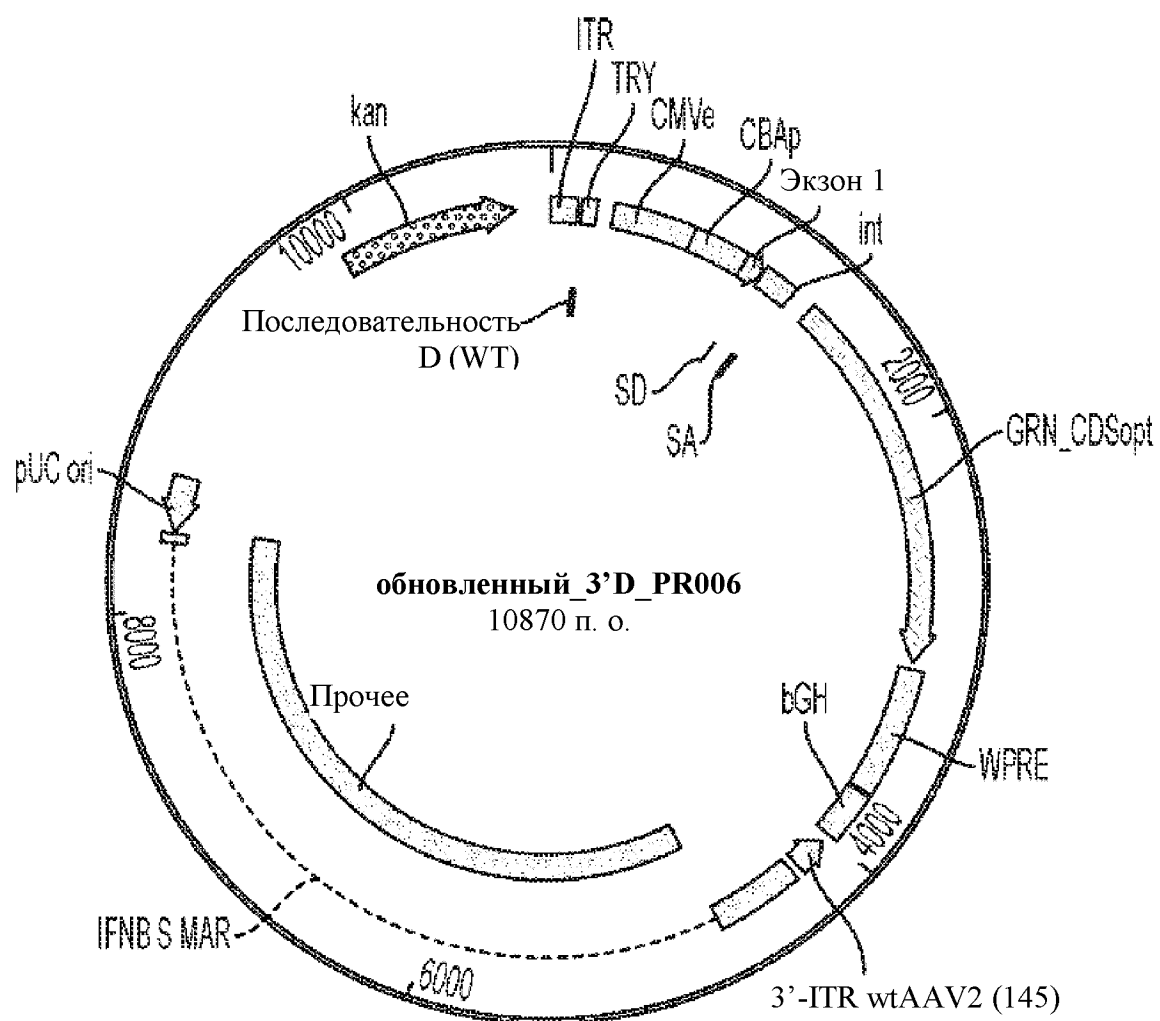
ФИГ. 41



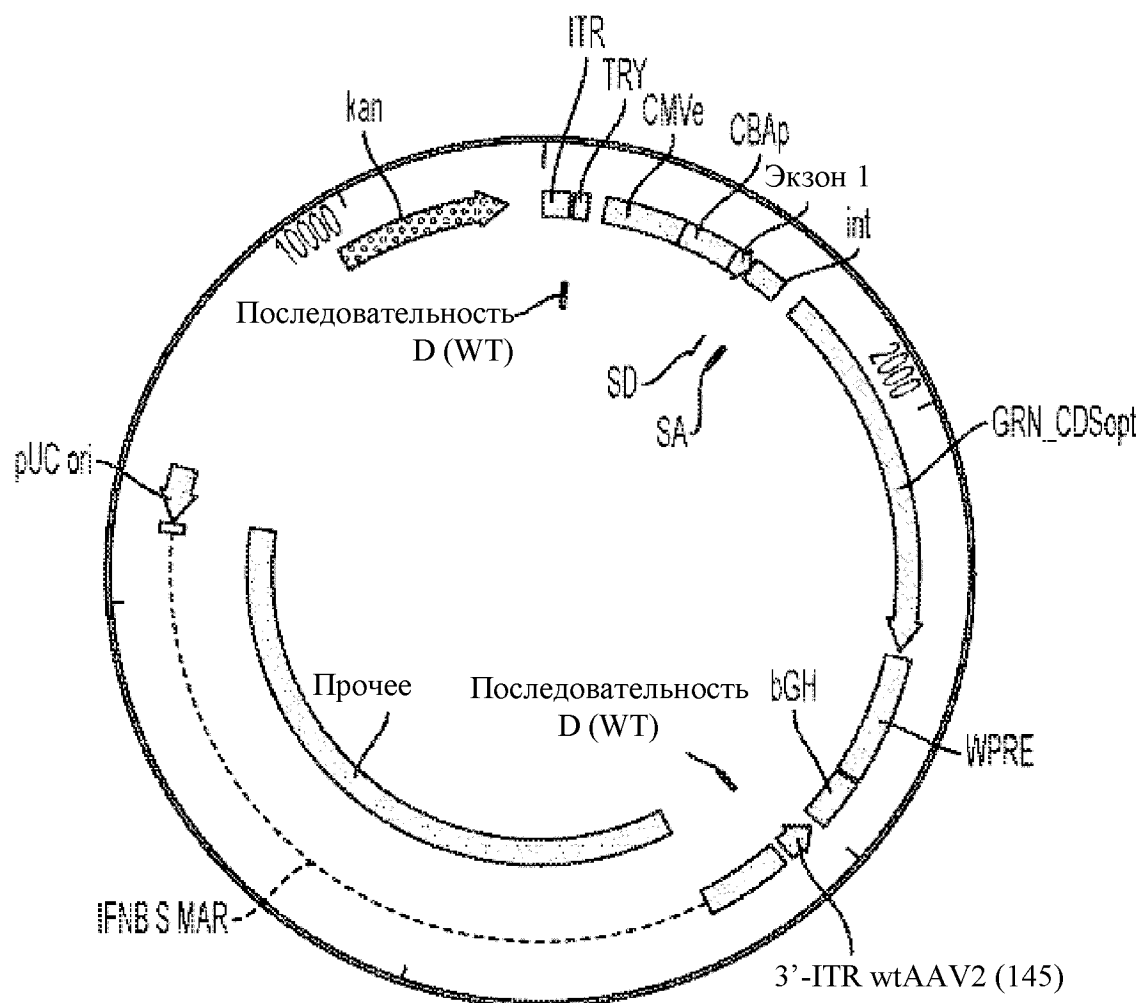
ФИГ. 42



ФИГ. 43



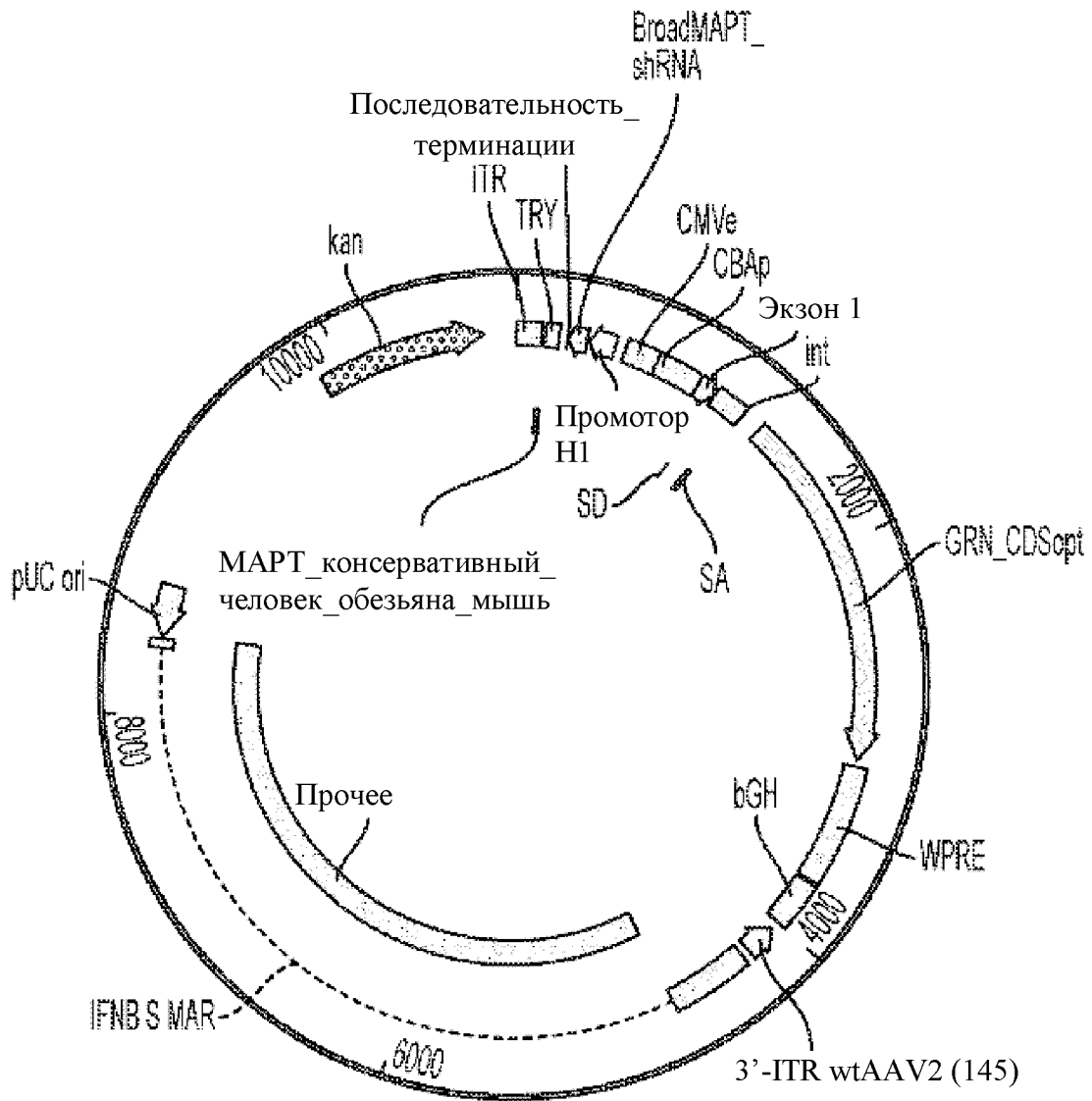
ФИГ. 44



обновленный_38.GRM_PW_выровненный VM и P (1)

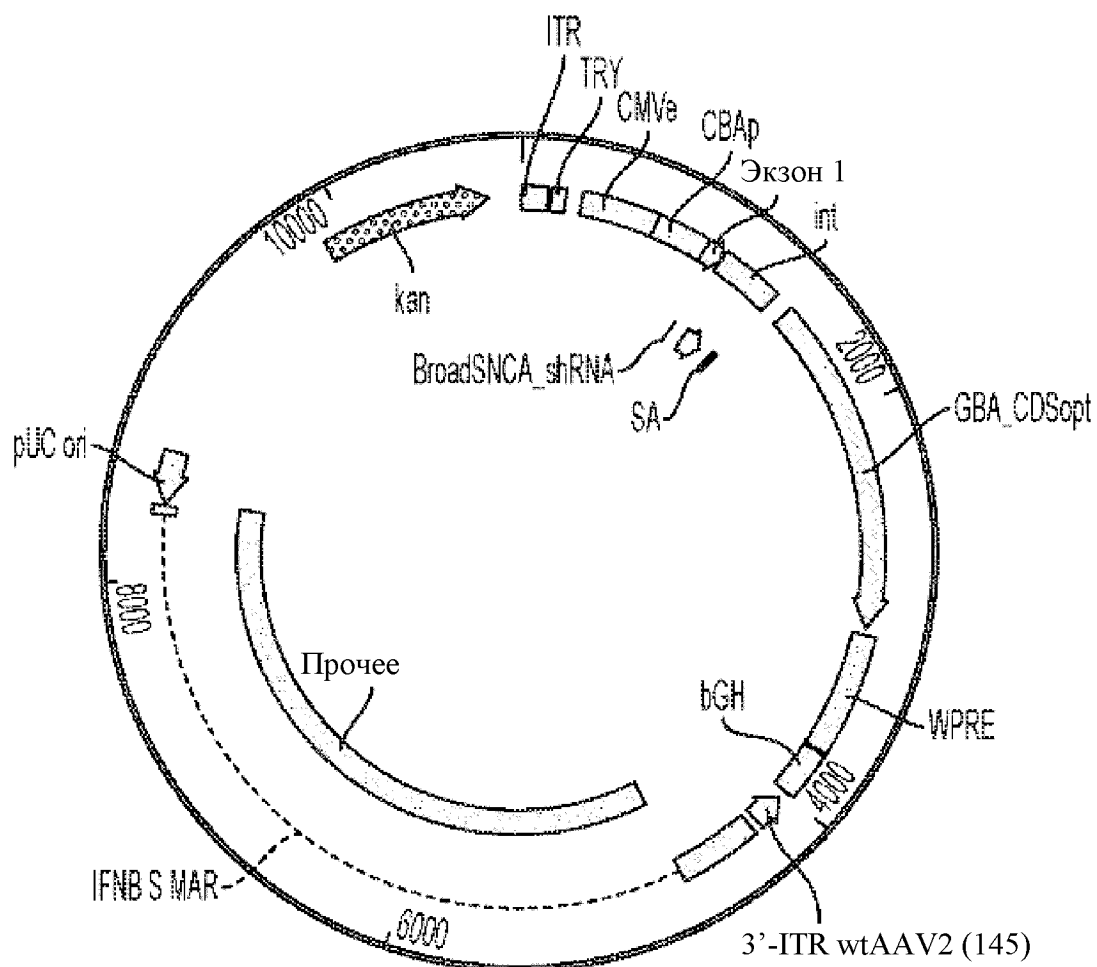
10870 п. о.

