

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391581 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.20

(22) Дата подачи заявки  
2021.11.24

(51) Int. Cl. A61P 25/28 (2006.01)  
C12N 15/79 (2006.01)  
C12N 15/86 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01)  
A61K 47/62 (2006.01)  
A61K 47/42 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)

(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

(31) 63/118,060

(32) 2020.11.25

(33) US

(86) PCT/US2021/060731

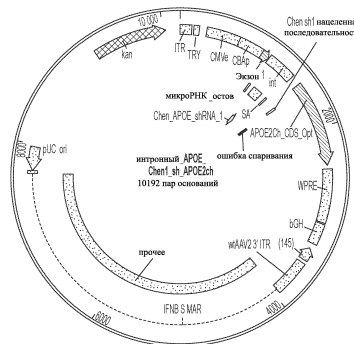
(87) WO 2022/115535 2022.06.02

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

(72) Изобретатель:  
Абелиович Аса, Камалакаран  
Ситхартхан, Шайкинд Бенджамин,  
Шварц Эдмунд С., Сен Аиндья  
Кумар (US)

(74) Представитель:  
Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.  
(RU)

(57) Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к композициям и способам для лечения нейродегенеративного заболевания, например болезни Альцгеймера. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к экспрессионным конструкциям, содержащим трансген, кодирующий изоформу белка Christchurch APOE (например, APOE3ch и/или APOE2ch) или его часть, ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на ген APOE или его часть, или любую комбинацию указанного. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения болезни Альцгеймера путем введения экспрессионной конструкции субъекту, нуждающемуся в этом.



A1

202391581

202391581

A1

# **ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Ссылка на родственную заявку**

Согласно настоящей заявке в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) испрашивается приоритет по предварительной заявке на выдачу патента США № 63/118060, поданной 25 ноября 2020 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Перечень последовательностей**

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в формате ASCII посредством EFS-Web и включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 24 ноября 2021 г., имеет название P109470016WO00-SEQ-LJG и имеет размер 24073 байта.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Болезнь Альцгеймера (AD) является наиболее распространенной формой деменции, которой только в Соединенных Штатах Америки страдают более 5 миллионов человек. Болезнь Альцгеймера представляет собой необратимое прогрессирующее нарушение головного мозга, характеризующееся присутствием аномальных белковых отложений по всему головному мозгу, которые подавляют функции нейронов, нарушают связи между нейронами и в конечном итоге приводят к гибели клеток. Эти отложения состоят из бляшек бета-амилоида и клубков, образованных фосфорилированными тау-белками. Пациенты, страдающие легкой формой AD, показывают потерю памяти, что приводит к блужданию, трудностям с обращением с деньгами, повторяющимся вопросам и изменениям личности и поведения. У пациентов, страдающих умеренной формой AD, наблюдается повышенная потеря памяти, что приводит к спутанности сознания и трудностям в узнавании друзей и семьи, неспособности узнавать новое, галлюцинациям, бреду и паранойе. Пациенты, страдающие тяжелой формой AD, не способны к коммуникации и полностью зависят от помощи других. В конечном итоге белковые бляшки и клубки распространяются по всему головному мозгу, что приводит к значительному сокращению тканей.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Большинство пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера (AD), имеют AD с

поздним началом, когда симптомы появляются у субъекта в возрасте 60-ти лет. Ген аполипопротеина Е (APOE) участвует в развитии AD с поздним началом. APOE имеет несколько изоформ, в том числе APOE2, защищающую от болезни Альцгеймера, и APOE4, связанную с повышенным риском развития AD с поздним началом. Гомозиготные пациенты, которые несут две копии APOE4 (например, субъекты, которые несут APOE4+/+), подвержены еще большему риску развития AD с поздним началом по сравнению с гетерозиготными пациентами, несущими одну копию APOE4 и одну копию либо APOE2, либо APOE3. Кроме того, мутация пресенилина 1 (PSEN1) (например, мутация PSEN1 E280A) связана с аутосомно-доминантной AD. Было обнаружено, что у носителей мутации PSEN1 E280A, гомозиготных по мутации Christchurch APOE3 (например, мутация APOE3 R136S), когнитивные нарушения развивались намного позже, чем у носителей мутации PSEN1 E280A, не являющихся гомозиготными по мутации Christchurch APOE3 (например, мутация APOE3 R136S).

Аспекты настоящего изобретения относятся к композициям и способам лечения субъекта, страдающего AD или с подозрением на ее наличие (например, ADAD). Настоящее изобретение отчасти основано на экспрессионных конструкциях, кодирующих белок Christchurch APOE (например, белок APOE3ch и/или белок APOE2ch). Согласно некоторым аспектам экспрессионная конструкция также кодирует ингибирующую РНК (например, кшРНК, микроРНК, искусственная микроРНК и т.д.), которая нацелена на AD-ассоциированный ген (например, APOE, такой как APOE4, APOE3, и/или APOE2).

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Christchurch APOE.

Согласно некоторым вариантам осуществления белок Christchurch APOE представляет собой белок Christchurch APOE2. Согласно некоторым вариантам осуществления белок Christchurch APOE2 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80% идентичную SEQ ID NO: 8. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция, кодирующая белок Christchurch APOE2, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 80% идентичную SEQ ID NO: 9. Согласно некоторым вариантам осуществления белок Christchurch APOE представляет собой белок Christchurch APOE3. Согласно некоторым вариантам осуществления белок Christchurch APOE3 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция, кодирующая белок Christchurch APOE3, содержит последовательность нуклеиновой

кислоты, на по меньшей мере 80% идентичную SEQ ID NO: 7.

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность одной или нескольких изоформ гена APOE (например, APOE4, APOE3, APOE2 и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность APOE4. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность APOE2. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность APOE3. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность APOE4 и APOE2. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность APOE4, APOE3 и APOE2. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота кодируется последовательностью, как представлено в любой из SEQ ID NO: 12-23.

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит первый промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Christchurch APOE. Согласно некоторым вариантам осуществления первый промотор функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность одной или нескольких изоформ APOE (например, APOE4, APOE3, APOE2 и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит второй промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность одной или нескольких изоформ APOE (например, APOE4, APOE3, APOE2 и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления первый промотор и/или второй промотор независимо

представляет собой промотор бета-актина кур (CBA), промотор CAG, промотор CD68 или промотор JeT.

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). Согласно некоторым вариантам осуществления ITR представляют собой ITR AAV2.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO: 6-11.

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой плазмиду. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор AAV (rAAV) или бакуловирусный вектор.

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу (rAAV), содержащему: (i) капсидный белок AAV и (ii) выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV способен проникать через гематоэнцефалический барьер. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAVrh.10. Согласно некоторым вариантам осуществления rAAV трансдуцирует нейроны и клетки, не относящиеся к нейронам, центральной нервной системы (ЦНС).

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, вектор или rAAV, как описано в настоящем документе.

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, вектор или rAAV, как описано в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к способу, предусматривающему введение субъекту, страдающему болезнью Альцгеймера или с

подозрением на ее наличие, выделенной нуклеиновой кислоты, вектора, гAAV или композиции, как описано в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение предусматривает прямую инъекцию в ЦНС субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция предусматривает внутримозговую инъекцию, интрапаренхиматозную инъекцию, интратекальную инъекцию или любую их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта предусматривает конвекционную усовершенствованную доставку (CED). Согласно некоторым вариантам осуществления введение предусматривает периферическую инъекцию. Согласно некоторым вариантам осуществления периферическая инъекция предусматривает внутривенную инъекцию.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект страдает аутосомно-доминантной болезнью Альцгеймера (ADAD) или имеет подозрение на ее наличие. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет по меньшей мере одну мутацию в гене *PSEN1*. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация в гене *PSEN1* вызывает мутацию E280A в белке пресенилин 1. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект не является гомозиготным по мутации Christchurch *APOE3*, где мутация Christchurch *APOE3* вызывает мутацию R136S в белке *APOE3*. Согласно некоторым вариантам осуществления введение приводит к отсрочке наступления умеренных когнитивных нарушений (MIC) по сравнению с субъектами, не получающими введение.

### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 показана схема, показывающая один вариант осуществления вектора, кодирующего вариант белка Christchurch *APOE*.

На фиг. 2 показано множественное выравнивание последовательностей *APOE2* дикого типа, *APOE2\_Christchurch* и *APOE3\_Christchurch*. SEQ ID NO: 3, 8 и 6 показаны сверху вниз.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Настоящее изобретение отчасти основано на композициях и способах экспрессии комбинаций AD-ассоциированных генных продуктов у субъекта. Генный продукт может представлять собой белок, фрагмент (например, часть) белка, интерферирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует AD-ассоциированный ген, и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт представляет собой белок или фрагмент белка, кодируемый AD-ассоциированным геном. Согласно некоторым вариантам

осуществления генный продукт представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту (например, кшРНК, миРНК, микроРНК, искусственная микроРНК и т.д.), которая ингибирует AD-ассоциированный ген.

AD-ассоциированный ген относится к гену, кодирующему генный продукт, который генетически, биохимически или функционально связан с болезнью Альцгеймера (AD). Например, индивидуумы, несущие по меньшей мере одну копию Пресенилина 1 (PSEN1), содержащую мутацию E280A, подвержены повышенному риску развития аутосомно-доминантной болезни Альцгеймера (ADAD). Согласно некоторым вариантам осуществления гомозиготность по мутации Christchurch APOE3 (*APOE3ch<sup>+/+</sup>*) проявляет нейропротекторный эффект у пациентов, страдающих ADAD, с мутацией Пресенилина 1 (PSEN1) E280A. В других случаях индивидуумы, несущие по меньшей мере одну копию APOE4, подвержены повышенному риску развития AD с поздним началом. В другом примере APOE2 проявляет нейропротекторный эффект на мышинных моделях AD. В контексте настоящего изобретения термин «нейропротекторный» относится к сохранению структуры и/или функции нейронов в клетке или у субъекта по отношению к сохранению структуры и/или функции нейронов в клетке или у субъекта в отсутствие нейропротекции (например, отсутствие нейропротекторного агента или белка).

#### *Выделенные нуклеиновые кислоты и векторы*

Выделенная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Christchurch APOE (например, белок APOE2 Christchurch и/или белок APOE3 Christchurch). Аспекты настоящего изобретения также относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Christchurch APOE (например, белок APOE2 Christchurch и/или белок APOE3 Christchurch), и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие одну или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот (например, дцРНК, миРНК, микроРНК, искусственная микроРНК и т.д.), которые нацелены на одну или несколько эндогенных изоформ гена APOE (например, изоформы 2, 3, и/или 4 гена *APOE*).

Белок APOE относится к аполипопротеину E, который является жиросвязывающим белком, который играет роль в катаболизме липопротеинов, обогащенных триглицеридами. Существуют три основные изоформы APOE, называемые APOE2, APOE3 и APOE4. Каждая изоформа отличается от других двумя положениями: аминокислотой 130 и аминокислотой

176 (также соответственно называемыми положениями 112 и 158, если исключить сигнальный пептид белка). АРОЕ2 содержит Cys130/Cys176 и, как было обнаружено, связан с гиперлиппротеинемией типа III и другими заболеваниями, но также играет нейропротекторную роль. АРОЕ3 содержит Cys130/Arg176 и является наиболее распространенным аллелем АРОЕ. АРОЕ4 содержит Arg130/Arg176 и, как было обнаружено, связан с поздним началом болезни Альцгеймера, атеросклерозом, неблагоприятными исходами черепно-мозговой травмы (ТВИ) и другими заболеваниями. У людей ген *APOE* расположен на хромосоме 19. Согласно некоторым вариантам осуществления АРОЕ4 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления АРОЕ2 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, как представлено в SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления АРОЕ3 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, как представлено в SEQ ID NO: 4.

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение основано на неожиданном открытии, что мутация Christchurch АРОЕ3 (например, *APOE3ch<sup>+/+</sup>*) играет нейропротекторную роль у пациентов, страдающих AD (например, у пациентов, страдающих AD, которые являются носителями мутации PSEN1 E280A). Мутация Christchurch АРОЕ (*APOEch*), как описано в настоящем документе, относится к мутантному белку АРОЕ, имеющему аминокислотную замену R136S, связанную с мутациями в кодоне 154 последовательности, кодирующей АРОЕ. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота, описанная в настоящем документе, содержит экспрессионную конструкцию, кодирующую белок Christchurch АРОЕ. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок Christchurch АРОЕ, является кодон-оптимизированной. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует белок Christchurch АРОЕ3 или его фрагмент. Термин «фрагмент» относится к части полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты эталонного полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты (например, дикого типа или полноразмерная изоформа). Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент представляет собой усечение любого конца эталонной молекулы и имеет по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с эталонной молекулой (например, дикого типа или полноразмерная изоформа). Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент содержит делецию (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более делеций) аминокислот или нуклеотидов по всей длине эталонной молекулы (например, дикого типа или полноразмерная изоформа). Согласно



некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует белок, на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичный аминокислотной последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует белок Christchurch APOE2 или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует белок, на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичный аминокислотной последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 8. Фрагмент белка может содержать приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80% приблизительно 90% или приблизительно 99% белка, кодируемого геном *APOEch*. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент бека содержит от 50% до 99,9% (например, любое значение между 50% и 99,9%) белка, имеющего аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 6 или 8.

Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт (например, трансген, кодирующий белок APOE Christchurch) кодируется кодирующей частью (например, кДНК) гена природного происхождения. Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый геном *APOE*, несущим мутацию Christchurch APOE. Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый геном *APOE3*, несущим мутацию Christchurch APOE (например, *APOE3ch*). Согласно некоторым вариантам осуществления ген *APOE3ch* содержит последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты, как представлено в SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый геном *APOE2*, несущим мутацию Christchurch APOE (например, *APOE2ch*). Согласно некоторым вариантам осуществления ген *APOE3ch*

содержит последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты, как представлено в SEQ ID NO: 9. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок Christchurch APOE, является кодон-оптимизированной. Согласно некоторым вариантам осуществления кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок APOE3ch, на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как представлено в SEQ ID NO: 10. Согласно некоторым вариантам осуществления кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок APOE2ch, на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты, как представлено в SEQ ID NO: 11.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота, как описано в настоящем документе, дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более ингибирующих нуклеиновых кислот (например, дцРНК, миРНК, кшРНК, микроРНК, искусственная микроРНК и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует более 10 ингибирующих нуклеиновых кислот. Согласно некоторым вариантам осуществления каждая из одной или нескольких ингибирующих нуклеиновых кислот нацелена на различный ген или часть гена (например, первая микроРНК нацелена на первую целевую последовательность гена, а вторая микроРНК нацелена на вторую целевую последовательность гена, которая отлична от первой целевой последовательности). Согласно некоторым вариантам осуществления каждая из одной или нескольких ингибирующих нуклеиновых кислот нацелена на одну и ту же целевую последовательность одного и того же гена (например, выделенная нуклеиновая кислота кодирует несколько копий одной и той же микроРНК).

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует генный продукт, который представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая нацелена на (например, гибридизуется с или содержит область, комплементарную с) AD-ассоциированный ген (например, один или несколько эндогенных генных продуктов APOE, как например, одна или несколько изоформ APOE4, изоформ APOE3 и/или изоформ APOE2 гена *APOE*). Специалисту понятно, что порядок экспрессии первого генного продукта (например, белка APOEch) и второго генного продукта (например, ингибирующей РНК, нацеленной на изоформу APOE4 гена *APOE*) в общем может быть обратным (например, ингибирующая РНК представляет собой первый генный продукт, а APOE2 представляет собой второй генный продукт).

Ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на изоформу (изоформы) гена *APOE* (например, APOE4, APOE3 и/или APOE2), может содержать область комплементарности (например, область ингибирующей нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с целевым геном, например геном, кодирующим APOE4, APOE3 и/или APOE2), длиной от 6 до 50 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота содержит область комплементарности с *APOE*, длина которой составляет приблизительно от 6 до 30, приблизительно от 8 до 20 или приблизительно от 10 до 19 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота комплементарна с по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 последовательными нуклеотидами последовательности *APOE*. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на ген *APOE*, не является аллель-специфичной (например, ингибирующая нуклеиновая кислота подавляет все изоформы гена *APOE*). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота нацелена на один или несколько конкретных аллелей *APOE*, например один или несколько аллелей APOE2, APOE3 и/или APOE4. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота не нацелена (например, не ингибирует экспрессию или активность) на изоформу APOE2ch или APOE3ch.

Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт (например, ингибирующая РНК) гибридизуется с частью целевого гена (например, комплементарен 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более последовательным нуклеотидам целевого гена, например, изоформы APOE4 гена *APOE*, такой как последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 1). Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт (например, ингибирующая РНК) гибридизуется с частью целевого гена (например, комплементарен 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более

последовательным нуклеотидам целевого гена, например, изоформы APOE2 гена *APOE*, такой как последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 2). Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт (например, ингибирующая РНК) гибридизуется с частью целевого гена (например, комплементарен 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более последовательным нуклеотидам целевого гена, например, изоформы APOE3 гена *APOE*, такой как последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 4).

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция является моноцистронной (например, экспрессионная конструкция кодирует один слитый белок, содержащий первый генный продукт и второй генный продукт). Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция является полицистронной (например, экспрессионная конструкция кодирует два разных генных продукта, например, два разных белка или фрагмента белка).

Полицистронный экспрессионный вектор может содержать один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более) промоторов. Можно применять любой подходящий промотор, например, конститутивный промотор, индуцибельный промотор, эндогенный промотор, тканеспецифический промотор (например, ЦНС-специфический промотор) и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина кур (промотор CBA), промотор CAG (например, как описано в Alexoroulou et al. (2008) *BMC Cell Biol.* 9:2; doi: 10.1186/1471-2121-9-2), промотор CD68 или промотор JeT (например, как описано в Tornøe et al. (2002) *Gene* 297(1-2):21-32). Согласно некоторым вариантам осуществления промотор функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первый генный продукт, второй генный продукт или первый генный продукт и второй генный продукт. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная кассета содержит одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, включая без ограничения последовательности связывания факторов транскрипции, сайты сплайсинга интронов, сайты добавления поли(A), энхансерные последовательности, сайты связывания репрессора или любую комбинацию указанных.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый генный продукт, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй генный продукт, разделены последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей внутренний аминокислотный сайт рибосомы (IRES). Примеры сайтов IRES описаны, например, в Mokrejs et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34(Database issue):D125-30. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый генный продукт, и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй генный продукт, разделены последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей саморасщепляющийся пептид. Примеры саморасщепляющихся пептидов включают без ограничения T2A, P2A, E2A, F2A, VmCPV 2A и VmIFV 2A, и описанные в Liu et al. (2017) *Sci Rep.* 7: 2193. Согласно некоторым вариантам осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид T2A.

Согласно некоторым вариантам осуществления нарушения, такие как AD, связаны с экспрессией по меньшей мере одной копии APOE4. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, содержат ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая снижает или предотвращает экспрессию APOE4 (например, *APOE*). Последовательность, кодирующая ингибирующую нуклеиновую кислоту, может быть помещена в нетранслируемую область (например, интрон, 5'UTR, 3'UTR и т.д.) экспрессионного вектора.

Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующую нуклеиновую кислоту расположена в интроне экспрессионной конструкции, например, в интроне по ходу транскрипции от последовательности, кодирующей первый генный продукт. Ингибирующая нуклеиновая кислота может представлять собой двухцепочечную РНК (дцРНК), кшРНК, миРНК, микроРНК (микроРНК), искусственную микроРНК (искусственная микроРНК) или РНК-аптамер. Как правило, ингибирующая нуклеиновая кислота связывается с (например, гибридизуется с) от приблизительно 6 до приблизительно 30 (например, любое целое число от 6 до 30 включительно) последовательными нуклеотидами целевой РНК (например, мРНК). Согласно некоторым вариантам осуществления молекула ингибирующей нуклеиновой кислоты представляет собой микроРНК или искусственную микроРНК, например, микроРНК, которая нацелена на изоформу APOE4 гена *APOE* (ген, кодирующий белок APOE4). Согласно некоторым вариантам осуществления молекула ингибирующей нуклеиновой кислоты представляет собой микроРНК или искусственную микроРНК, например, микроРНК, которая нацелена на изоформу APOE3 гена *APOE* (ген, кодирующий белок APOE3). Согласно некоторым вариантам осуществления молекула ингибирующей нуклеиновой кислоты представляет собой микроРНК или искусственную микроРНК, например, микроРНК, которая нацелена на изоформу APOE2 гена *APOE* (ген, кодирующий белок APOE2). Согласно некоторым вариантам осуществления микроРНК не содержит каких-либо несовпадений с областью мРНК APOE, с которой она гибридизуется (например, микроРНК является «усовершенствованной»). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой кшРНК (например, кшРНК, нацеленная на *APOE*),

например, кодируемую любой из SEQ ID NO: 12-23. Согласно некоторым вариантам осуществления микроРНК содержит по меньшей мере одно (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) несовпадение с областью мРНК гена *APOE*, с которой она гибридизуется.

Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой искусственную микроРНК (искусственная микроРНК). МикроРНК (микроРНК), как правило, относится к небольшим некодирующим РНК, обнаруживаемым в растениях и у животных, и участвует в транскрипционной и посттрансляционной регуляции экспрессии генов. МикроРНК транскрибируются РНК-полимеразой с образованием структуры шпилечной петли, называемой ргi-микроРНК, которая затем процессируется ферментами (например, Drosha, Pasha, сплайсингосома и т.д.) в шпилечную структуру пре-микроРНК, которая затем процессируется с помощью Dicer с образованием дуплекса микроРНК/микроРНК\* (где \* указывает сопровождающую цепь дуплекса микроРНК), одна цепь которого затем включается в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая РНК, как описано в настоящем документе, представляет собой микроРНК, нацеленную на изоформу АРОЕ4 гена *APOE* (ген, кодирующий белок АРОЕ4). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая РНК, как описано в настоящем документе, представляет собой микроРНК, нацеленную на изоформу АРОЕ3 гена *APOE* (ген, кодирующий белок АРОЕ3). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая РНК, как описано в настоящем документе, представляет собой микроРНК, нацеленную на изоформу АРОЕ2 гена *APOE* (ген, кодирующий белок АРОЕ2).

Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на *APOE* (например, изоформа АРОЕ4, изоформа АРОЕ3 или изоформа АРОЕ2 гена *APOE*), содержит дуплекс микроРНК/микроРНК\*. Согласно некоторым вариантам осуществления нить микроРНК дуплекса микроРНК/микроРНК\* содержит или состоит из последовательности, кодируемой любой из SEQ ID NO: 12-23. Согласно некоторым вариантам осуществления нить микроРНК\* дуплекса микроРНК/микроРНК\* содержит или состоит из последовательности, кодируемой любой из SEQ ID NO: 12-23.

Искусственная микроРНК (искусственная микроРНК) получена путем модификации нативной микроРНК с заменой природных нацеливающих областей пре-мРНК представляющей интерес нацеливающей областью. Например, встречающуюся в природе экспрессируемую микроРНК можно применять в качестве каркаса или основы (например, каркас ргi-микроРНК), при этом стволовая последовательность заменяется последовательностью микроРНК, нацеленной на представляющий интерес ген.

Искусственный предшественник микроРНК (искусственная пре-микроРНК) обычно процессируется таким образом, что предпочтительно образуется одна единственная стабильная малая РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления векторы гAAV и rAAV, описанные в настоящем документе, содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую искусственную микроРНК. Согласно некоторым вариантам осуществления каркас ргi-микроРНК искусственной микроРНК происходит из ргi-микроРНК, выбранной из группы, состоящей из ргi-MIR-21, ргi-MIR-22, ргi-MIR-26a, ргi-MIR-30a, ргi-MIR-33, ргi-MIR-122, ргi-MIR-375, ргi-MIR-199, ргi-MIR-99, ргi-MIR-194, ргi-MIR-155 и ргi-MIR-451. Согласно некоторым вариантам осуществления искусственная микроРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, нацеленную на *APOE* (например, изоформа *APOE4* гена *APOE*), и каркас eSIBR искусственной микроРНК, например, как описано в Fowler et al. *Nucleic Acids Res.* 2016 Mar 18; 44(5): e48.

Согласно некоторым вариантам осуществления искусственная микроРНК, нацеленная на *APOE* (например, изоформу *APOE4*, изоформу *APOE3* или изоформу *APOE2* гена *APOE*), содержит или состоит из последовательности, кодируемой любой из SEQ ID NO: 15, 19 и 23.

Выделенная нуклеиновая кислота, как описано в настоящем документе, может существовать самостоятельно или как часть вектора. Как правило, вектор может представлять собой плазмиду, космиду, фагмиду, бактериальную искусственную хромосому (BAC) или вирусный вектор (например, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор, бакуловирусный вектор и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой плазмиду (например, плазмиду, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе). Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор AAV (rAAV). rAAV может содержать либо «плюс-нить», либо «минус-нить» вектора rAAV. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор rAAV является одноцепочечным (например, одноцепочечная ДНК). Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой бакуловирусный вектор (например, вектор ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV)).

Как правило, вектор гAAV содержит трансген (например, экспрессионная конструкция, содержащая одну или несколько из следующего: промотор, интрон, энхансер, последовательность, кодирующая белок, последовательность, кодирующую ингибирующую РНК, последовательность полиА-хвоста и т.д.), фланкированную двумя последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. Согласно

некоторым вариантам осуществления трансген вектора гAAV содержит выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в раскрытии. Согласно некоторым вариантам осуществления каждая из двух последовательностей ITR вектора гAAV представляет собой ITR полной длины (например, с длиной приблизительно 145 пар оснований и содержанием функционального сайта связывания *Rep* (RBS) и сайта концевое разрешения (*trs*)). Согласно некоторым вариантам осуществления одна из ITR вектора гAAV является усеченной (например, укороченной или неполной). Согласно некоторым вариантам осуществления в усеченной ITR отсутствует функциональный сайт концевое разрешения (*trs*), и ее применяют для получения самокомплементарных векторов AAV (векторов scAAV). Согласно некоторым вариантам осуществления усеченный ITR представляет собой ΔITR, например, как описано в McCarty et al. (2003) *Gene Ther.* 10(26):2112-8.

Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенным нуклеиновым кислотам (например, векторам гAAV), содержащим ITR, имеющему одну или несколько модификаций (например, добавления, делеции, замены нуклеиновых кислот и т.д.) по сравнению с ITR AAV дикого типа, например, относительно ITR AAV2 дикого типа (например, SEQ ID NO: 24). Как правило, ITR дикого типа содержит 125-нуклеотидную область, которая самоотжигается с образованием палиндромной двухцепочечной T-образной шпильчатой структуры, состоящей из двух поперечных плечей (образованных последовательностями, обозначаемыми как B/B' и C/C', соответственно), более длинную область ствола (образованную последовательностями A/A') и одноцепочечную концевую область, называемую областью «D». В общем, область «D» ITR расположена между областью ствола, образованной последовательностями A/A', и вставкой, содержащей трансген вектора гAAV (например, расположена «внутри» ITR относительно конца ITR или проксимальнее трансгенной вставки или экспрессионной конструкции вектора гAAV). Область «D», как было обнаружено, играет важную роль в инкапсулировании векторов гAAV капсидными белками, например, как раскрыто в Ling et al. (2015) *J Mol Genet Med* 9(3).

Выделенная нуклеиновая кислота или вектор гAAV, как описано в настоящем раскрытии, могут дополнительно содержать последовательность «TRY», например, как описано в Francois, et al. 2005. *J Virol*, The Cellular TATA Binding Protein Is Required for Rep-Dependent Replication of a Minimal Adeno-Associated Virus Type 2 p5 Element. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность TRY расположена между ITR (например, а 5' ITR) и экспрессионной конструкцией (например, трансген-кодирующая вставка) выделенной нуклеиновой кислоты или вектора гAAV.

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к бакуловирусным



векторам, содержащим выделенную нуклеиновую кислоту или вектор гAAV, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления бакуловирусный вектор представляет собой вектор ядерного полиэдрома *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.

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в настоящем документе. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. Например, клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего, бактериальную клетку, клетку дрожжей, клетку насекомых и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, например, клетку НЕК293Т. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, например, клетку *E. coli*.

#### *rAAV*

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к рекомбинантным AAV (гAAV), содержащим трансген, который кодирует нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе, (например, вектор гAAV, как описано в настоящем документе). Термин «гAAV» в общем относится к вирусным частицам, содержащим вектор гAAV, инкапсулированный одним или несколькими капсидными белками AAV. гAAV, описанный в настоящем документе, может содержать капсидный белок, имеющий серотип, выбранный из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAV10. Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV содержит капсидный белок из хозяина, не относящегося к человеку, например, капсидный белок AAV макака-резус, такой как AAVrh.10, AAVrh.39 и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, описанный в настоящем документе, содержит капсидный белок, который представляет собой вариант белка дикого типа, такой как вариант капсидного белка, который включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 (например, 15, 20, 25, 50, 100 и т.д.) аминокислотных замен (например, мутаций) относительно капсидного белка AAV дикого типа, из которого он происходит.

Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, описанные в настоящем документе, легко распространяются по ЦНС, особенно при введении в пространство CSF или непосредственно в паренхиму головного мозга. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, описанные в настоящем документе, содержат капсидный

белок, который способен проникать через гематоэнцефалический барьер (BBB). Например, согласно некоторым вариантам осуществления гAAV содержит капсидный серотипа 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.

Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, как описано в настоящем документе (*например*, содержащий рекомбинантный геном гAAV, инкапсулированный капсидными белками AAV, с образованием капсидной частицы гAAV), получают в экспрессионной системе 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 РСТ публикации WO 2017/184879. Однако гAAV могут быть получены с применением любого подходящего способа (*например*, с использованием рекомбинантных генов *гер* и *сар*).

#### *Фармацевтические композиции*

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим выделенную нуклеиновую кислоту или гAAV, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый» относится к веществу, такому как носитель или разбавитель, которое не отменяет биологическую активность или свойства соединения и является относительно нетоксичным, *например*, вещество можно вводить индивидууму, не вызывая нежелательных биологических эффектов или вредного взаимодействия с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

В контексте настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такие как жидкий или твердый наполнитель, стабилизатор, диспергирующее средство, суспендирующее средство, разбавитель, вспомогательное вещество, загуститель, растворитель или инкапсулирующий материал, выполняющие функцию носителя или предназначенные для транспортировки соединения, применяемого согласно настоящему изобретению, в организм пациента или к пациенту, таким образом, что оно может выполнять свою предполагаемую функцию. Дополнительные ингредиенты, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, используемые согласно настоящему изобретению, известны в данной области и описаны, *например*, в Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA), который

включен в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции (например, фармацевтические композиции), раскрытые в настоящем документе, можно вводить любым путем, включая энтеральный (например, пероральный), парентеральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, подкожный, внутрижелудочковый, трансдермальный, подкожный, ректальный, интравагинальный, внутрибрюшинный, местный (в виде порошков, мазей, кремов и/или капель), через слизистую оболочку, назальный, трансбуккальный, сублингвальный, путем интратрахеального вливания, бронхиальный, и/или ингаляционный, и/или в виде перорального спрея, назального спрея, и/или аэрозоля. Конкретно предусмотренными путями являются пероральное введение, внутривенное введение (например, системная внутривенная инъекция), регионарное введение через кровь и/или лимфу, и/или прямое введение в пораженный участок. Как правило, наиболее подходящий способ введения будет зависеть от множества факторов, включая природу агента (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или условия применения (например, способен ли субъект переносить пероральное введение). Согласно некоторым вариантам осуществления соединение или фармацевтическая композиция, описанные в настоящем документе, подходят для местного введения субъекту в глаза.