ФИГ. 45



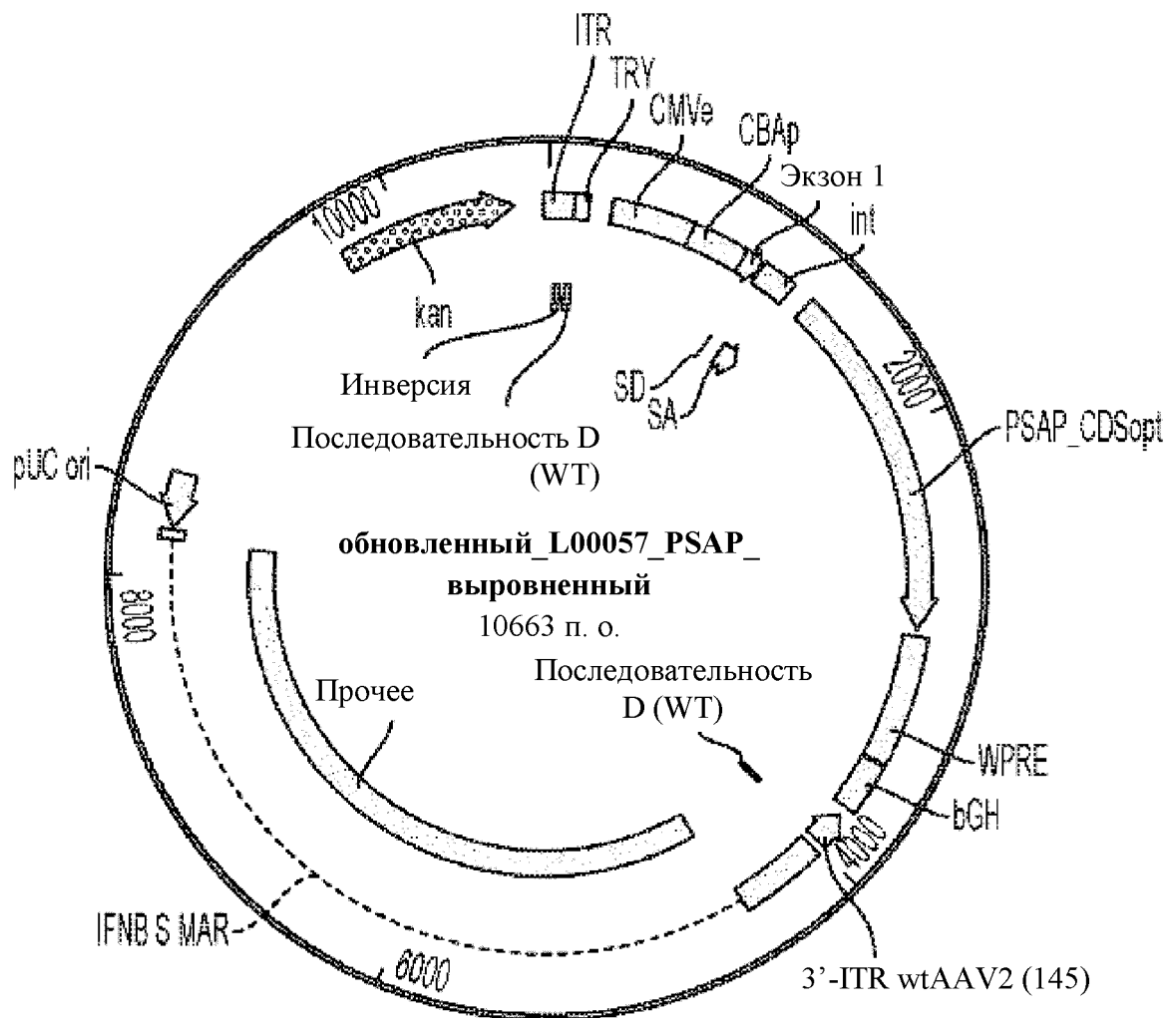
обновленный_H1_Broad_консервативный
 MAPTshRNA_GRN_выровненный
 11264 п. о.

ФИГ. 46

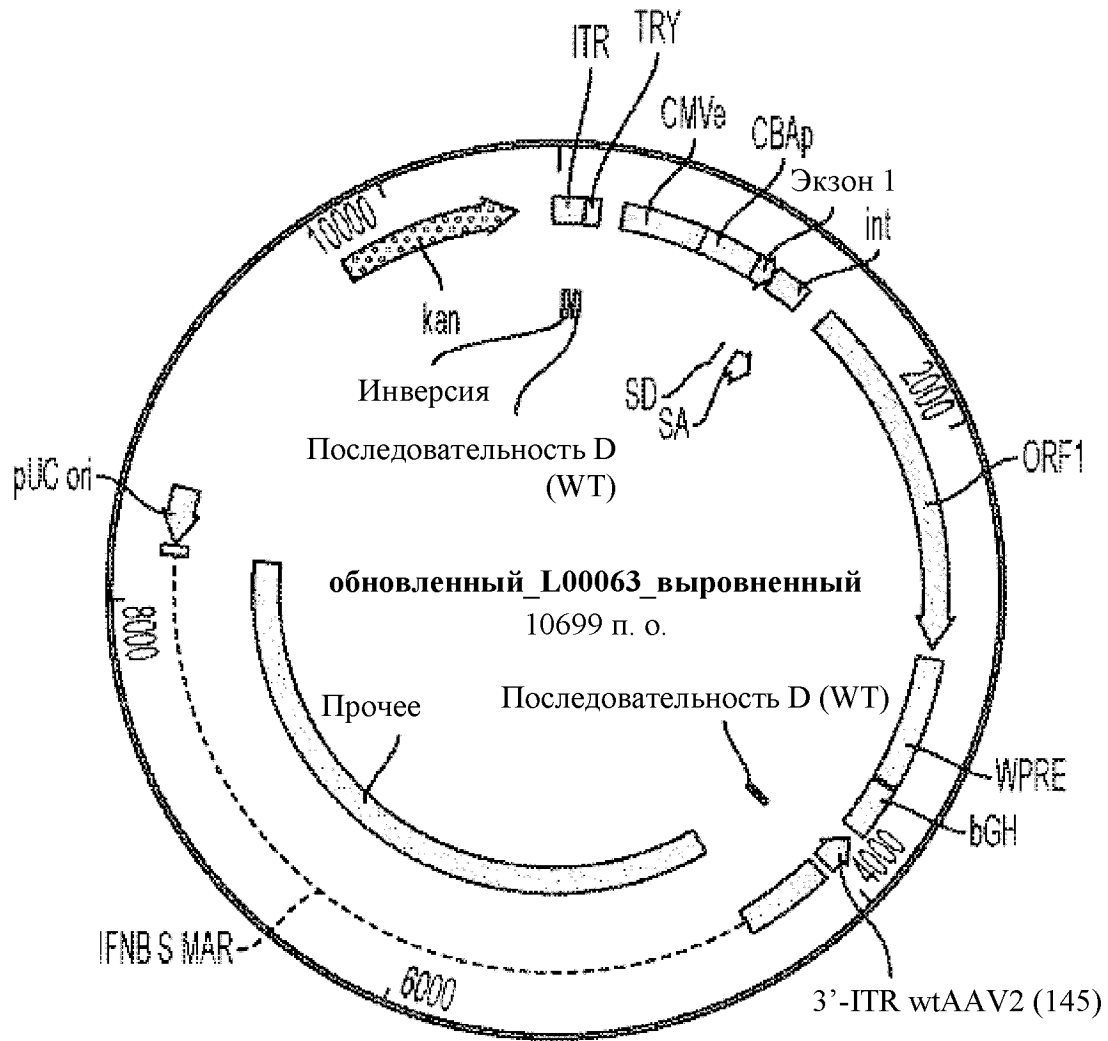


Обновленный_интронный_SNCA_Broad_sh_GBA1_выровненный
10848 п. о.

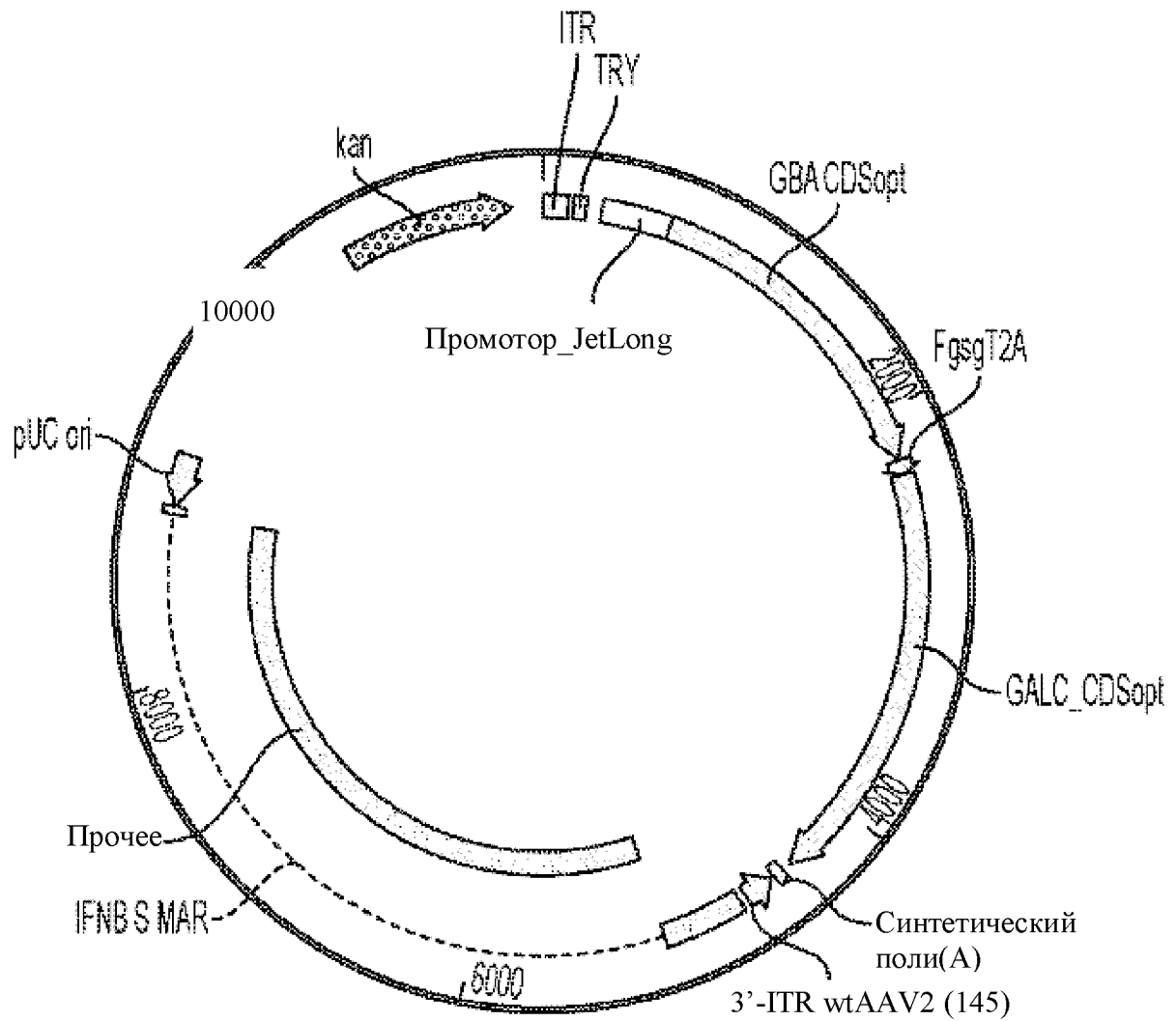
ФИГ. 47



ФИГ. 48

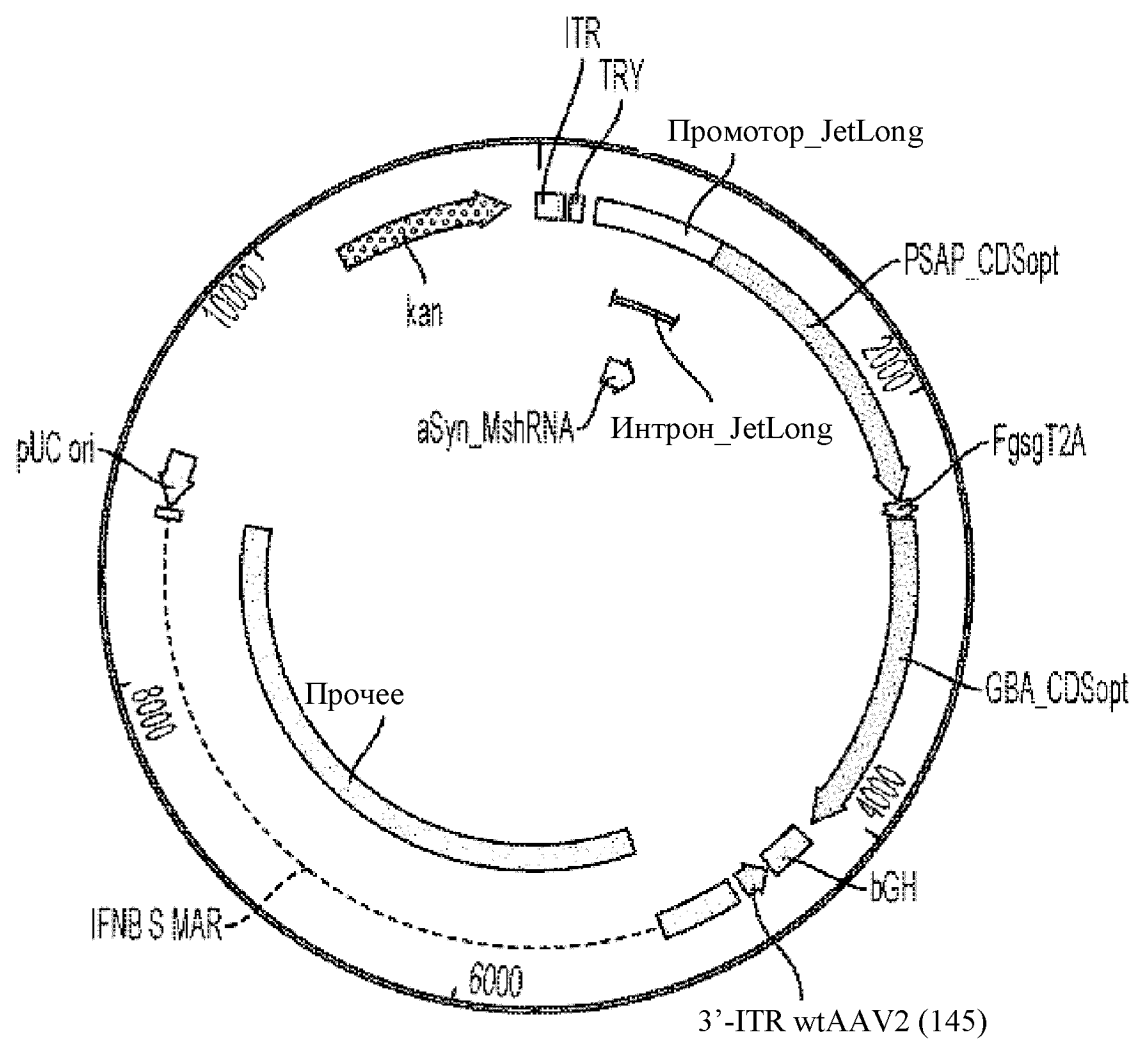


ФИГ. 49



обновленный_ВекторPrevail_FT4_JetLong_GBA1_FgsgT2A_GALC_
синтетический поли(А)_4394 нт_выровненный
 11311 п. о.