### *Способы*

Настоящее изобретение отчасти основано на композициях для экспрессии комбинаций AD-ассоциированных генных продуктов, у субъекта, которые действуют вместе (например, синергетически) для лечения болезни Альцгеймера. В контексте настоящего изобретения термин «лечить» или «лечение» относится к (a) профилактике или отсрочке начала болезни Альцгеймера, (b) снижению тяжести болезни Альцгеймера, (c) снижению или предотвращению развития симптомов, характерных для болезни Альцгеймера, (d) и/или предотвращению ухудшения симптомов, характерных для болезни Альцгеймера. Симптомы болезни Альцгеймера включают, например, когнитивную дисфункцию (например, слабоумие, галлюцинации, потерю памяти и т.д.), двигательную дисфункцию (например, трудности при выполнении повседневных задач и т.д.), а также эмоциональную и поведенческую дисфункцию.

Соответственно, согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к способу, предусматривающему введение субъекту, страдающему болезнью Альцгеймера (например, ADAD) или с подозрением на ее наличие, композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или gAAV), как описано в

настоящем документе. В контексте настоящего изобретения термины «введение» или «вводить» означают введение композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV) субъекту путем, который является физиологически и/или фармакологически полезным (например, для лечения состояния, такого как AD, у субъекта). Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего болезнью Альцгеймера (например, ADAD) или с подозрением на ее наличие, причем способ предусматривает введение субъекту композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как раскрыто в настоящем документе, приводит к отсроченному началу умеренного когнитивного нарушения (МНС). Умеренные когнитивные нарушения (МНС) представляют собой раннюю стадию потери памяти или других когнитивных способностей (таких как речь или зрительное/пространственное восприятие) у субъектов (например, пациентов, страдающих AD), которые сохраняют способность самостоятельно выполнять большинство действий в повседневной жизни. Согласно некоторым вариантам осуществления введение композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем документе, приводит к отсроченному началу умеренного когнитивного нарушения (МНС) на более один месяц, более два месяца, более три месяца, более четыре месяца, более пять месяцев, более шесть месяцев, более семь месяцев, более восемь месяцев, более девять месяцев, более десять месяцев, более одиннадцать месяцев, более двенадцать месяцев, более один год, более два года, более три года, более четыре года, более пять лет, более шесть лет, более семь лет, более восемь лет, более девять лет или более десять лет, по сравнению с субъектами, которым не вводили композицию, описанную в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления введение композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем документе, приводит к отсроченному началу умеренного когнитивного нарушения (МНС) на от одного до трех месяцев, от одного до шести месяцев, от трех до шести месяцев, от трех до девяти месяцев, от шести до девяти месяцев, от одного до двенадцати месяцев, от шести до двенадцати месяцев, от одного до двух лет, от одного до трех лет, от одного до четырех лет, от одного до пяти лет, от одного до шести лет, от одного до семи лет, от одного до восьми лет, от одного до девяти лет, от одного до десяти лет, от десяти до двадцати лет или более, по сравнению с субъектами, которым не вводили

композицию, описанную в настоящем документе.

Субъектом, как правило, является млекопитающее, например, человек, собака, кошка, свинья, хомяк, крыса, мышь и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является человек. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется мутационным аллелем Пресенилина 1 (PSEN1) E280A. Субъект может быть гомозиготным (например, PSEN1 E280A<sup>+/+</sup>) или гетерозиготным (например, PSEN1 E280A<sup>+/-</sup>) по мутационному аллелю PSEN1 E280A. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, несущий мутацию Пресенилина 1 (PSEN1) E280A, не является гомозиготным по мутации Christchurch APOE3 (например, *APOE3 R136S<sup>+/-</sup>* или *APOE3 R136S<sup>-/-</sup>*).

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется аллелем APOE4. Субъект может быть гомозиготным (например, APOE4<sup>+/+</sup>) или гетерозиготным по APOE4 (например, APOE4<sup>+/-</sup>). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является гетерозиготным по APOE4, и второй аллель APOE выбран из APOE2 и APOE3.

Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят непосредственно в ЦНС, например, путем прямой инъекции в головной и/или спинной мозг. Примеры способов прямого введения в ЦНС включают без ограничения внутримозговую инъекцию, внутрижелудочковую инъекцию, интрацистернальную инъекцию, интрапаренхиматозную инъекцию, интратекальную инъекцию и любую комбинацию указанных. Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта приводит к экспрессии трансгена (например, экспрессии первого генного продукта, второго генного продукта и, если применимо, третьего генного продукта) в среднем мозге, стриатуме и/или коре головного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция в ЦНС приводит к экспрессии трансгена (например, экспрессии первого генного продукта, второго генного продукта и, если применимо, третьего генного продукта) в спинном мозге и/или CSF субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта содержит конвекционную усовершенствованную доставку (CED). Конвекционная усовершенствованная доставка представляет собой терапевтическую стратегию, которая включает хирургическое обнажение головного мозга и введение катетера малого диаметра непосредственно в целевую область головного мозга с последующей инфузией терапевтического средства (например, композиции или гAAV, как описано в настоящем документе) непосредственно в головной мозг субъекта. CED описана, например, в Debinski et al. (2009) *Expert Rev Neurother.* 9(10):1519-27.

Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят субъекту

периферически, например, путем периферической инъекции. Примеры периферической инъекции включают подкожную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутриартериальную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию или любую комбинацию указанного. Согласно некоторым вариантам осуществления периферическая инъекция представляет собой внутриартериальную инъекцию, например, инъекцию в сонную артерию субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления композицию (например, композицию, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем документе, вводят как периферически, так и непосредственно в ЦНС субъекту. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту вводят композицию путем внутриартериальной инъекции (например, инъекции в сонную артерию) и путем интрапаренхиматозной инъекции (например, интрапаренхиматозной инъекции посредством CED). Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция в ЦНС и периферическая инъекция являются одновременными (например, происходят в одно и то же время). Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция происходит до (например, за от 1 минуты до 1 недели или более) до периферической инъекции. Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция происходит после (например, через от 1 минуты до 1 недели или более) периферической инъекции.

Количество композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем документе, вводимой субъекту, будет варьироваться в зависимости от способа введения. Например, согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, как описано в настоящем документе, вводят субъекту при титре от приблизительно  $10^9$  геномных копий (GC)/кг до приблизительно  $10^{14}$  GC/кг (например, приблизительно  $10^9$  GC/кг, приблизительно  $10^{10}$  GC/кг, приблизительно  $10^{11}$  GC/кг, приблизительно  $10^{12}$  GC/кг, приблизительно  $10^{12}$  GC/кг или приблизительно  $10^{14}$  GC/кг). Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят высокий титр (например,  $>10^{12}$  геномных копий (GC)/кг гAAV) посредством инъекции в пространство CSF или посредством интрапаренхиматозной инъекции.

Композицию (например, композиция содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем документе, можно вводить субъекту один или множество раз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 или более) раз. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят субъекту непрерывно (например, хронически), например, посредством инфузионной помпы.

Согласно некоторым вариантам осуществления композицию (например, композицию содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV),

описанную в настоящем документе, можно вводить субъекту в комбинации с другими подходящими терапевтическими средствами (например, терапевтическими средствами для лечения АД). Неограничивающие примеры других подходящих терапевтических средств для лечения АД включают антитела к бета-амилоиду (например, адуканумаб, бапинезумаб и соланезумаб), донепезил, галантамин, ривастигмин, мемантин, суворексант и т.д.

### **Примеры**

*Пример 1. Защитная роль гомозигот Christchurch APOE3 при аутосомно-доминантной болезни Альцгеймера (ADAD)*

Мутация пресенилина 1 (PSEN1) E280A вызывает аутосомно-доминантную болезнь Альцгеймера (ADAD). Хотя существует некоторая вариабельность возраста клинического начала и течения заболевания, у пациентов, являющихся носителями мутации PSEN1 E280A, развиваются умеренные когнитивные нарушения (MCI) и деменция в соответствующих медианах возраста 44 года (95% CI, 43–45) и 49 лет (95% CI, 49–50). Было обнаружено, что у субъекта, несущего мутацию PSEN1 E280A, не развивались MCI до семидесяти лет, почти на три десятилетия позже типичного возраста начала заболевания. Дефицит памяти субъекта ограничен недавними событиями, и его неврологические обследования дали нормальные результаты. Полноэкзомное секвенирование подтвердило у него мутацию PSEN1 E280A и выявило две копии редкой мутации Christchurch (APOEch) (замена аргинина на серин в аминокислоте 136, соответствующей кодону 154) в APOE3. Было подтверждено, что мутация PSEN1 E280A является основным фактором риска, а гомозиготность по APOE3ch является наиболее вероятным генетическим модификатором для данного субъекта. В последующем исследовании субъекты, несущие одну копию мутации APOE3ch с мутацией PSEN1 E280A, не были защищены от развития MCI в среднем в возрасте 45 лет. Предполагается, что гомозиготность по APOE3ch необходима для отсрочки клинического начала ADAD (см., например, Arboleda-Velasquez et al., Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: a case report, NATURE MEDICINE, VOL 25, NOVEMBER 2019, p.1680–1683).

APOE, основной ген предрасположенности к болезни Альцгеймера с поздним началом, имеет три общих аллеля (APOE2, APOE3 и APOE4). Ранее полагали, что APOE3 нейтрален в отношении риска болезни Альцгеймера. APOE2 связан с более низким риском болезни Альцгеймера и более старшим возрастом наступления деменции, а каждая дополнительная копия APOE4 связана с более высоким риском и более молодым возрастом наступления деменции.

Интересно, что у субъектов, несущих гомозиготы по APOE3ch, наблюдали гораздо

более высокое количество бляшек бета-амилоида, чем у носителей PSEN1 E280A, которые не являются гомозиготными по APOE3ch. Несмотря на большое количество бета-амилоидных бляшек, величина и пространственная протяженность тау-белка PHF и нейродегенерация были относительно ограниченными. Распространение тау-белка у этого субъекта было ограничено медиальной височной и затылочной областями с относительным сохранением других областей, которые характерно поражаются на клинических стадиях болезни Альцгеймера. Кроме того, скорость церебрального метаболизма глюкозы была сохранена у этого субъекта в областях, которые, как известно, преимущественно поражаются болезнью Альцгеймера. Магнитно-резонансная томография показала, что у этого субъекта была такая же степень атрофии головного мозга, как и у других носителей PSEN1 E280A, у которых MCI развивались в возрасте сорока лет. У субъекта также был низкий уровень легкой цепи нейрофиламента (NfL) в плазме, что является маркером наследственной болезни Альцгеймера. Эти наблюдения подтвердили, что гомозиготы APOE3ch выполняют защитную роль, ограничивая патологию тау-белка и нейродегенерацию, несмотря на высокую нагрузку бета-амилоидных бляшек.

Позже было подтверждено, что агрегация A $\beta$ 42 снижалась в присутствии белка APOE3ch по сравнению с агрегацией A $\beta$ 42 в белке APOE3 дикого типа. Уровень агрегации A $\beta$ 42 был подобным в присутствии APOE3ch и APOE2. Эти результаты предполагают, что APOE3ch менее способен запускать агрегацию A $\beta$ 42.