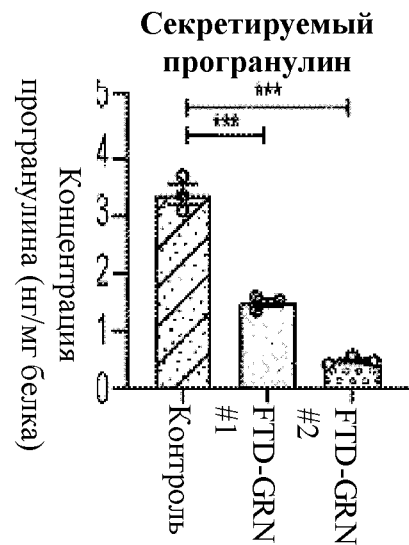
ФИГ. 50



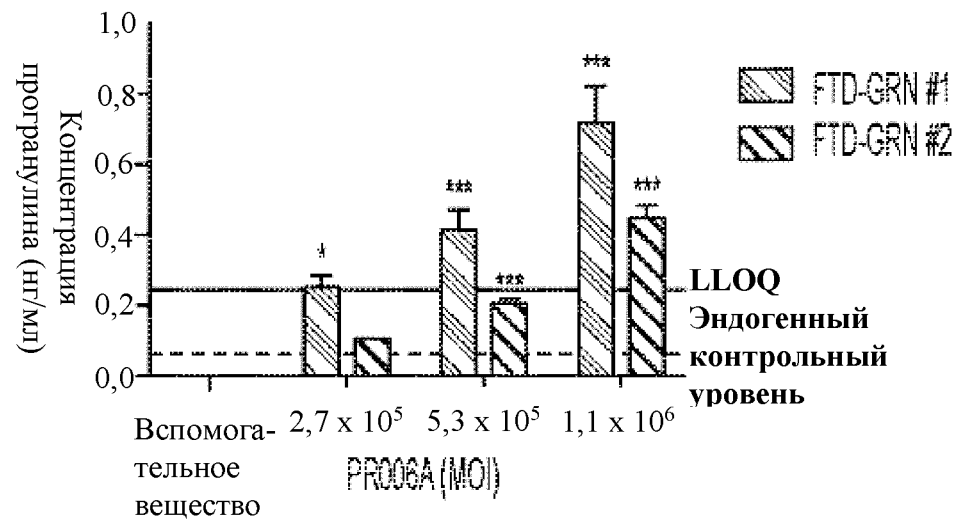
обновленный_ВекторPrevail_LT2s_JetLong_mRNAiaSYn_PSAP-FgsgT2A-GBA1_bGH_4374 нт_выровненный

11292 п. о.