Мутация R136S расположена в области APOE, которая, как известно, играет роль в связывании с рецепторами липопротеинов (LDLR) и гепарансульфатпротеогликанами (HSPG). Предыдущие отчеты показали, что по сравнению с APOE3, APOE2 и APOE3ch связаны со снижением связывания LDLR на 98% и 60%, соответственно. Было сделано предположение, что связывание APOE с HSPG необходимо для того, чтобы HSPG способствовали агрегации амилоида- $\beta$  и нейрональному поглощению внеклеточного тау-белка. Было обнаружено, что по сравнению с другими изоформами APOE APOE3ch проявляет самую низкую способность связывать гепарин, а блокирование взаимодействия APOE-HSPG антителами воспроизводит защитный эффект APOE3ch.

Настоящее изобретение по меньшей мере частично основано на открытии защитной роли APOE3ch у субъектов, несущих мутацию PSEN1 E280A. Доставка APOE3ch в качестве генной терапии носителям PSEN1 E280A (например, носителям PSEN1 E280A, которые не являются гомозиготными по APOE3ch) может давать преимущества, такие как отсрочка наступления MCI, уменьшение тау-патологии и т.д.

В этом примере описаны выделенные нуклеиновые кислоты (например, векторы, такие как векторы rAAV и gAAV, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты),



содержащие экспрессионную конструкцию, кодирующую белок Christchurch APOE для сверхэкспрессии белка Christchurch APOE. Белок APOE Christchurch может быть рекомбинантным белком Christchurch APOE2 (APOE2ch) или рекомбинантным белком Christchurch APOE3 (APOE3ch). Кодирующие последовательности APOE2ch и/или APOE3ch кодированы для того, чтобы значительно отличаться от эндогенной последовательности APOE2 в клетках, чтобы они не распознавались кшРНК, нацеленными на APOE дикого типа, независимо от изоформы.

Выделенная нуклеиновая кислота может дополнительно включать кодирующие последовательности для ингибирующей нуклеиновой кислоты, нацеленной на одну или несколько изоформ гена *APOE* (например, APOE4, и/или APOE3, и/или APOE2). Согласно некоторым вариантам осуществления конструкции, описанные в этом примере, полезны для лечения субъектов, страдающих болезнью Альцгеймера (AD) (например, аутосомно-доминантной болезнью Альцгеймера) или с подозрением на ее наличие, которые являются носителями мутации PSEN1 E280A. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект не является гомозиготным по мутации Christchurch APOE3 (например, APOE3 R136S<sup>+/+</sup>).

Выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие кшРНК, используются для нокдауна экспрессии изоформ APOE4 и/или APOE2 специфически, как *in vitro*, так и *in vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления кшРНК не являются аллель-специфическими, например, они также способны подавлять экспрессию других изоформ APOE (например, E2, E3 или E4).

Последовательности, кодирующие кшРНК и трансген, могут быть функционально связаны с одними и теми же или с разными промоторами. кшРНК экспрессируются под отдельным промотором, обычно промотором Pol III (например, промотор H1) или промотором Pol II (например, CVA, T7 и т.д.). Как правило, кшРНК функционально связана с промотором Pol II, помещенным в интронную последовательность против хода транскрипции от открытой рамки считывания, содержащей кодированный трансген APOE2ch и/или APOE3ch.

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV), содержащие выделенную нуклеиновую кислоту, получают с использованием клеток, таких как клетки HEK293, для тройной плазмидной трансфекции. Последовательности ITR фланкируют экспрессионную конструкцию, которая обычно содержит один или несколько из следующих элементов: по меньшей мере один промоторный/энхансерный элемент, 3'-полиА-сигнал и посттрансляционные сигналы, такие как элемент WPRE. Множественные генные продукты экспрессируются одновременно, такие как белок APOE2ch и/или APOE3ch и одна или

несколько ингибирующих нуклеиновых кислот (например, ингибирующие нуклеиновые кислоты, нацеленные на изоформы APOE4 и/или APOE2 APOE). Присутствие короткой интронной последовательности, которая эффективно сплайсируется, против хода транскрипции от экспрессируемого гена, может улучшить уровень экспрессии. кшРНК и другие регуляторные РНК потенциально могут быть включены в эти последовательности.

*Пример 2. Анализы на основе клеток вирусной трансдукции в клетки APOE4<sup>+/+</sup>*

Клетки получали, например, в виде фибробластов от пациентов, страдающих ADAD, моноцитов или клеток hES, или полученных от пациентов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). Эти клетки накапливают белковые бляшки, содержащие белок амилоид-β, и клубки, содержащие скрученные нити тау-белка.

Используя такие клеточные модели, нейродегенеративные характеристики, связанные с ADAD, количественно оценивали с точки зрения накопления белковых агрегатов, таких как бляшки и клубки, например, с использованием α-амилоид-β антитела или α-фосфо-тау антитела, с последующей визуализацией с использованием флуоресцентной микроскопии. Визуализацию нейродегенеративных характеристик, связанных с ADAD, с помощью ICC для белковых маркеров, таких как амилоид-β, фосфо-тау, PSEN1 E280A, APOE3, APOE3ch или APOE4, также проводили. Вестерн-блоттинг, ELISA и/или количественную ПЦР применяли для количественного определения уровней экспрессии APOE3ch в этих клетках.

Терапевтические конечные точки (например, уменьшение патологии, связанной с ADAD) измеряли в контексте экспрессии трансдукции гAAV для подтверждения и количественной оценки активности и функции. Уровни амилоида-β и фосфо-Тау также определяли количественно с помощью Вестерн-блоттинга, ELISA и/или количественной ПЦР.

*Пример 3. Клинические испытания у пациентов, страдающих ADAD*

В этом примере описаны клинические испытания для оценки безопасности и эффективности гAAV, как описано в раскрытии, у пациентов, страдающих ADAD (например, носителей PSEN1 E280A, которые не являются гомозиготными по APOE3ch).

Клинические испытания гAAV согласно настоящему изобретению для лечения ADAD проводили с использованием дизайна исследования, аналогичного описанному Grabowski et al. (1995) *Ann. Intern. Med.* 122(1):33-39. гAAV доставляются в CSF, интрапаренхиматозно в гиппокамп или в другую область головного мозга или периферически.

Измеряемыми конечными точками были уровни бляшек бета-амилоида, клубков тау-белка, моторные и когнитивные конечные точки, а также уровни белков APOE3ch, APOE4 и APOE2.

*Пример 4. Клинические испытания у пациентов, страдающих ADAD, в комбинации с амилоид-β антителами*

В этом примере описаны клинические испытания для оценки безопасности и эффективности гAAV, как описано в раскрытии, используемых в комбинации с амилоид-β антителами (например, бапинезумаб и соланезумаб), у пациентов, страдающих ADAD (например, носители PSEN1 E280A, которые не являются гомозиготными по APOE3ch).

Клинические испытания гAAV согласно настоящему изобретению в комбинации с амилоид-β антителами для лечения ADAD проводили с использованием дизайна исследования, аналогичного описанному Grabowski et al. (1995) *Ann. Intern. Med.* 122(1):33-39. гAAV доставляются в CSF, интрапаренхиматозно в гиппокамп или в другую область головного мозга или периферически.

Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV согласно настоящему изобретению действуют синергетически с анти-амилоид-β антителами со снижением вероятности развития у пациентов, страдающих ADAD, связанных с амилоидом аномалий визуализации (ARIA), которые сильно коррелируют с генотипом APOE. ARIA представляют собой спектр аномалий, наблюдаемых у пациентов, страдающих AD, которые связаны с терапией, модифицирующей амилоид, особенно с человеческими моноклональными антителами. Существует два типа ARIA: ARIA-E, который относится к отеку головного мозга, и ARIA-H, который относится к микрокровоизлияниям в головной мозг.

Оцениваемыми конечными точками были визуализация головного мозга до и после лечения, чтобы определить, имела ли место ARIA и снижают ли гAAV согласно настоящему изобретению вероятность ARIA, уровни бляшек амилоида-β, клубков тау-белка, двигательные и когнитивные конечные точки, а также уровни белков APOE3ch, APOE4 и APOE2.

*Пример 5. Клинические испытания у пациентов, страдающих ADAD, имеющих мутацию PSEN1 E280A, которые являются APOE3ch<sup>+/+</sup>, APOE3ch<sup>+/-</sup> и APO3ch<sup>-/-</sup>*

В этом примере описаны клинические испытания для оценки эффективности гAAV, как описано в раскрытии, в снижении повышенного риска других патологий, включая инсульт, ишемическую болезнь сердца, атеросклероз, плохое восстановление после черепно-мозговой травмы и восстановление когнитивных функций после хирургической

операции на аппарате шунтирования, у пациентов с мутацией PSEN1 E280A, которые не являются *APOE3ch<sup>+/+</sup>*, по сравнению с пациентами, которые являются *APOE3ch<sup>+/-</sup>* или *APO3ch<sup>-/-</sup>*.

Клинические испытания гAAV согласно настоящему изобретению для лечения AD и снижения повышенного риска других состояний, связанных с пациентами, несущими мутацию PSEN1 E280A, которые являются *APOE3ch<sup>+/-</sup>* или *APO3ch<sup>-/-</sup>*, проводили с использованием дизайна исследования, аналогичного описанному Grabowski et al. (1995) *Ann. Intern. Med.* 122(1):33-39. гAAV доставляются в CSF, интрапаренхиматозно в гиппокамп или в другую область головного мозга или периферически.

Конечными точками, оцениваемыми до и после лечения с применением гAAV согласно настоящему изобретению, являются артериальное давление, уровни холестерина и сахара в крови, моторные и когнитивные конечные точки, MRI, PET и ультразвуковая визуализация коронарных артерий, восстановление после когнитивной травмы и восстановление после операции на аппарате кровообращения.

*Пример 6. Профилактика ADAD или лечение ADAD у пациентов-носителей мутации PSEN1 E280A*

В этом примере описаны клинические испытания для оценки эффективности гAAV, как описано в раскрытии, в снижении риска развития AD у субъектов, имеющих мутацию PSEN1 E280A, и при лечении AD у пациентов, несущих мутацию PSEN1 E280A. Пациенты, несущие мутацию PSEN1 E280A, могут быть либо *APOE3ch<sup>+/-</sup>*, либо *APOE3ch<sup>-/-</sup>*.

Клинические испытания гAAV согласно настоящему изобретению для профилактики или лечения AD у носителей мутации PSEN1 E280A проводили с использованием дизайна исследования, подобного описанному Grabowski et al. (1995) *Ann. Intern. Med.* 122(1):33-39. гAAV доставляются в CSF, интрапаренхиматозно в гиппокамп или в другую область головного мозга или периферически.