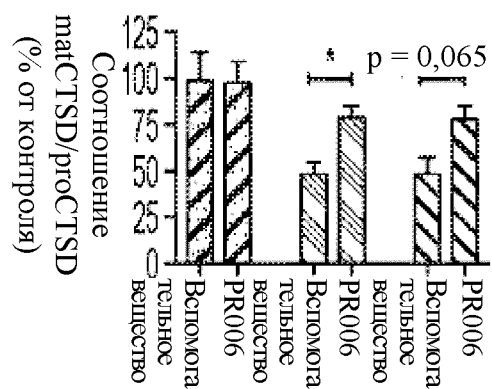
ФИГ. 51



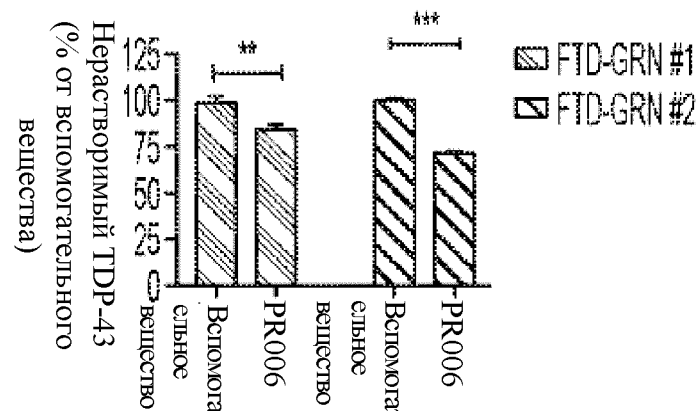
ФИГ. 52А



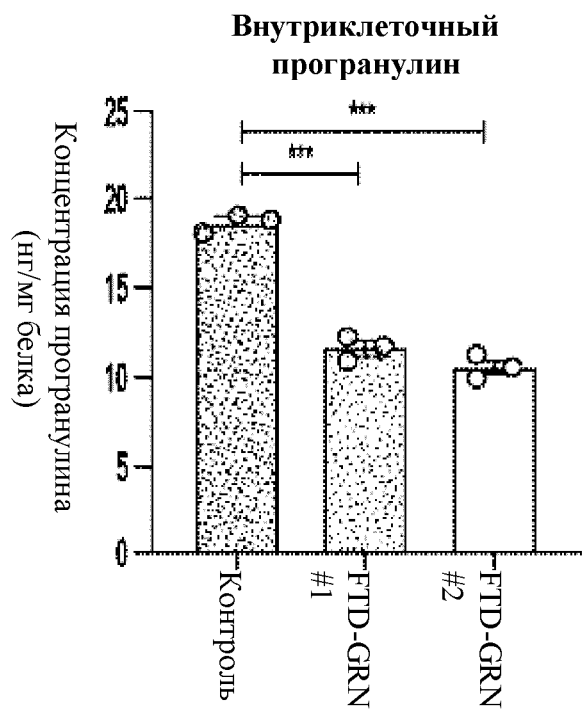
ФИГ. 52В



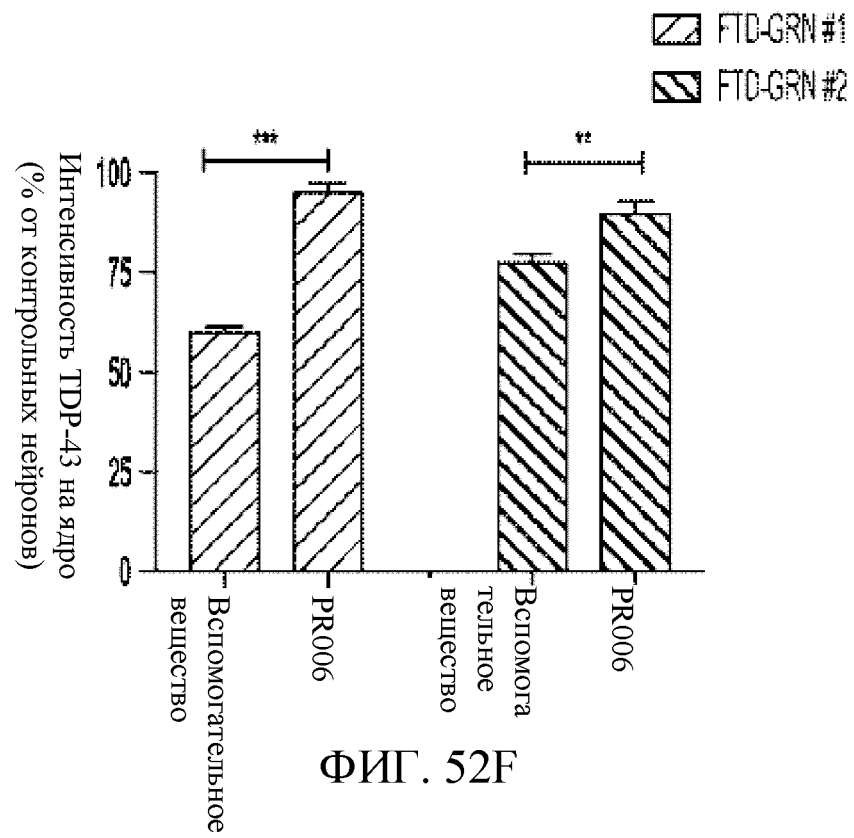
ФИГ. 52С



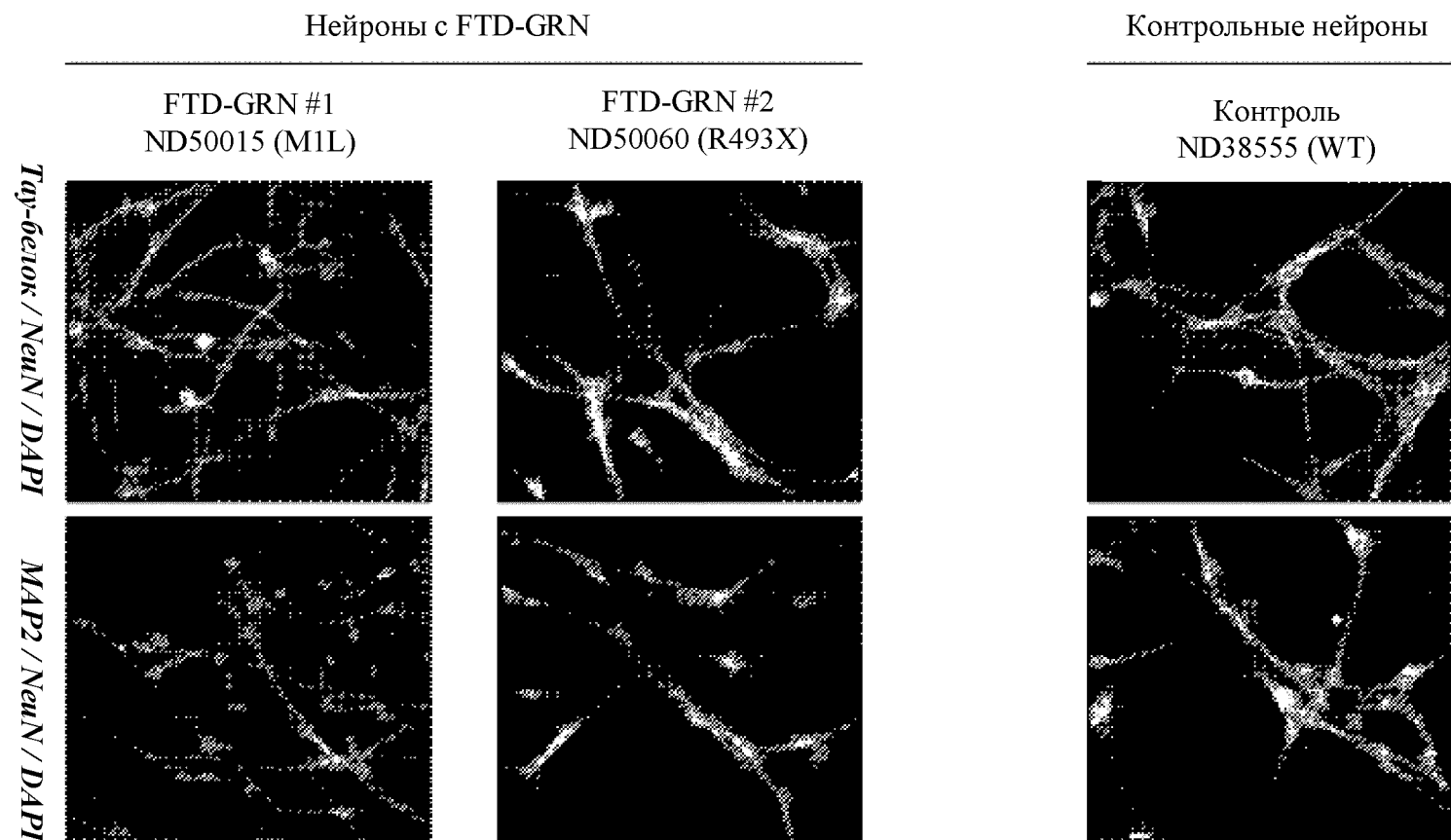
ФИГ. 52D



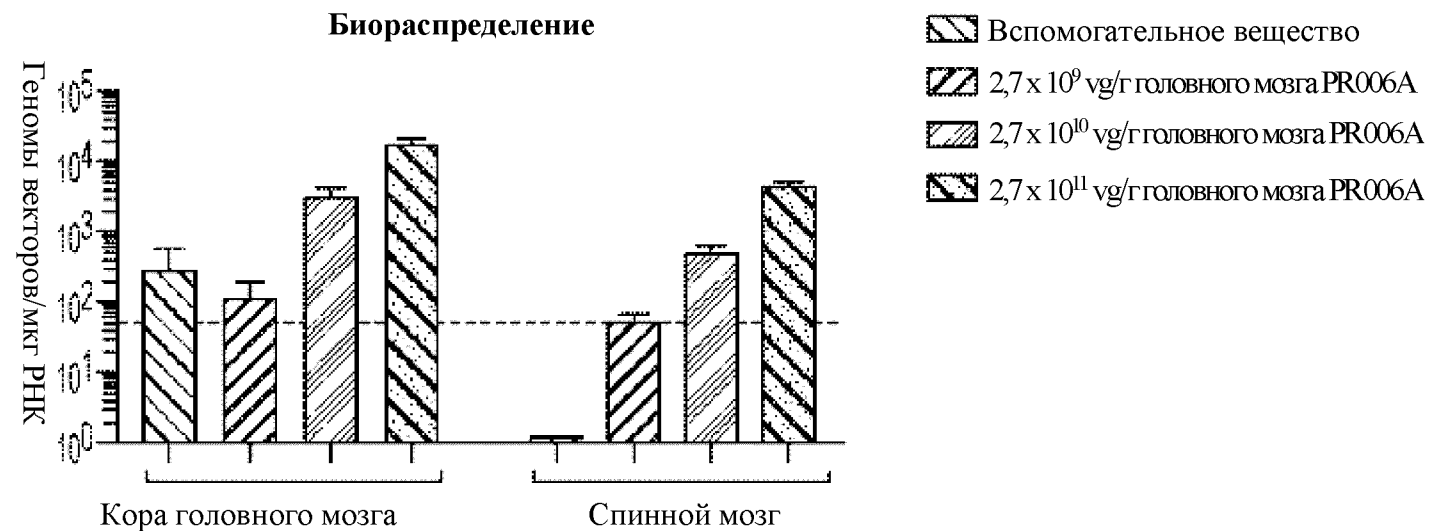
ФИГ. 52E



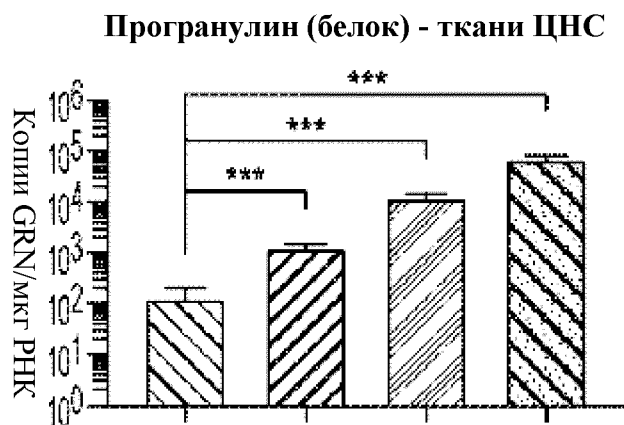
ФИГ. 52F



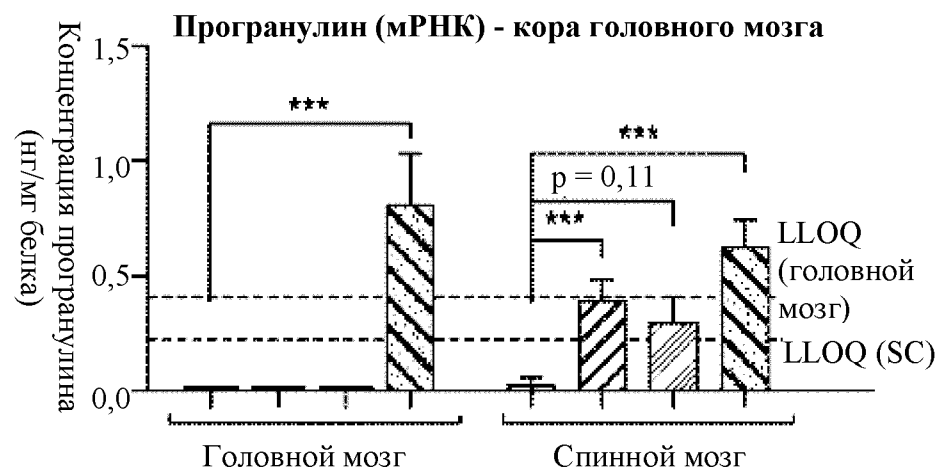
ФИГ. 52G



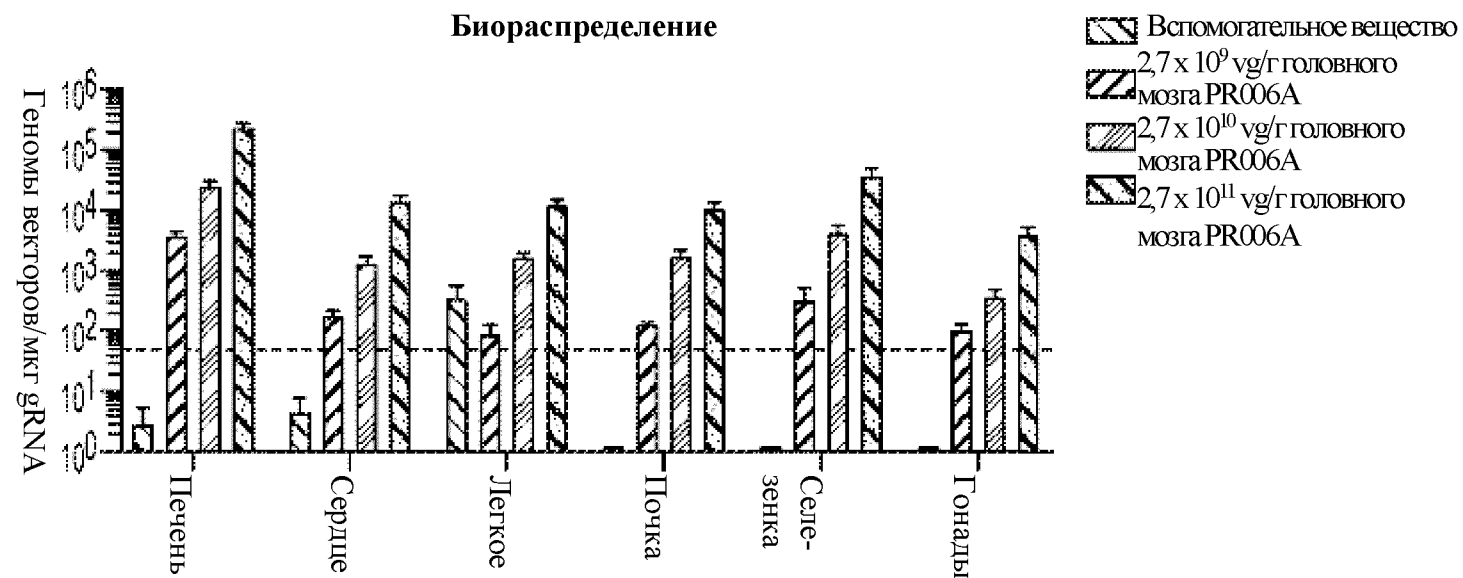
ФИГ. 53А



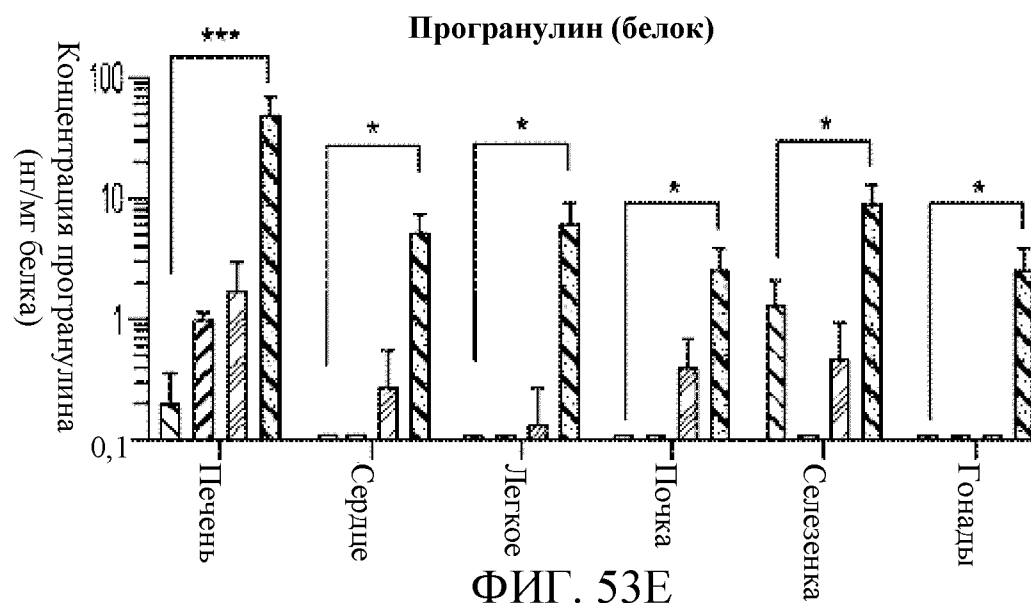
ФИГ. 53В



ФИГ. 53С

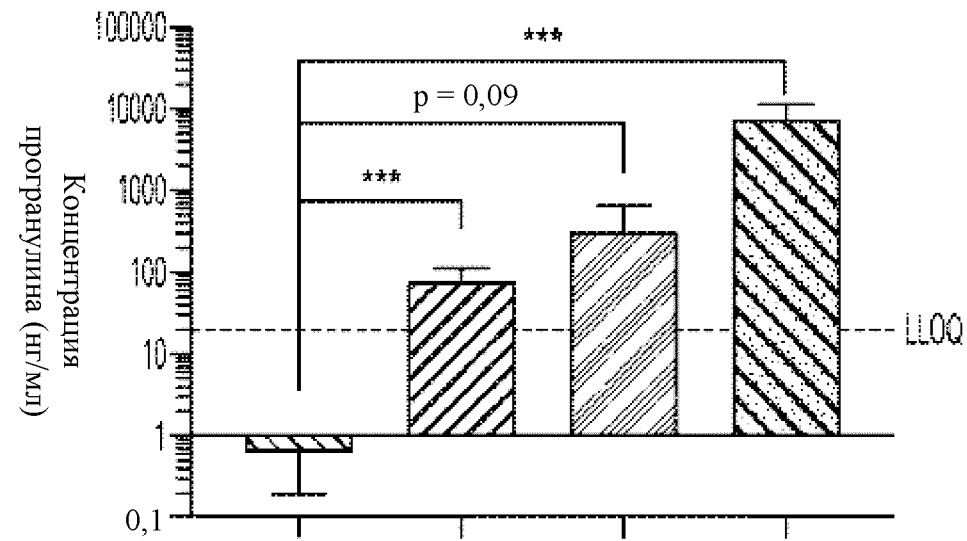


ФИГ. 53D



ФИГ. 53E

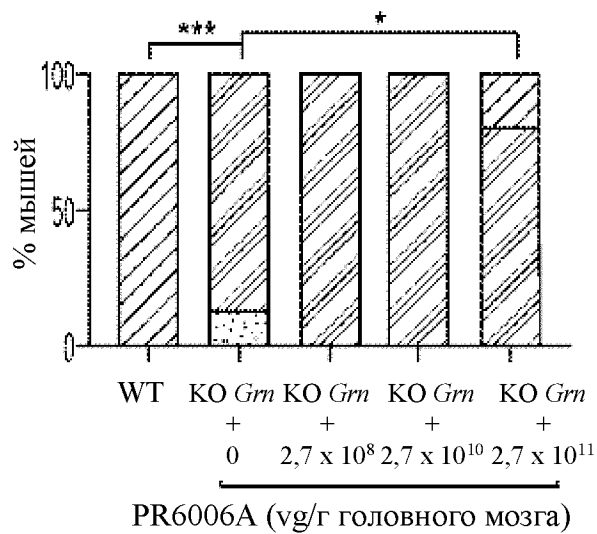
Програнулин (белок) - плазма крови



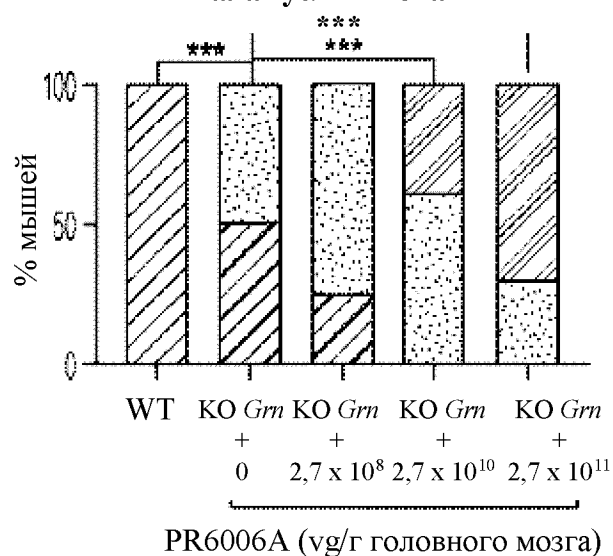
- Вспомогательное вещество
- 2,7 x 10⁹ vg/г головного мозга PR006A
- 2,7 x 10¹⁰ vg/г головного мозга PR006A
- 2,7 x 10¹¹ vg/г головного мозга PR006A

ФИГ. 53F

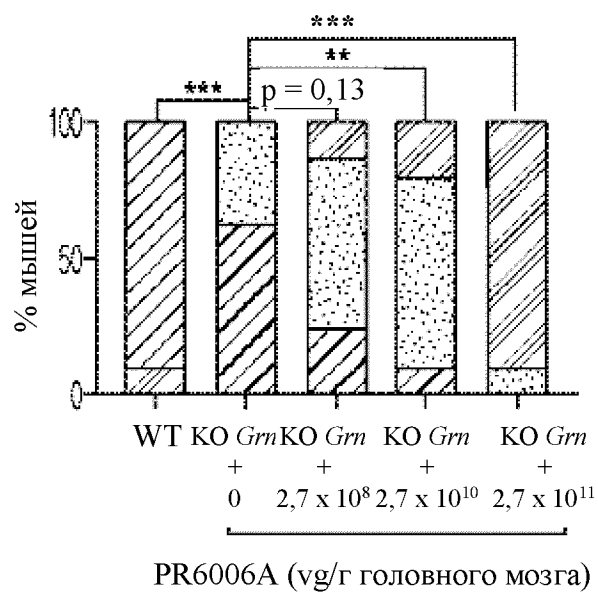
ФИГ. 53G Кора головного мозга



Таламус/Гиппокамп



Гиппокамп

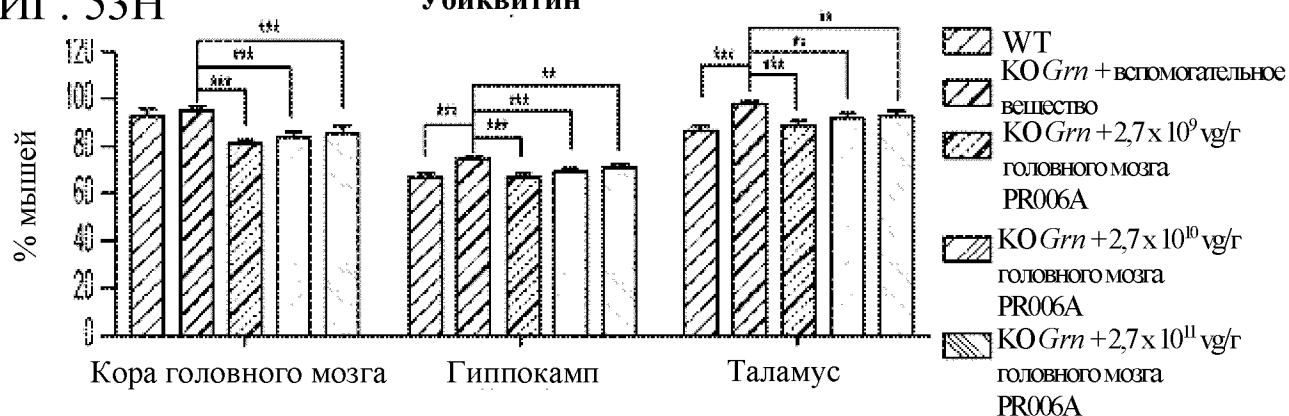


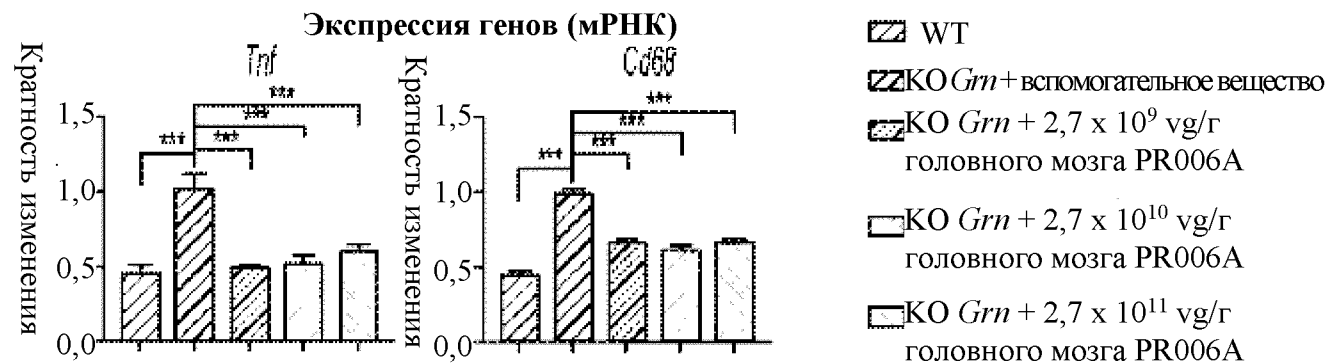
Балл накопления липофусцина

- 0 (нормальное; свидетельств нет)
- 1 (минимальное)
- 2 (легкое)
- 3 (умеренное)