Конечными точками, оцениваемыми до и после лечения гAAV согласно настоящему изобретению, являются уровни *APOE3ch*, *APOE4* и *APOE2* в CSF и крови, а также когнитивные и двигательные конечные точки.

*Пример 7. In vitro валидация кшРНК по эндогенному сайленсингу APOE и сверхэкспрессии белка Christchurch APOE*

Множественные плазмиды, содержащие уникальные кшРНК против APOE и кодон-оптимизированную по кодирующую последовательность белка Christchurch APOE (например, *APOE3ch* и/или *APOE2ch*), оценивали в скрининге трансфекции *in vitro* для

оценки степени нокдауна АРОЕ (например, АРОЕ4 и/или АРОЕ2) и гетерологичной экспрессии белка Christchurch АРОЕ (например, АРОЕ3ch и/или АРОЕ2ch). Плазмиды специально разработаны для селективного нокдауна эндогенного гена АРОЕ без воздействия на кодируемый вектором белок Christchurch АРОЕ (например, АРОЕ3ch и/или АРОЕ2ch). Множественные плазмиды показывают снижение эндогенного АРОЕ и экспрессию белка Christchurch АРОЕ (например, АРОЕ3ch и/или АРОЕ2ch) с помощью количественной RT-PCR. Кандидаты кшРНК показывают значительное снижение эндогенного АРОЕ без влияния на экспрессию белка Christchurch АРОЕ (например, АРОЕ3ch и/или АРОЕ2ch).

*Пример 8. In vivo валидация кшРНК по эндогенному сайленсингу АРОЕ и сверхэкспрессии белка Christchurch АРОЕ (например, АРОЕ3ch и/или АРОЕ2ch)*

Кандидаты кшРНК, демонстрирующие значительное снижение эндогенного АРОЕ без воздействия на кодон-оптимизированную кодирующую последовательность белка Christchurch АРОЕ (например, кодирующую последовательность АРОЕ3ch и/или АРОЕ2ch), отбирали для дальнейшего исследования *in vivo*. Мышиную модель с нокаутом АРОЕ4 (KI) применяли для оценки *in vivo* эффективности кандидатов кшРНК против АРОЕ4. У мышей АРОЕ4 KI оба мышиных аллеля *ApoE* заменяли человеческим АРОЕ-ε4. Мышам (n = 5) вводили векторы, несущие кандидатные кшРНК против АРОЕ4, посредством интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV), и через 60 дней после инъекции анализировали биораспределение мРНК АРОЕ4 человека.

### **Эквиваленты**

После описания нескольких аспектов по меньшей мере одного варианта осуществления настоящего изобретения следует необходимо отметить, что специалистам в данной области техники очевидны различные изменения, модификации и усовершенствования. Предполагается, что такие изменения, модификации и усовершенствования являются частью настоящего раскрытия и находятся в пределах сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно, приведенное выше описание и чертежи приведены только в качестве примера.

Хотя здесь некоторые варианты осуществления настоящего изобретения были описаны и проиллюстрированы, специалистам в данной области техники очевидны множество других средств и/или структур для выполнения функций, и/или получения результатов, и/или одного или нескольких из преимуществ, описанных в настоящем документе, и каждое из таких изменений и/или модификаций считается охватываемым объемом настоящего изобретения. В общем, специалистам в данной области техники

очевидно, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящем документе, предназначены для примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которого/которых используется настоящее изобретение. Специалисты в данной области техники могут определить или установить, не используя рутинных экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем документе. Таким образом, следует понимать, что вышеприведенные варианты осуществления представлены только в качестве примера, и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов изобретение может быть реализовано иначе, чем конкретно описано и заявлено. Настоящее изобретение направлено на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал и/или способ, описанные в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы и/или способы не являются взаимно несовместимыми, входит в объем настоящего изобретения.

При использовании в настоящем документе в описании и в формуле изобретения форму единственного числа следует понимать как означающие «по меньшей мере один», если явно не указано иное.

Фраза «и/или», используемая в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, должна пониматься как означающая «один или оба» из элементов, соединенных таким образом, т.е. элементы, которые совместно присутствуют в одних случаях и раздельно присутствуют в других случаях. При необходимости могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно указанных посредством «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 использовании в сочетании с открытой формой, такой как «содержащий», может относиться согласно одному варианту осуществления к А без В (необязательно включая элементы, отличные от В), согласно другому варианту осуществления – к В без А (необязательно включая элементы, отличные от А), согласно еще одному варианту осуществления – как к А, так и к В (необязательно включая другие элементы) и т.д.

Как используется в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, «или» следует понимать как имеющее то же значение, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в перечне «или» или «и/или» следует понимать как включающие, т.е. включение по меньшей мере одного, но также включающее более

одного из числа или перечня элементов, и, при желании, дополнительные элементы, не включенные в перечень. 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 ровно одного элемента из числа или перечня элементов. В общем, в контексте настоящего изобретения термин «или» должен интерпретироваться только как обозначающий исключительные альтернативы (т.е. «один или другой, но не оба»), когда ему предшествуют термины исключительности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «точно один из». «Состоящий в основном из» при использовании в формуле изобретения имеет обычное значение, используемое в области патентного права.

Как используется в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, фразу «по меньшей мере один» в отношении перечня из одного или нескольких элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из каждого и каждый элемент, конкретно указанный в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что могут необязательно присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно указанных в перечне элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны они или не связаны с конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, «по меньшей мере один из А и В» (или в качестве эквивалента «по меньшей мере один из А или В», или в качестве эквивалента «по меньшей мере один из А и/или В») может относиться согласно одному варианту осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более одного, А без присутствия В (и необязательно включая элементы, отличные от В), согласно другому варианту осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более одного, В без присутствия А (и необязательно включая элементы, отличные от А), согласно еще одному варианту осуществления осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более одного, А, и по меньшей мере одному, необязательно включая более одного, В (и необязательно включающего другие элементы), и т.д.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как «содержащий», «включающий», «несущий», «имеющий», «содержащий», «включающий», «охватывающий» и т.п. следует понимать как открытые, т.е. означающие включение, но не ограничение этим. Только переходные фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из» должны быть закрытыми или полужакрытыми переходными

фразами, соответственно, как представлено в the United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Section 2111.03.

Использование порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и т.д. в формуле изобретения для модификации элемента формулы изобретения само по себе не означает какого-либо приоритета, предшествования или порядка одного элемента формулы изобретения над другим или временной порядок, в котором выполняются действия способа, а служит только для метки, чтобы отличить один элемент формулы изобретения, имеющий определенное наименование, от другого элемента, имеющего то же наименование (но для использования порядкового термина), чтобы отличить элементы формулы изобретения.

Также должно быть понятно, что, если явно не указано обратное, в любых способах, заявленных в настоящем документе, которые включают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа указаны.

### **Последовательности**

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная кассета, кодирующая один или несколько генных продуктов (например, первый, второй и/или третий генный продукт), содержит или состоит из последовательности, как представлено в любой из SEQ ID NO: 1-24. Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт кодируется частью (например, фрагментом) последовательности, как представлено в любой из SEQ ID NO: 1-24. Специалисту известно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие ингибирующие нуклеиновые кислоты, могут описывать последовательность, в которой все «Т» заменены на «U» или наоборот.

Последовательность нуклеиновой кислоты APOE4 человека (SEQ ID NO: 1)

ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGC  
 CAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCG  
 AGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAAGTGGCACTGGGTTCGCTTTTGGGATTACCTG  
 CGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTC  
 ACCCAGGAAGTGGAGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAA  
 ATCGGAAGTGGAGGAACAAGTGGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGT  
 CCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGCGC  
 GGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGA  
 GGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCG  
 CGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG  
 GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAAACAGG



GCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGG  
 CCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACC  
 CGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGA  
 GGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGA  
 GCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGA  
 AGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGA

Последовательность нуклеиновой кислоты APOE2 человека (SEQ ID NO: 2)

ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGC  
 CAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCG  
 AGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGC  
 GCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCA  
 CCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAA  
 ATCGGAACTGGAGGAACAACACTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGT  
 CCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC  
 GGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGA  
 GGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCG  
 CGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG  
 GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGG  
 GCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGG  
 CCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACC  
 CGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGA  
 GGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGA  
 GCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGA  
 AGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGA

Аминокислотная последовательность ApoE2 человека (SEQ ID NO: 3)

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWD  
 YLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLS  
 KELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKLLRD  
 ADDLQKCLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQA  
 WGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRACLEEQAAQIRLQAEAFQARLKSWFEP  
 LVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

Последовательность нуклеиновой кислоты APOE3 человека (SEQ ID NO: 4)

AGAGACGACCCGACCCGCTAGAAGACTGGCCAATCACAGGCAGGAAGATGAA  
 GGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGA  
 GCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGA

GCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGC  
 AGACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCACCCAGGAAC  
 TGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTG  
 GAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT  
 GCAGGCGGGCGCAGGCCCGGCTGGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGG  
 TGCAGTACCGCGGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGG  
 GTGCGCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGAT  
 GACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCG  
 CGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCG  
 GGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCCAGGCCTG  
 GGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGACCGCC  
 TGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCC  
 CAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAG  
 CCCCTGGTGGAAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGC  
 TGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGAACGCCGAAGCC  
 TGCAGCCATGCGACCCACGCCACCCCGTGCTCCTGCCTCCGCGCAGCCTGCAGCG  
 GGAGACCCTGTCCCCGCCCCAGCCGTCCTCCTGGGGTGGACCCTAGTTTAATAAAGA  
 TTCACCAAGTTTCACGCA

Аминокислотная последовательность ApoE3 человека (SEQ ID NO: 5)

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWD  
 YLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLS  
 KELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKLLRD  
 ADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQA  
 WGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEP  
 LVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

Мутантная аминокислотная последовательность Christchurch ApoE3 человека (SEQ ID NO: 6)

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFW  
 DYLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARL  
 SKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKLRKLLRD  
 ADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQA  
 WGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEP  
 LVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

Мутантная последовательность нуклеиновой кислоты Christchurch ApoE3 человека (SEQ ID NO: 7)

ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGC  
 CAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCAGCTGCGCCAGCAGACCG  
 AGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTTCGCTTTTGGGATTACCTG  
 CGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTC  
 ACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAA  
 ATCGGAACTGGAGGAACA ACTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGT  
 CCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC  
 GGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGA  
 GGAGCTGCGGGTGAGCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCG  
 CGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG  
 GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAACAGG  
 GCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGG  
 CCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACC  
 CGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGA  
 GGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGA  
 GCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGA  
 AGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGA

Мутантная аминокислотная последовательность Christchurch ApoE2 человека (SEQ ID NO: 8)

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWD  
 YLRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAETRARLS  
 KELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKLRKLLRD  
 ADDLQKCLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQA  
 WGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEP  
 LVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