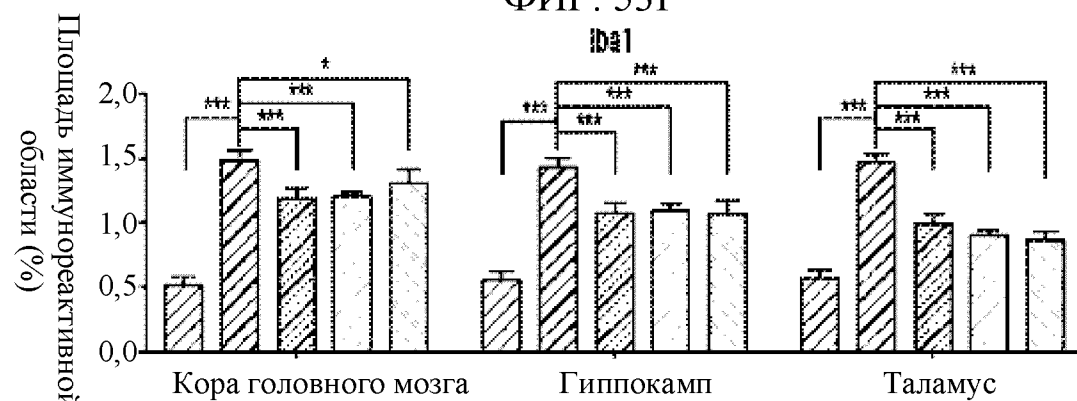
ФИГ. 53H

Убиквитин

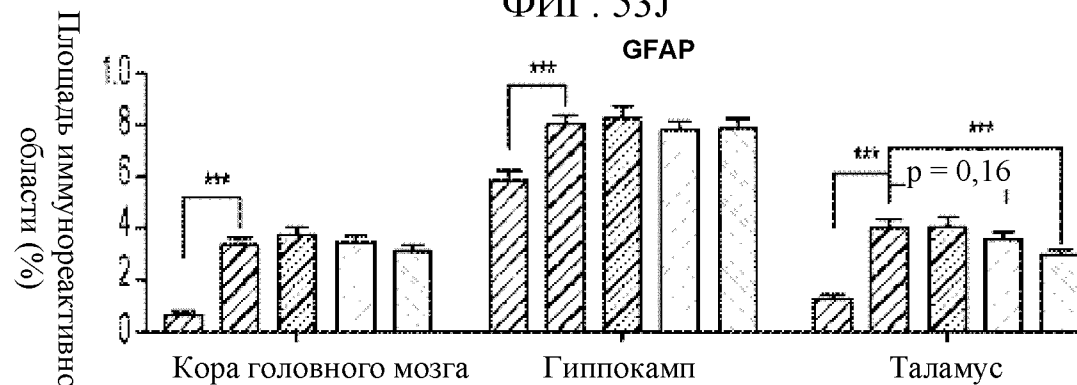




ФИГ. 53I

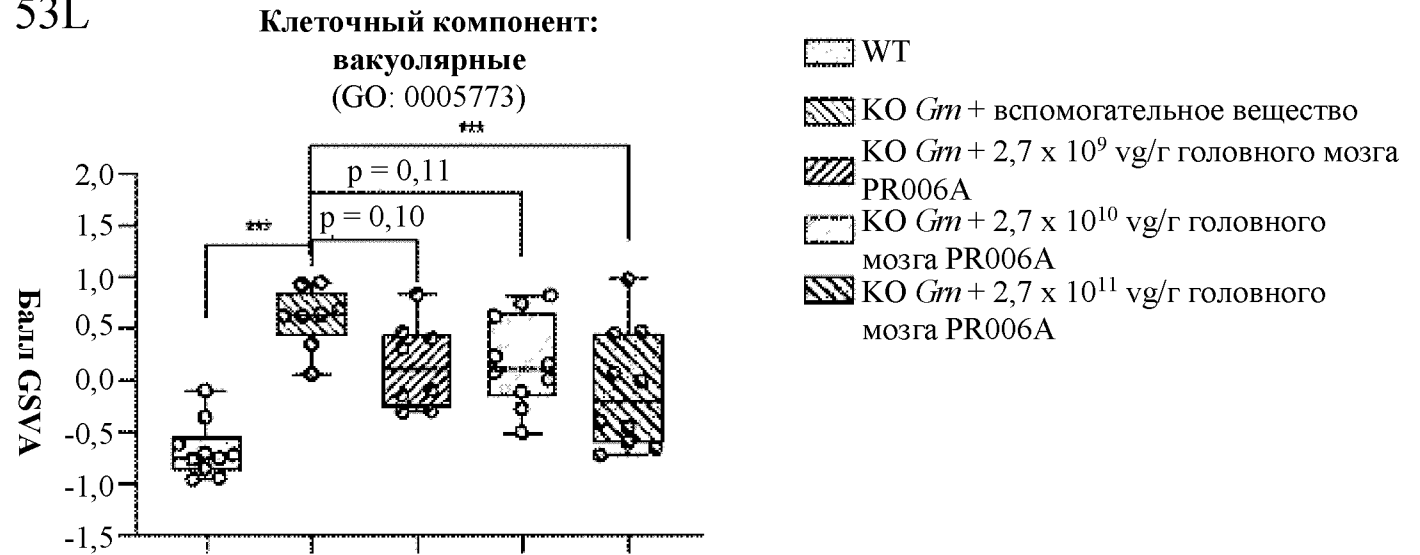


ФИГ. 53J

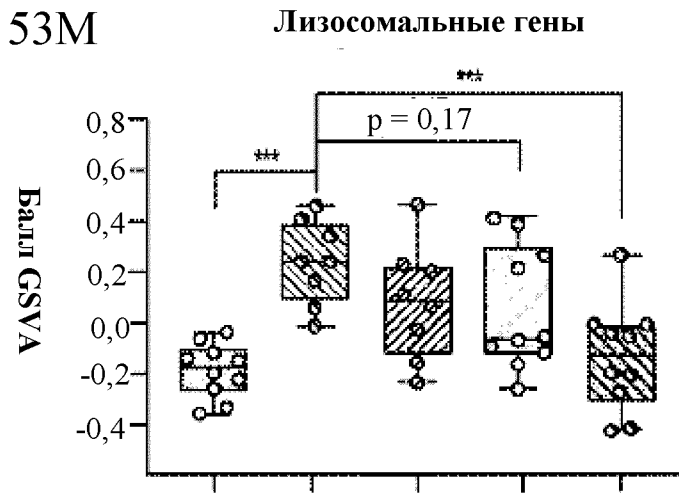


ФИГ. 53K

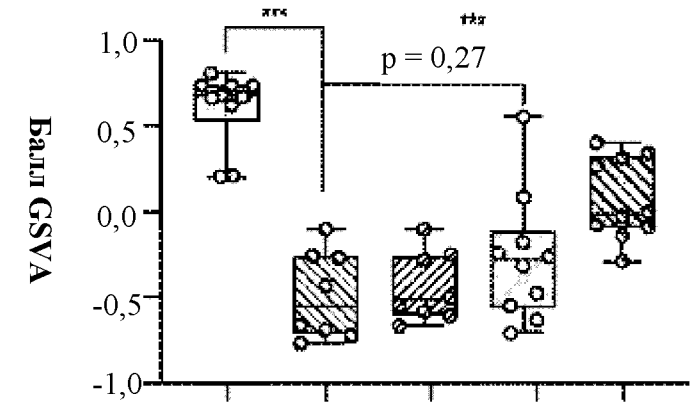
ФИГ. 53L

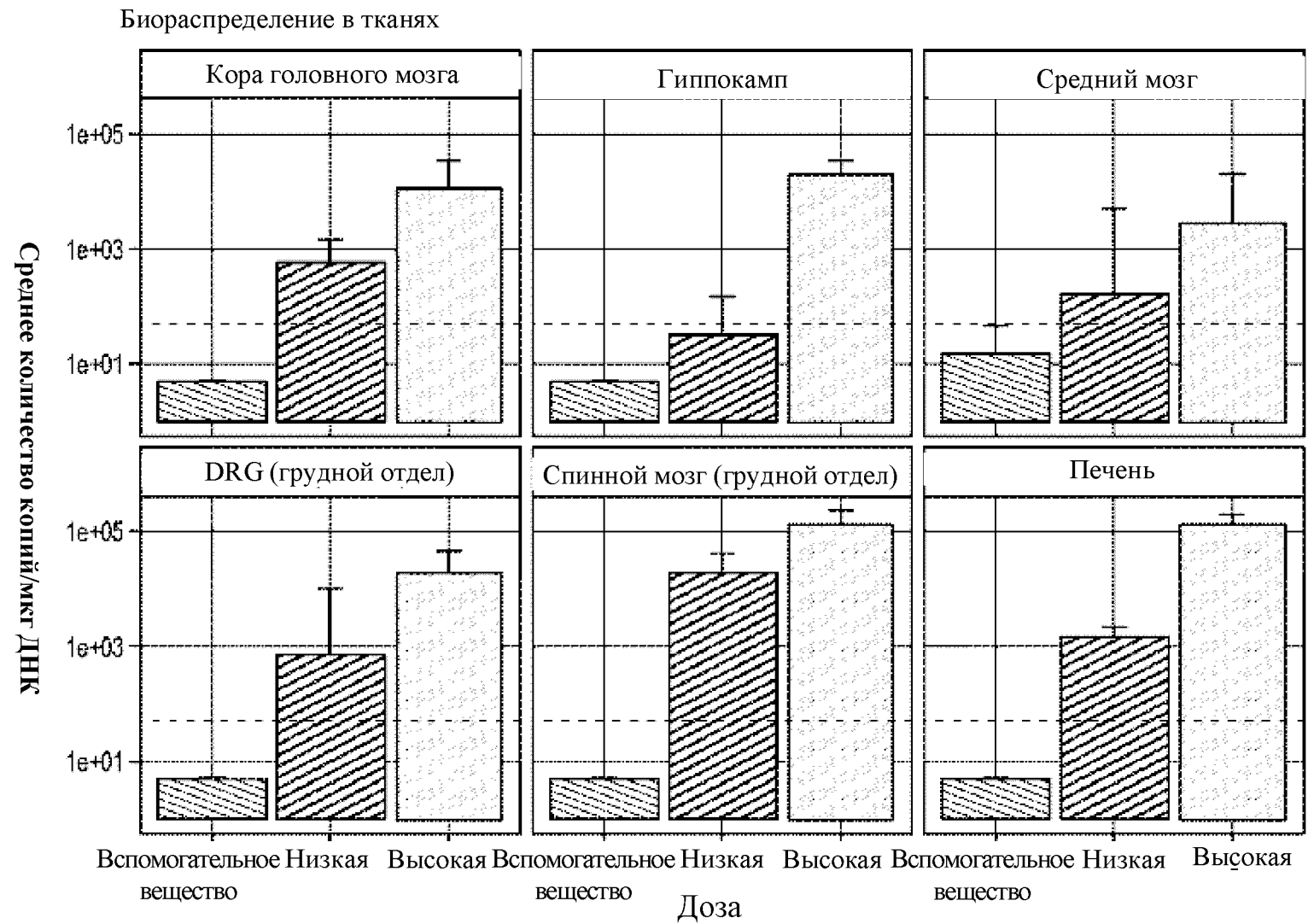


ФИГ. 53M

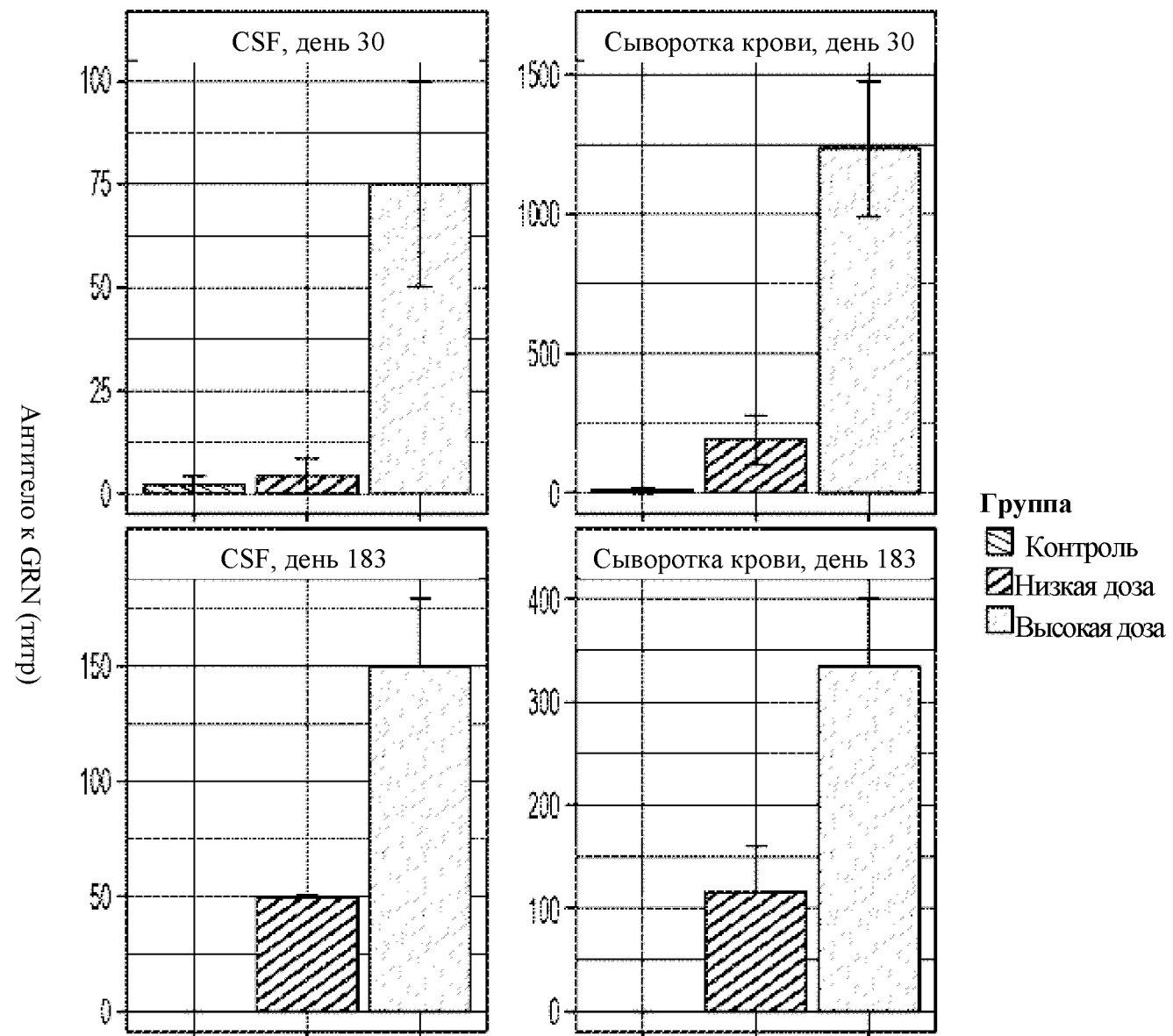


ФИГ. 53N Система комплемента
(характерные)