Мутантная последовательность нуклеиновой кислоты Christchurch ApoE2 человека (SEQ ID NO: 9)

ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGC  
 CAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCAGCTGCGCCAGCAGACCG  
 AGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTTCGCTTTTGGGATTACCTGC  
 GCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCA  
 CCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAA  
 ATCGGAACTGGAGGAACA ACTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGT  
 CCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC  
 GGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGA

GGAGCTGCGGGTGAGCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCG  
 CGATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGG  
 GCGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGG  
 GCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGG  
 CCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACC  
 CGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGA  
 GGAGCAGGCCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGA  
 GCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGA  
 AGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGA

Мутантная кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты  
 Christchurch ApoE3 человека (SEQ ID NO: 10)

ATGAAGGTGCTGTGGGCCGCCCTGCTGGTGACCTTCCTGGCCGGCTGCCAGGC  
 CAAaGTcGAaCAGGCCGTcGAGACCGAGCCCAGCCCAGCTGCGCCAGCAGACCGAG  
 TGCCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAGCTGGCCCTGGGCCGCTTCTGGGACTACCTGCGC  
 TGGGTGCAGACCCTGAGCGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTGAGCAGCCAGGTGAC  
 CCAGGAGCTGCGCGCCCTGATGGACGAGACCATGAaGAaCTcAAaGctTAtAAGAGCG  
 AGCTGGAGGAGCAGCTGACCCCCGTGGCCGAGGAGACCCGCGCCCGCCTGAGCAAG  
 GAGCTGCAGGCCGCCAGGCCCGCCTGGGCGCCGACATGGAGGACGTGTGCGGCCG  
 CCTGGTGCAGTACCGCGGCCGAGGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGAGCACCGAGGAGC  
 TCGCGCTGAGCCTGGCCAGCCACCTGCGCAAGCTGCGCAAGCGCCTGCTGCGCGACG  
 CCGACGACCTGCAGAAGCGCCTGGCCGTGTACCAGGCCGGCGCCCGCGAGGGCGCC  
 GAGCGCGGCCTGAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGCCCCCTGGTGGAGCAGGGCCGC  
 GTGCGCGCCGCCACCGTGGGCAGCCTGGCCGGCCAGCCCCTGCAGGAGCGCGCCCAG  
 GCCTGGGGCGAGCGCCTGCGCGCCCGCATGGAGGAGATGGGCAGCCGCACCCGCGA  
 CCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCCGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGC  
 AGGCCCAGCAGATCCGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTGAAGAGCTGGT  
 TCGAGCCCCTGGTGGAGGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGCCTGGTGGAGAAGGTG  
 CAGGCCCGCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCCGTGCCAGCGACAACCACTAA

Мутантная кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты  
 Christchurch ApoE человека (SEQ ID NO: 11)

ATGAAGGTGCTGTGGGCCGCCCTGCTGGTGACCTTCCTGGCCGGCTGCCAGGC  
 CAAaGTcGAaCAGGCCGTcGAGACCGAGCCCAGCCCAGCTGCGCCAGCAGACCGAG  
 TGCCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAGCTGGCCCTGGGCCGCTTCTGGGACTACCTGCGC  
 TGGGTGCAGACCCTGAGCGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTGAGCAGCCAGGTGAC  
 CCAGGAGCTGCGCGCCCTGATGGACGAGACCATGAaGAaCTcAAaGctTAtAAGAGCG

AGCTGGAGGAGCAGCTGACCCCCGTGGCCGAGGAGACCCGCGCCCGCCTGAGCAAG  
 GAGCTGCAGGCCGCCAGGCCCGCCTGGGCGCCGACATGGAGGACGTGTGCGGCCG  
 CCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGAGCACCGAGGAGC  
 TGC GCGTGAGCCTGGCCAGCCACCTGCGCAAGCTGCGCAAGCGCCTGCTGCGCGACG  
 CCGACGACCTGCAGAAGTGCCTGGCCGTGTACCAGGCCGGCGCCCGCGAGGGCGCCG  
 AGCGCGGCCTGAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGCCCCCTGGTGGAGCAGGGCCGCG  
 TGC GCGCCGCCACCGTGGGCAGCCTGGCCGGCCAGCCCCTGCAGGAGCGCGCCAGG  
 CCTGGGGCGAGCGCCTGCGCGCCCGCATGGAGGAGATGGGCAGCCGCACCCGCGAC  
 CGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCCGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCA  
 GGCCCAGCAGATCCGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTGAAGAGCTGGTT  
 CGAGCCCCTGGTGGAGGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGCCTGGTGGAGAAGGTGC  
 AGGCCGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCCGTGCCCAGCGACAACCACTAA

Последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК 1 ApoE (SEQ ID NO: 12)

TTGTAGGCCTTCAACTCCTTC

Последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК 1 ApoE (SEQ ID NO: 13)

GAAGGAGTTGAAGGCCTACAA

кшПНК 1 ApoE с петлей (SEQ ID NO: 14)

TTGTAGGCCTTCAACTCCTTCCATCTGTGGCTTCACTGAAGGAGTTGAAGGCCT  
 АСАА

Искусственная микроПНК 1 ApoE (SEQ ID NO: 15)

ttgtcatcctcccacggtggccattgttccatgtgagtgctagtaacaggccttgtgtcctTTGTAGGCCTTCAACT  
 CCTTCCATCTGTGGCTTCACTGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAGacaacagcatacagccttcagaa  
 gcctcca

Последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК 2 ApoE (SEQ ID NO: 16)

ctccaccgcttgcctccactt

Последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК 2 ApoE (SEQ ID NO: 17)

aaggtggagcaagcggtggag

кшПНК 2 ApoE с петлей (SEQ ID NO: 18)

ctccaccgcttgcctccacttAGTGAAGCCACAGATGaaggtggagcaagcggtggag

Искусственная микроПНК 2 ApoE (SEQ ID NO: 19)

tggaggcttgcctgaaggctgtatgctgtgtcctccaccgcttgcctccacttAGTGAAGCCACAGATGaaggtgga  
 gcaagcggtggagaggacasaaggcctgttactagcactcacatggaacaatggccaccgtgggaggatgacaa

Последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК 3 ApoE (SEQ ID NO: 20)

Tttgtaggccttcaactcc

Последовательность нуклеиновой кислоты кшПНК 3 ApoE (SEQ ID NO: 21)

ggagttgaaggcctacaaa

кшРНК 3 АроЕ с петлей (SEQ ID NO: 22)

ttttaggccttcaactccAGTGAAGCCACAGATGggagttgaaggcctacaaa

Искусственная микроРНК 3 АроЕ (SEQ ID NO: 23)

tggaggcttgctgaaggctgtatgctgtgtctttgtaggccttcaactccAGTGAAGCCACAGATGggagttgaagg  
cctacaaaaggacasaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggccaccgtgggaggatgacaa

Последовательность нуклеиновой кислоты AAV2 ITR дикого типа (SEQ ID NO: 24)

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC  
ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA  
GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

### **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Christchurch APOE.

2. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, где белок Christchurch APOE представляет собой белок Christchurch APOE2.

3. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 2, где белок Christchurch APOE2 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80% идентичную SEQ ID NO: 8.

4. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 2 или 3, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок Christchurch APOE2, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 80% идентичную SEQ ID NO: 9.

5. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, где белок Christchurch APOE представляет собой белок Christchurch APOE3.

6. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 5, где белок Christchurch APOE3 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 6.

7. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 5 или 6, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок Christchurch APOE3, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 80% идентичную SEQ ID NO: 7.

8. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-7, где экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность гена *APOE*.

9. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-8, где экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность APOE4.

10. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-9, где экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность APOE2.

11. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-8, где экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность *APOE4* и *APOE2*.

12. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 8-11, где ингибирующая нуклеиновая кислота кодируется последовательностью, как представлено в любой из SEQ ID NO: 12-23.

13. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-12, где экспрессионная конструкция дополнительно содержит первый промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Christchurch *APOE*.

14. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 13, где первый промотор функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность гена *APOE*.

15. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 13, где экспрессионная конструкция дополнительно содержит второй промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность гена *APOE*.

16. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 13-15, где первый промотор и/или второй промотор независимо представляет собой промотор бета-актина кур (CBA), промотор CAG, промотор CD68 или промотор JeT.

17. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-16, где экспрессионная конструкция фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

18. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 17, где ITR представляют собой ITR AAV2.

19. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-18, где выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO: 6-11.

20. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-19.

21. Вектор по п. 20, где вектор представляет собой плазмиду.

22. Вектор по п. 20, где вектор представляет собой вирусный вектор, где необязательно вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор AAV (rAAV) или бакуловирусный вектор.

23. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий:

(i) капсидный белок AAV и

(ii) выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-19 или вектор по п. 22.

24. rAAV по п. 23, где капсидный белок AAV способен проникать через



гематоэнцефалический барьер, где необязательно капсидный белок представляет собой капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAVrh.10.

25. rAAV по п. 23 или 24, где rAAV трансдуцирует нейроны и клетки, не относящиеся к нейронам, центральной нервной системы (ЦНС).

26. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-19, вектор по любому из пп. 20-22 или rAAV по любому из пп. 23-25.

27. Композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-19, вектор по любому из пп. 20-22 или rAAV по любому из пп. 23-25.

28. Композиция по п. 27, где композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

29. Способ, предусматривающий введение субъекту, страдающему болезнью Альцгеймера или с подозрением на ее наличие, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-19, вектора по любому из пп. 20-22, rAAV по любому из пп. 23-25 или композиции по пп. 27 или 28.

30. Способ по п. 29, где введение предусматривает прямую инъекцию в ЦНС субъекта, где необязательно прямая инъекция предусматривает внутримозговую инъекцию, интрапаренхиматозную инъекцию, интратекальную инъекцию или любую их комбинацию.

31. Способ по п. 22, где прямая инъекция в ЦНС субъекта предусматривает конвекционную усовершенствованную доставку (CED).

32. Способ по любому из пп. 29-31, где введение предусматривает периферическую инъекцию, где необязательно периферическая инъекция предусматривает внутривенную инъекцию.

33. Способ по любому из пп. 29-32, где субъект страдает аутосомно-доминантной болезнью Альцгеймера или имеет подозрение на ее наличие (ADAD).