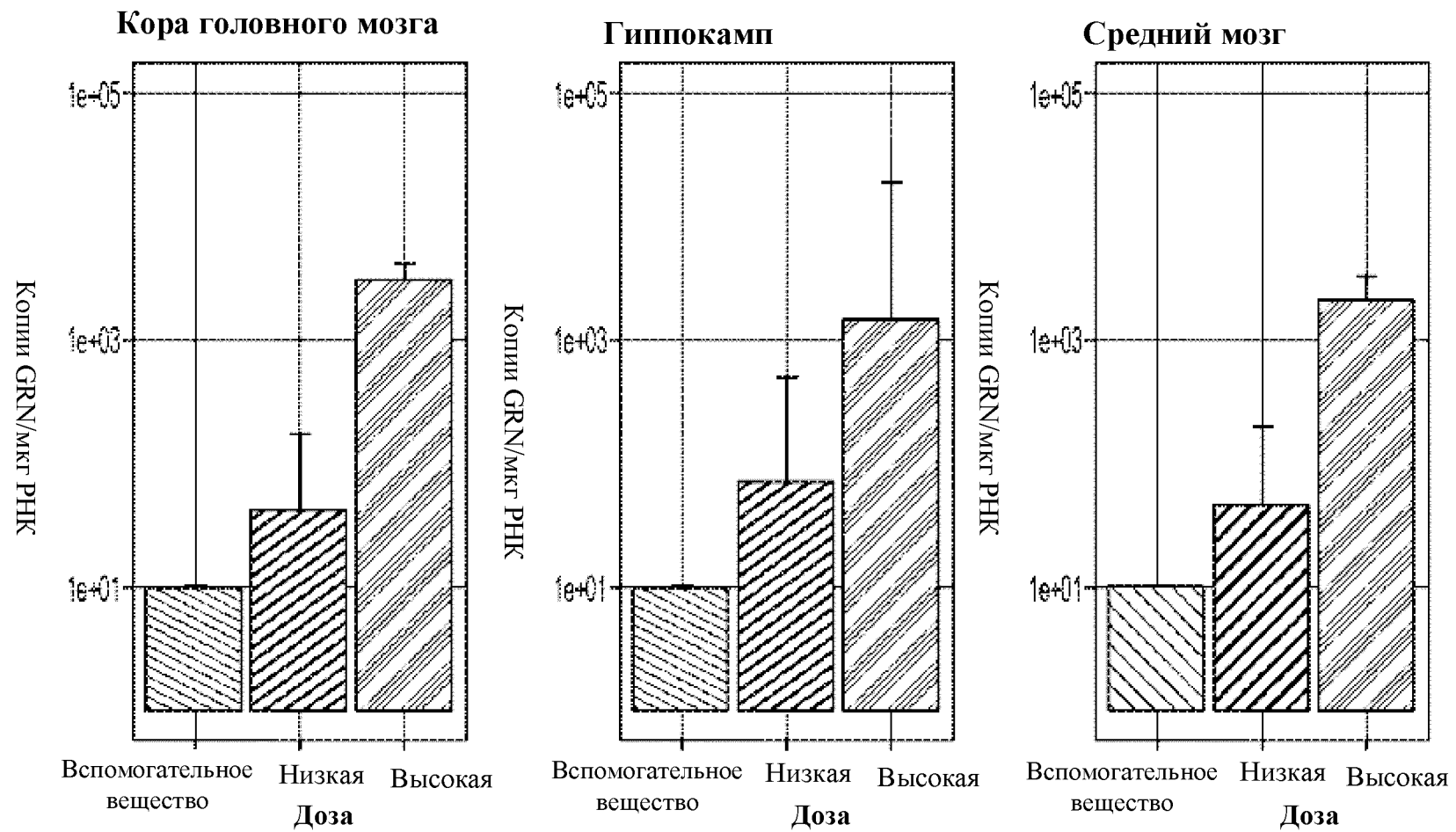




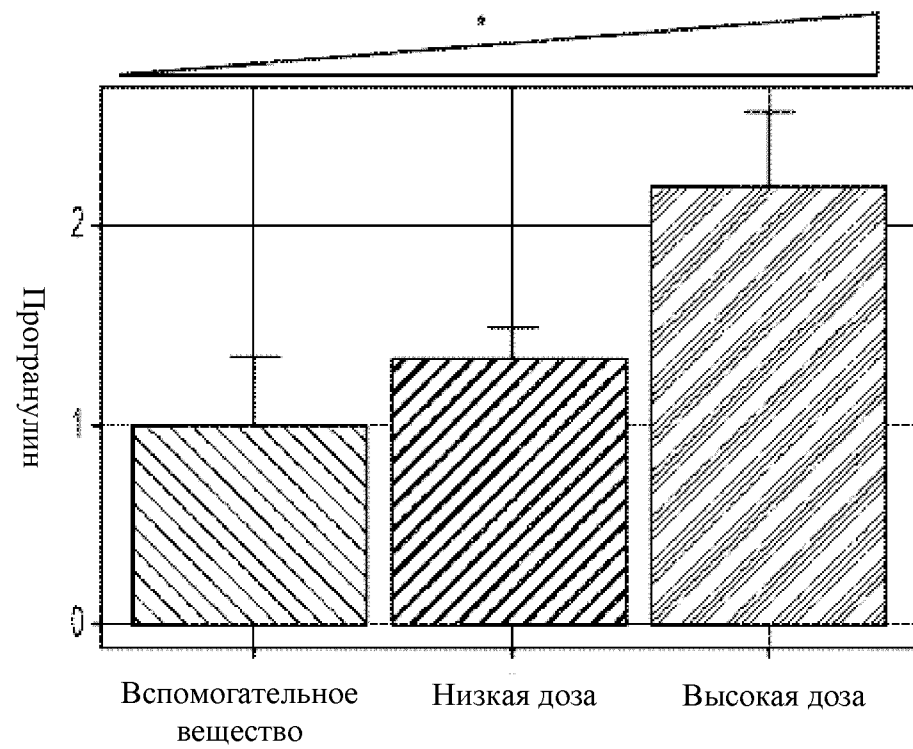
ФИГ. 54А



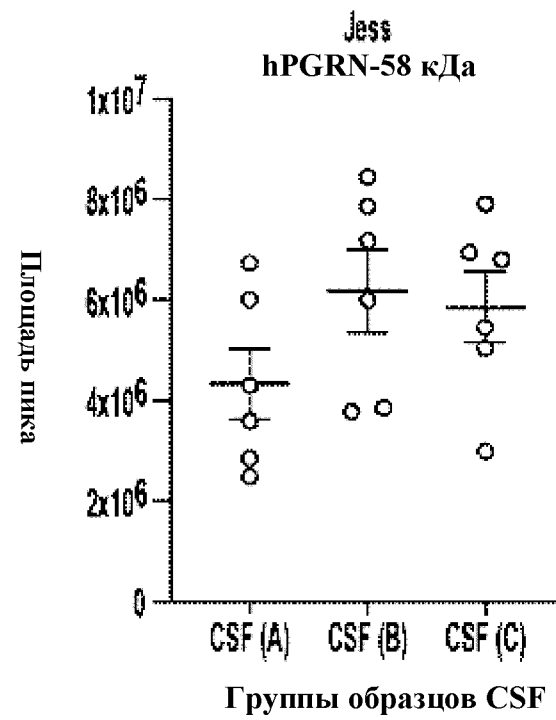
ФИГ. 54В



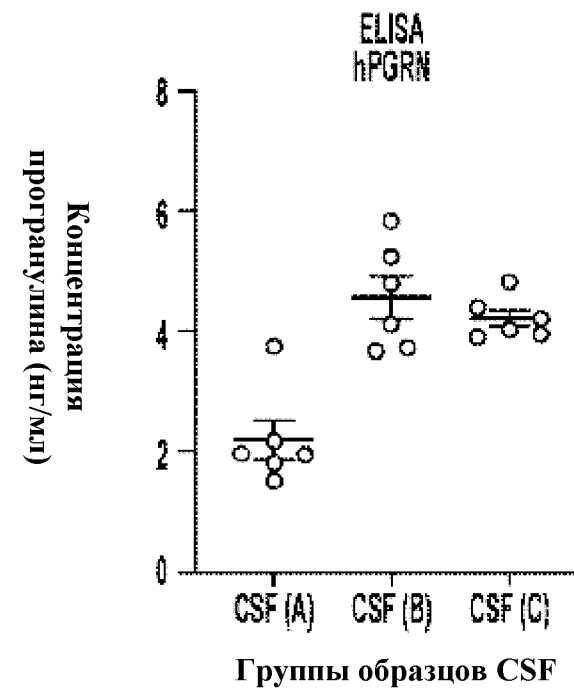
ФИГ. 54С



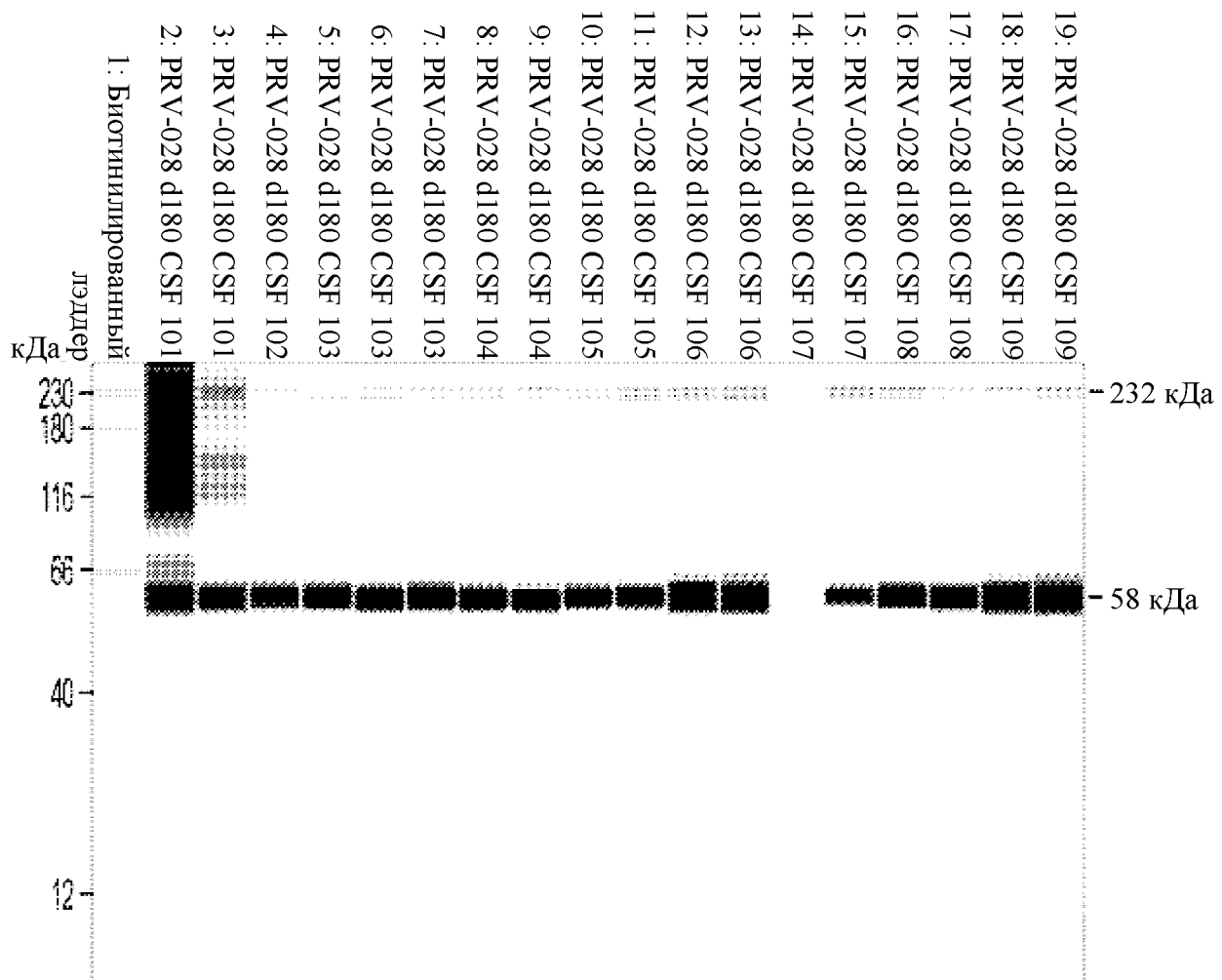
ФИГ. 54D



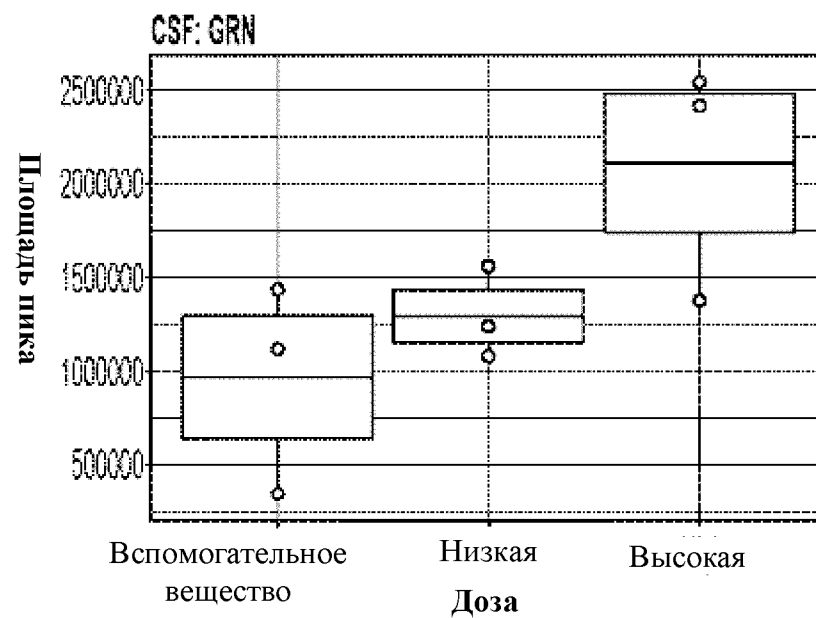
ФИГ. 55



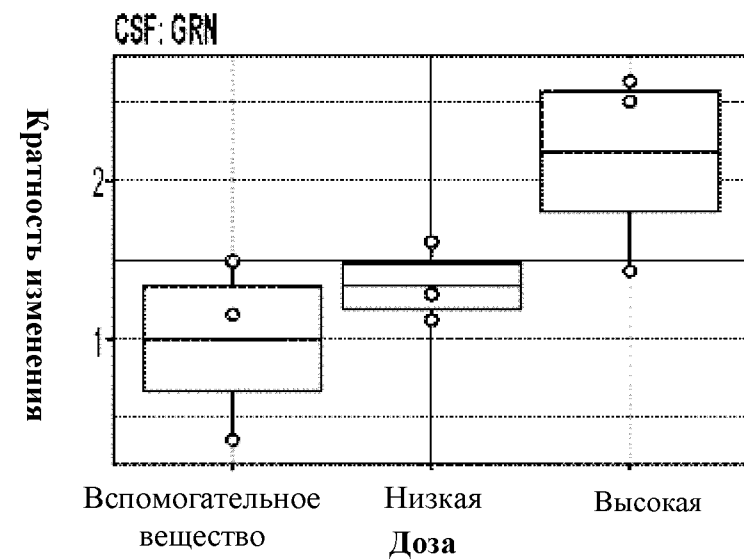
ФИГ. 56



ФИГ. 57

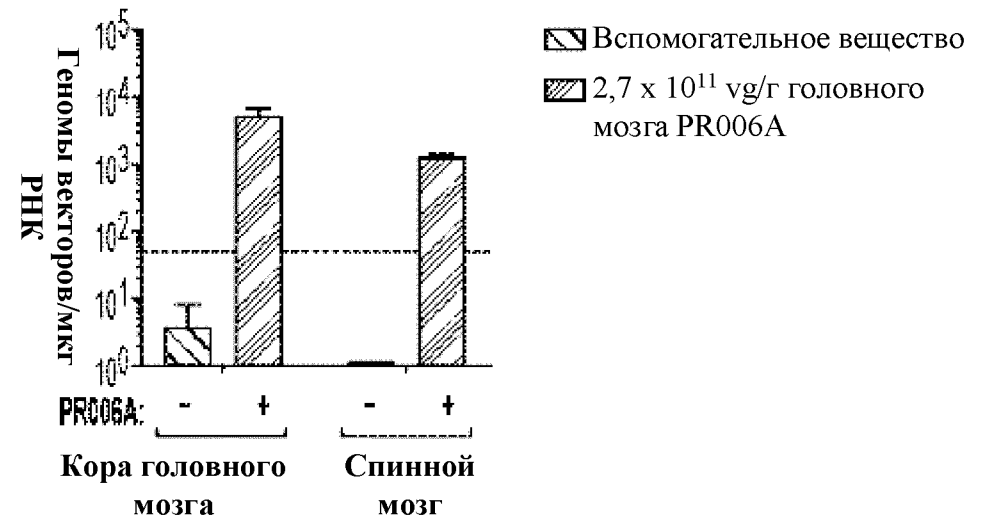


ФИГ. 58А



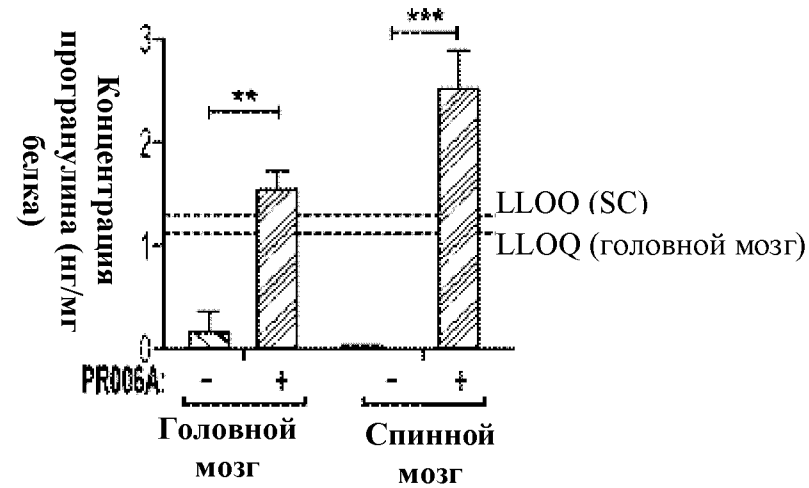
ФИГ. 58В

Биораспределение - ткани ЦНС



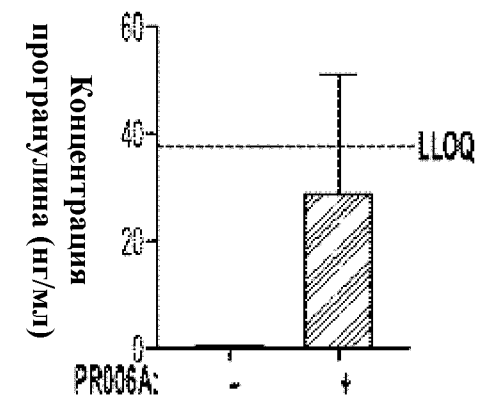
ФИГ. 59А

Програнулин (белок) - ткани ЦНС

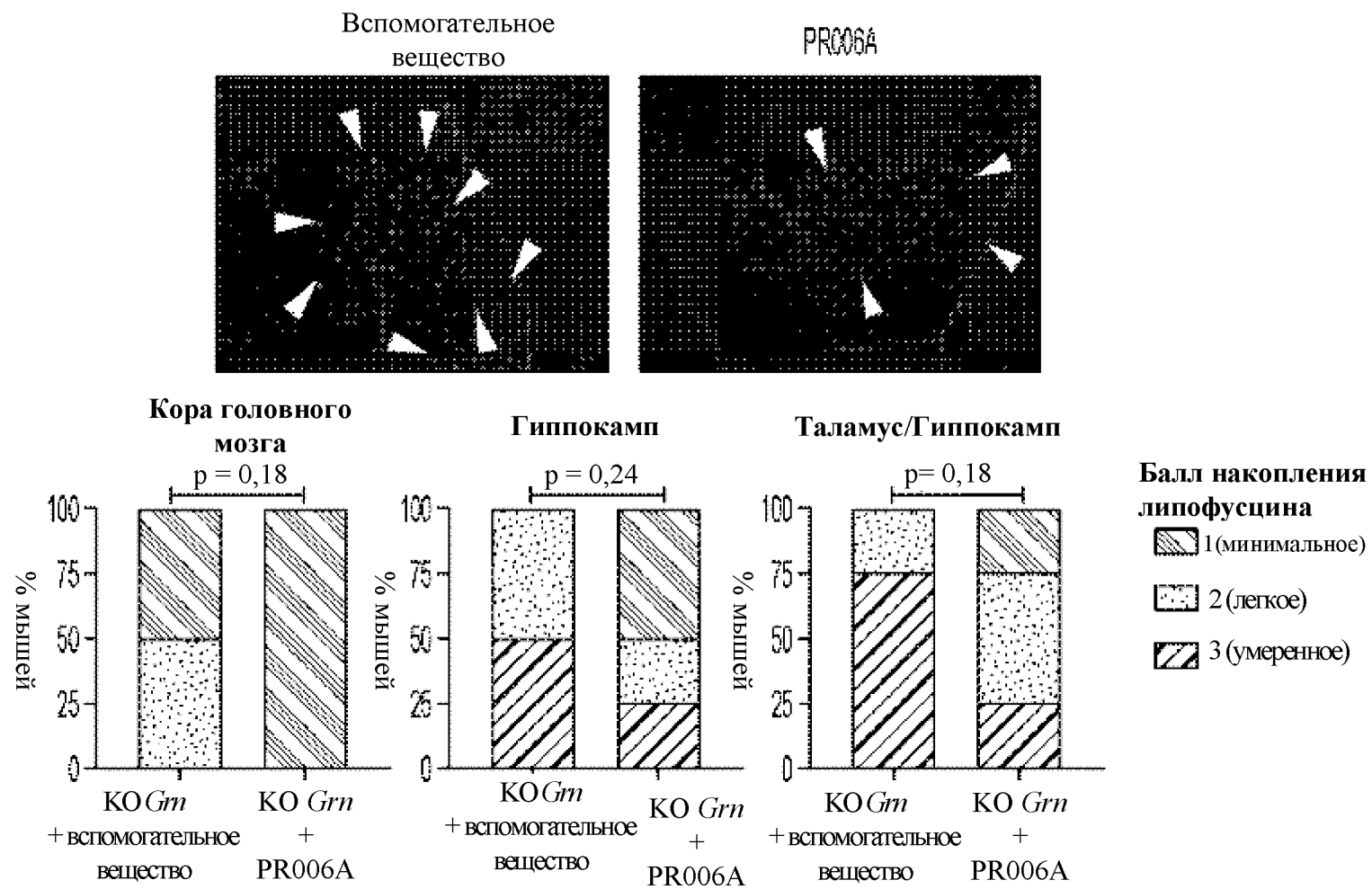


ФИГ. 59В

Програнулин (белок) - ЦНС

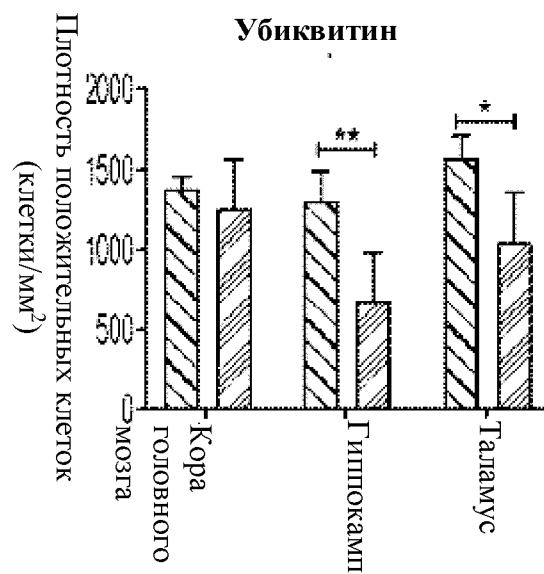


ФИГ. 59С

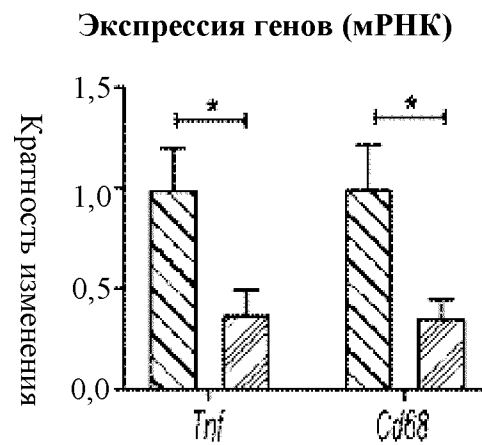


ФИГ. 59D

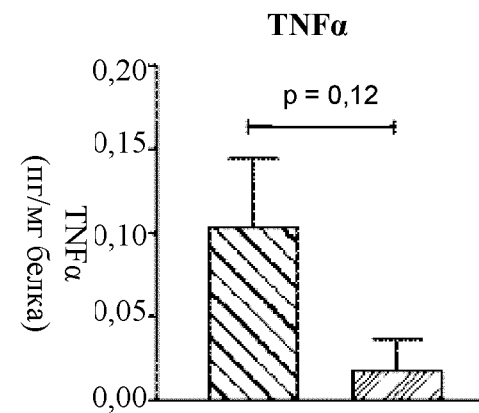
 Вспомогательное вещество
 $2,7 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга PR006A



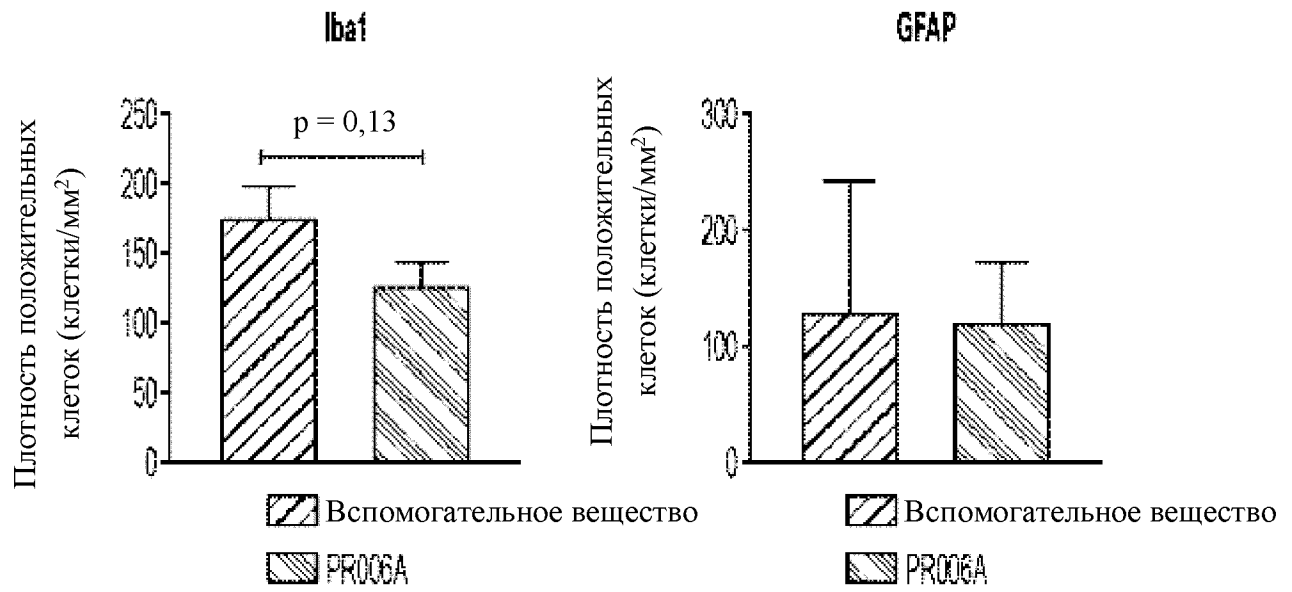
ФИГ. 59E



ФИГ. 59F

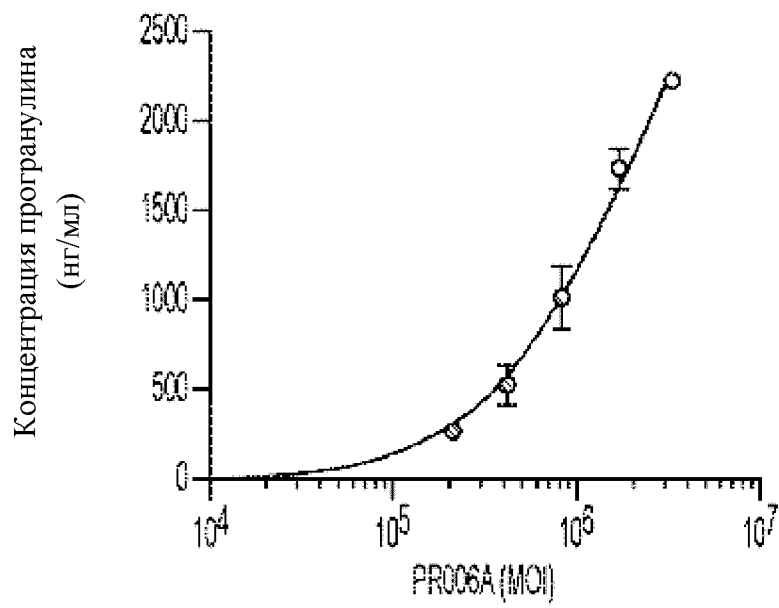


ФИГ. 59G

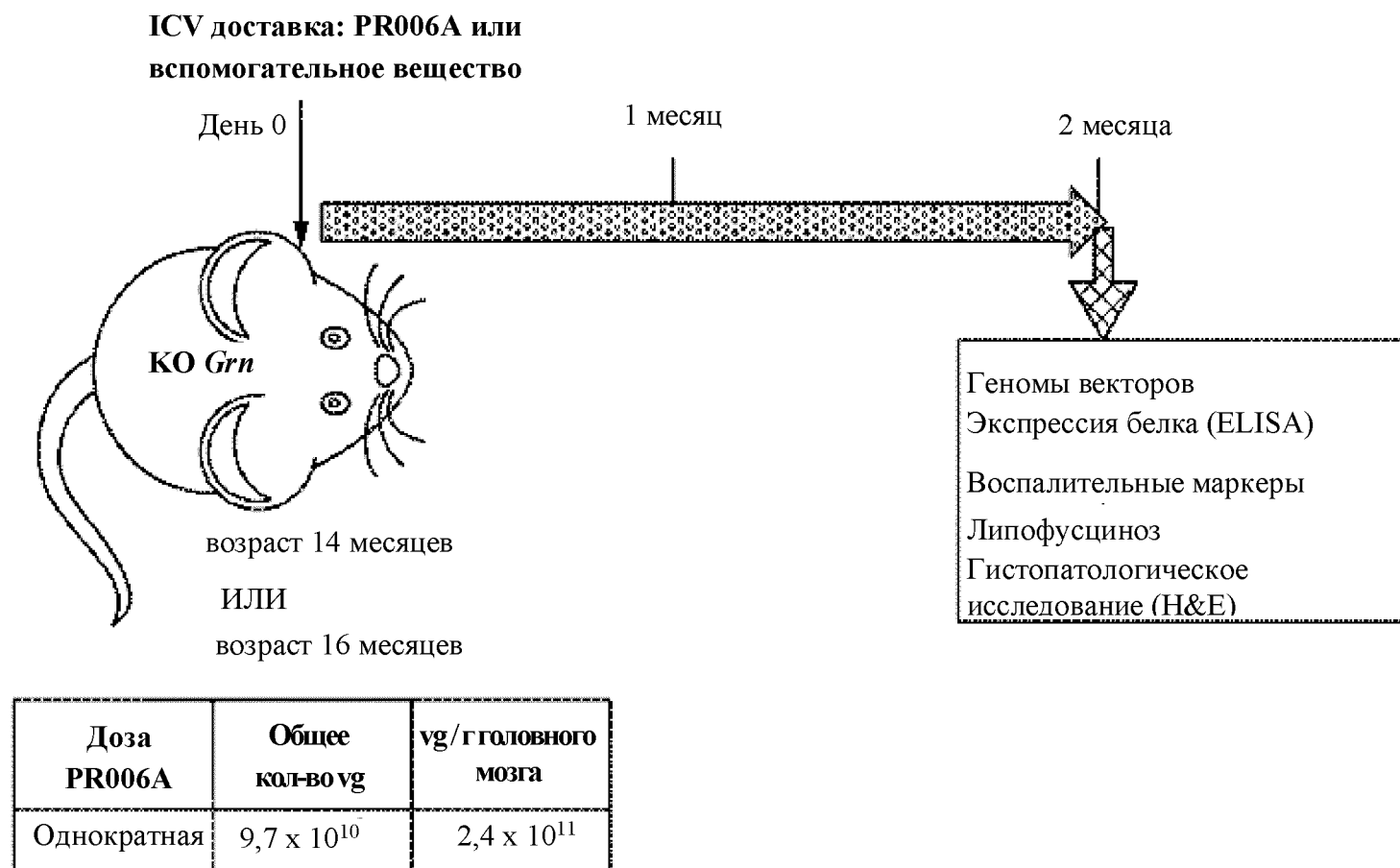


ФИГ. 59H

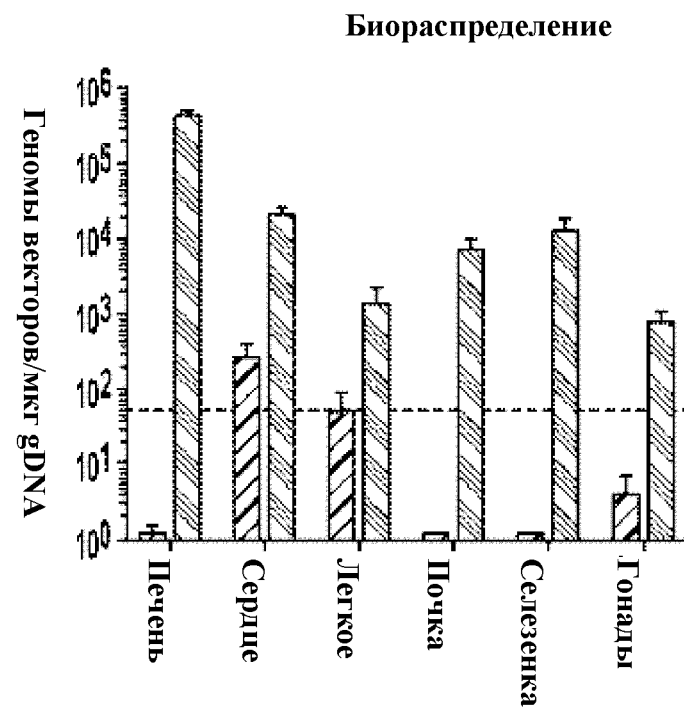
ФИГ. 59I



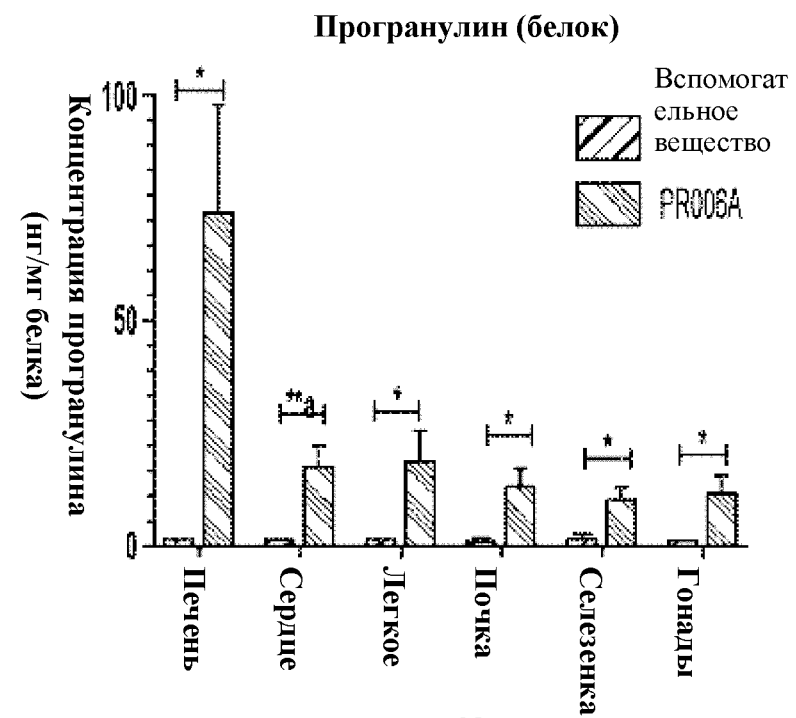
ФИГ. 60



ФИГ. 61

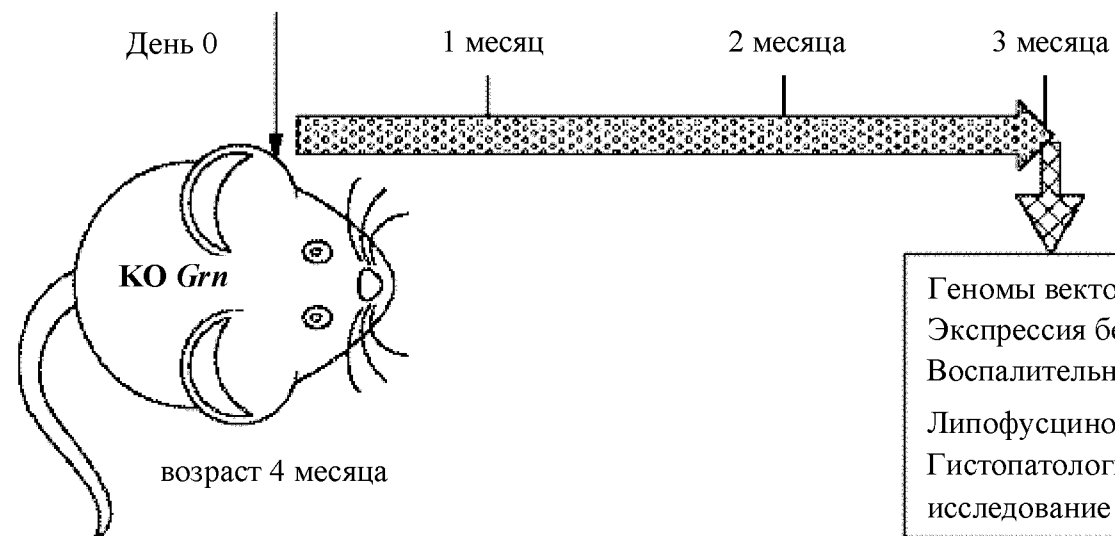


ФИГ. 62А



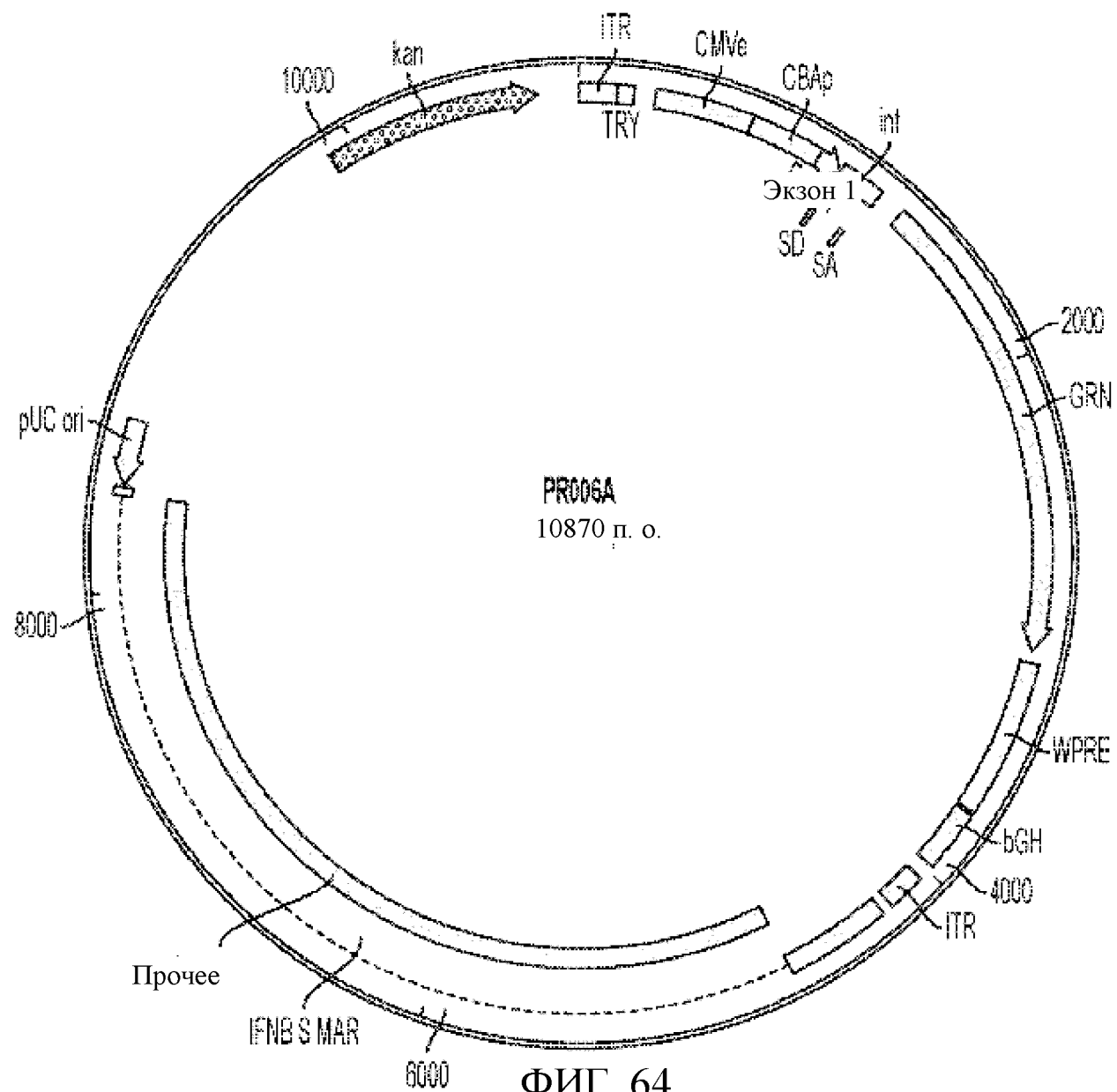
ФИГ. 62В

ICV доставка: PR006A или
вспомогательное вещество



Доза PR006A	Общее кол-во vg	vg/г головного мозга
Низкая	$1,1 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$
Средняя	$1,1 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^{10}$
Высокая	$1,1 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{11}$

ФИГ. 63



ФИГ. 64