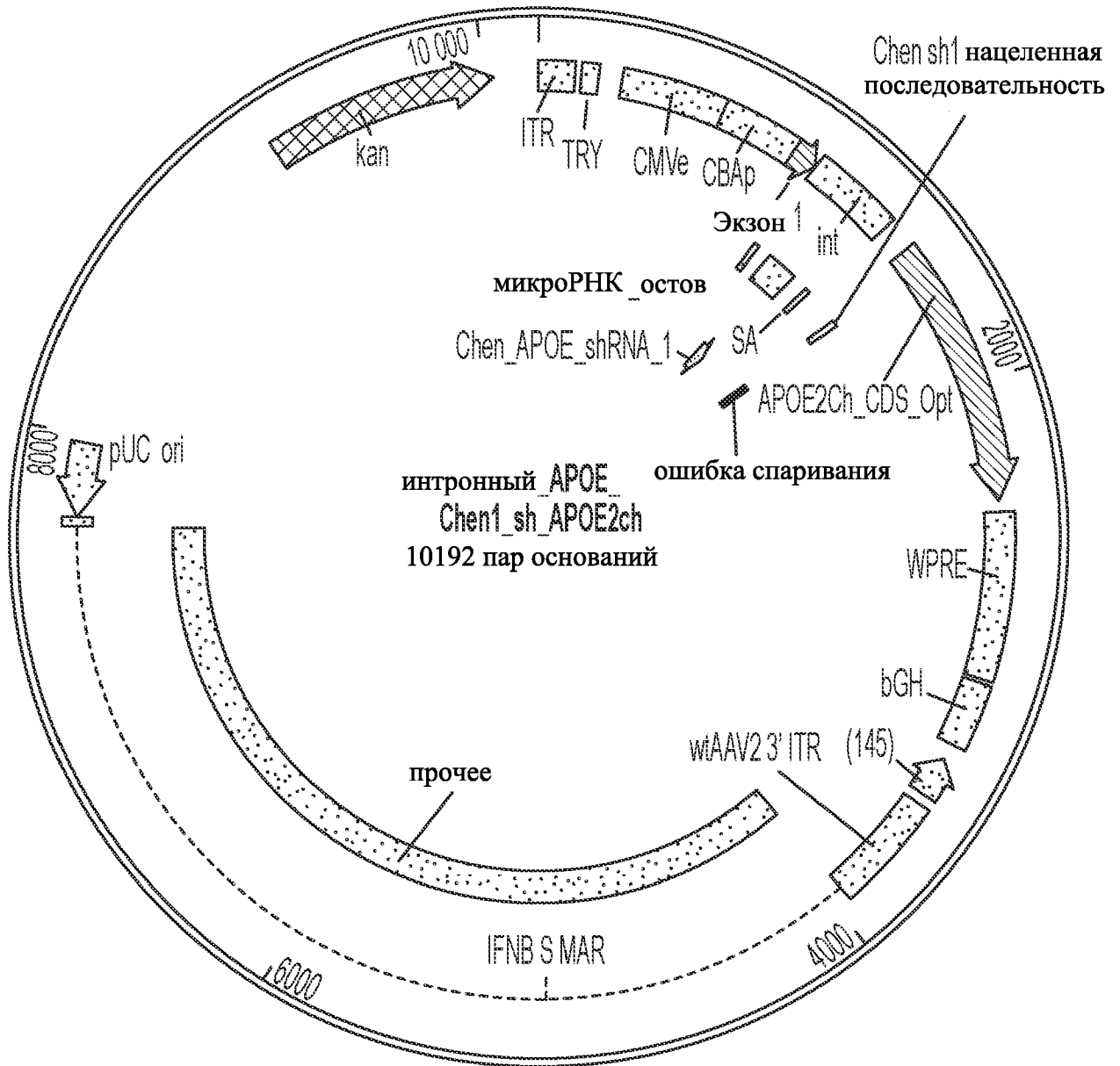
34. Способ по любому из пп. 29-33, где субъект имеет по меньшей мере одну мутацию в гене *PSEN1*.

35. Способ по п. 34, где мутация в гене *PSEN1* вызывает мутацию E280A в белке пресенилин 1.

36. Способ по п. 34, где субъект является гомозиготным по мутации *PSEN1* E280A.

37. Способ по любому из пп. 29-36, где субъект не является гомозиготным по мутации Christchurch *APOE3*, где мутация Christchurch *APOE3* вызывает мутацию R136S в белке *APOE3*.

38. Способ по любому из пп. 29-37, где введение приводит к отсрочке наступления умеренных когнитивных нарушений (МЦ) по сравнению с субъектами, не получающими введение.



Фиг. 1

**Консенсусные**

ApoE2  
ApoE2Ch  
ApoE3Ch

MKVLWAALLVTFFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRRQQTEWQSGQRWEL

M:K:V:L:W:A:A:L:L:V:T:F:L:A:G:C:Q:A:K:V:E:Q:A:V:E:T:E:P:E:P:E:L:R:Q:Q:T:E:W:Q:S:G:Q:R:W:E:L

M:K:V:L:W:A:A:L:L:V:T:F:L:A:G:C:Q:A:K:V:E:Q:A:V:E:T:E:P:E:P:E:L:R:Q:Q:T:E:W:Q:S:G:Q:R:W:E:L

M:K:V:L:W:A:A:L:L:V:T:F:L:A:G:C:Q:A:K:V:E:Q:A:V:E:T:E:P:E:P:E:L:R:Q:Q:T:E:W:Q:S:G:Q:R:W:E:L

**Консенсусные**

ApoE2  
ApoE2Ch  
ApoE3Ch

TPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQ

T:P:V:A:E:E:T:R:A:R:L:S:K:E:L:Q:A:A:Q:A:R:L:G:A:D:M:E:D:V:C:G:R:L:V:Q:Y:R:G:E:V:Q:A:M:L:G:Q

T:P:V:A:E:E:T:R:A:R:L:S:K:E:L:Q:A:A:Q:A:R:L:G:A:D:M:E:D:V:C:G:R:L:V:Q:Y:R:G:E:V:Q:A:M:L:G:Q

T:P:V:A:E:E:T:R:A:R:L:S:K:E:L:Q:A:A:Q:A:R:L:G:A:D:M:E:D:V:C:G:R:L:V:Q:Y:R:G:E:V:Q:A:M:L:G:Q

**Консенсусные**

ApoE2  
ApoE2Ch  
ApoE3Ch

PLVEQGRVRAATVGS LAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTDR

P:L:V:E:Q:G:R:V:R:A:A:T:V:G:S:L:A:G:Q:P:L:Q:E:R:A:Q:A:W:G:E:R:L:R:A:R:M:E:E:M:G:S:R:T:R:D:R

P:L:V:E:Q:G:R:V:R:A:A:T:V:G:S:L:A:G:Q:P:L:Q:E:R:A:Q:A:W:G:E:R:L:R:A:R:M:E:E:M:G:S:R:T:R:D:R

P:L:V:E:Q:G:R:V:R:A:A:T:V:G:S:L:A:G:Q:P:L:Q:E:R:A:Q:A:W:G:E:R:L:R:A:R:M:E:E:M:G:S:R:T:R:D:R

**Консенсусные**

ApoE2  
ApoE2Ch  
ApoE3Ch

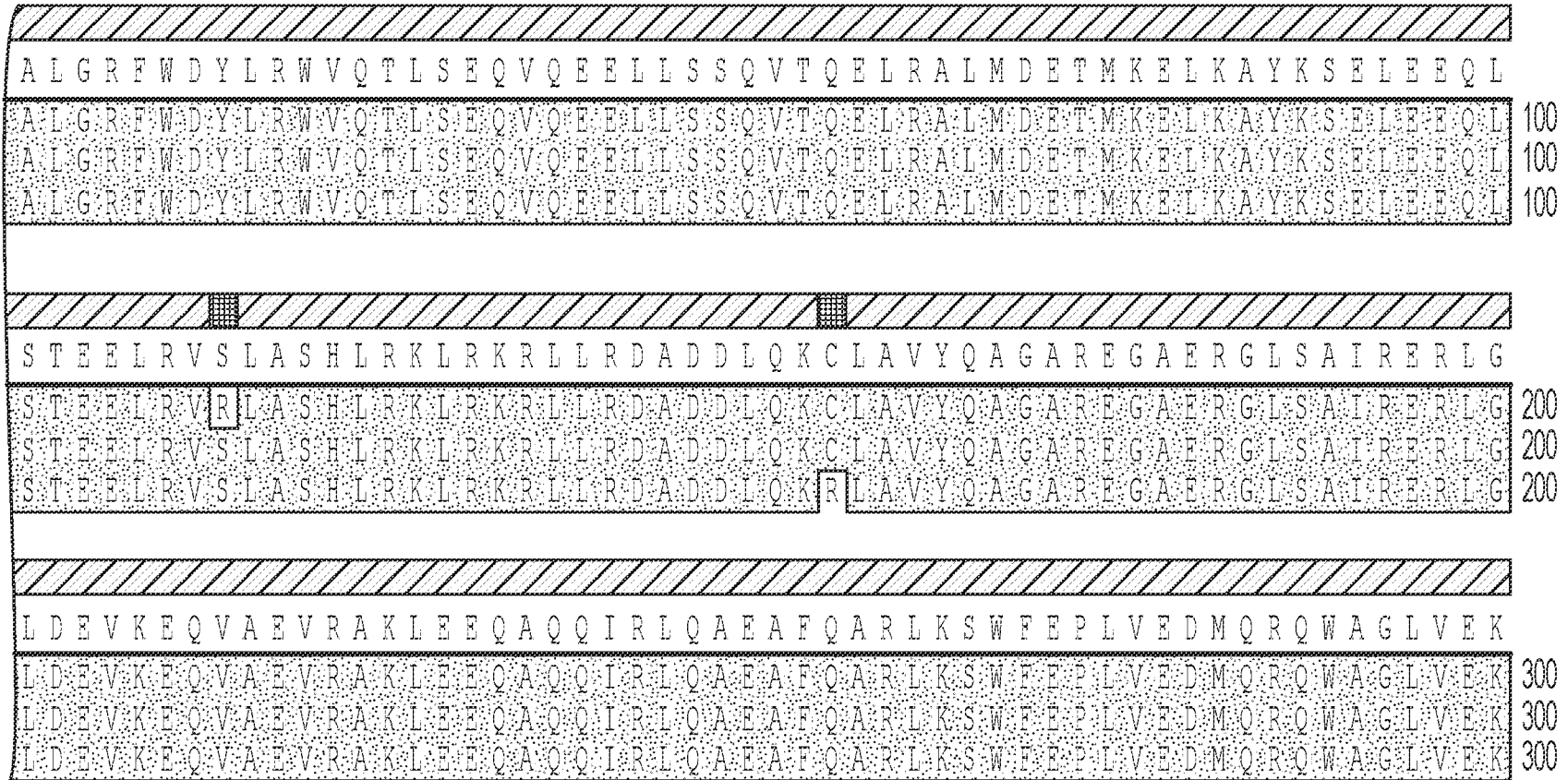
VQAAVGTSAAPVPSDNH

V:Q:A:A:V:G:T:S:A:A:P:V:P:S:D:N:H 317

V:Q:A:A:V:G:T:S:A:A:P:V:P:S:D:N:H 317

V:Q:A:A:V:G:T:S:A:A:P:V:P:S:D:N:H 317

Фиг. 2



Фиг. 2 (продолжение)