

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046909**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.08

(21) Номер заявки
202192739

(22) Дата подачи заявки
2020.04.10

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

(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ

(31) **62/831,840; 62/990,246**

(32) **2019.04.10; 2020.03.16**

(33) **US**

(43) **2022.02.15**

(86) **PCT/US2020/027788**

(87) **WO 2020/210713 2020.10.15**

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

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

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A1-2014071282**

WO-A1-2016179497

WO-A2-2012027558

AGNIESZKA CIESIELSKA ET AL.:
"Cerebral Infusion of AAV9 Vector-encoding Non-self Proteins Can Elicit Cell-mediated Immune Responses", **MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY**, vol. 21, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 158-166, XP055700835, US, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2012.167, page 158 - page 166

LLUIS SAMARANCH ET AL.: "AAV9-mediated Expression of a Non-self Protein in Nonhuman Primate Central Nervous System Triggers Widespread Neuroinflammation Driven by Antigen-presenting Cell Transduction", **MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY**, vol. 22, no. 2, 1 February 2014 (2014-02-01), pages 329-337, XP055701101, US, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2013.266, page 158 - page 166

Digital commons@unmc Digital commons@unmc ET AL.: "Novel therapeutic approaches for Juvenile Neuronal Ceroid Novel therapeutic approaches for Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (CLN3) Lipofuscinosis (CLN3)", Part of the Medical Neurobiology Commons, 1 January 2017 (2017-01-01), XP055694551, Retrieved from the Internet: URL:<https://digitalcommons.unmc.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1230&context=etd>, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения заболеваний, ассоциированных с aberrантной лизосомальной функцией, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Гоше. В настоящем изобретении предлагаются экспрессионные конструкции, содержащие трансген, кодирующий бета-глюкоцереброзидазу, ингибирующую РНК, нацеленную на альфа-синуклеин, или комбинацию вышеперечисленных элементов. В настоящем изобретении дополнительно предлагаются способы лечения болезни Гоше, болезни Паркинсона или других синуклеинопатий путем введения таких экспрессионных конструкций субъекту, нуждающемуся в этом.

B1**046909****046909****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/990 246, поданной 16 марта 2020 г., и предварительной заявки на патент США 62/831 840, поданной 10 апреля 2019 г.

Описание каждой из этих заявок полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Описание текстового файла, представленного в электронном виде

Содержание текстового файла, представленного в электронном виде, полностью включено в данный документ посредством ссылки: Копия Перечня последовательностей в машиночитаемом формате (имя файла: PRVL_009_02WO_SeqList.txt, Дата записи: 10 апреля 2020 г.; размер файла: ~361154 байт).

Уровень техники

Аберрантная экспрессия белков, таких как лизосомальная кислая β -глюкоцереброзидаза (G-каза) и α -синуклеин, характерна для патогенеза многих заболеваний центральной нервной системы. Болезнь Гоше представляет собой редкое врожденное нарушение метаболизма гликофинголипидов из-за дефицита G-казы. Пациенты страдают от симптомов, не связанных с ЦНС, включая гепатоспленомегалию, недостаточность функции костного мозга, приводящую к панцитопении, заболеваниям легких и фиброзу, а также дефекты костей. Кроме того, значительное число пациентов страдает неврологическими проявлениями, включая патологические саккадические движения глаз и взгляда, судороги, когнитивные нарушения, задержку развития и двигательные расстройства, включая болезнь Паркинсона.

Существует несколько терапевтических средств, направленных на лечение периферических заболеваний и основных клинических проявлений при нарушении кроветворной функции костного мозга и внутренних органов, включая заместительную ферментативную терапию, шапероноподобные низкомолекулярные препараты, которые связываются с дефектной G-казой и повышают стабильность, а также субстрат-редуцирующая терапия, которая блокирует продуцирование субстратов, накапливающихся при болезни Гоше, что приводит к появлению симптомов и патологий. Однако другие аспекты болезни Гоше не поддаются лечению.

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

Область техники

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

Резюме

В настоящем изобретении предлагается способ лечения субъекта с болезнью Гоше 2 типа или болезнью Гоше 3 типа, при этом указанный способ включает введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего (i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок глюкоцереброзидазу (G-каза), при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и (ii) капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{10} vg/г головного мозга до около 5×10^{11} vg/г головного мозга. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту в дозе около $1,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга.

В настоящем изобретении предлагается способ лечения субъекта, страдающего болезнью Паркинсона с мутацией глюкоцереброзидазы-1 (GBA1), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего: (i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и (ii) капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{13} vg до около 5×10^{14} vg. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту в дозе около 1×10^{14} vg или около 2×10^{14} vg.

В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят путем субоципитальной инъекции в большую цистерну.

В настоящем изобретении предлагается способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше 1 типа, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса

(гAAV), содержащего: (i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и (ii) капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{13} vg до около 5×10^{14} vg. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят внутривенно. В настоящем изобретении предлагается способ лечения субъекта, страдающего синуклеинопатией или паркинсонизмом, при этом указанный способ включает введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего: (i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую трансген, содержащий (a) последовательность, кодирующую белок G-казу, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и (b) последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; и (ii) капсидный белок AAV9.

В настоящем изобретении предлагается способ лечения субъекта, страдающего синуклеинопатией или паркинсонизмом, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего: (i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую трансген, содержащий последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; и капсидный белок AAV9.

В некоторых вариантах осуществления синуклеинопатия или паркинсонизм представляет собой множественную системную атрофию, болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с мутацией GBA1, болезнь с тельцами Леви, деменцию с тельцами Леви, деменцию с тельцами Леви с мутацией GBA1, прогрессирующий надъядерный паралич или кортикобазальный синдром.

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

В настоящем изобретении предлагается способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше 2 типа или болезнью Гоше 3 типа, включающий введение субъекту гAAV, содержащего:

- (i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' до 3':
 - (a) AAV2 ITR;
 - (b) энхансер CMV;
 - (c) промотор CBA;
 - (d) вставку трансгена, кодирующую белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15;
 - (e) WPRE;
 - (f) сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота; а также
 - (g) AAV2 ITR; и
 - (ii) капсидный белок AAV9;
- при этом гAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{10} vg/г головного мозга до около 5×10^{11} vg/г головного мозга.

В настоящем изобретении предлагается способ лечения субъекта, страдающего болезнью Паркинсона с мутацией GBA1, включающий введение субъекту гAAV, содержащего:

- (i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' до 3':
 - (a) AAV2 ITR;
 - (b) энхансер CMV;
 - (c) промотор CBA;
 - (d) вставку трансгена, кодирующую белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15;
 - (e) WPRE;
 - (f) сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота; а также
 - (g) AAV2 ITR; и
 - (ii) капсидный белок AAV9;
- при этом гAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{13} vg до около 5×10^{14} vg.

В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят путем субокципитальной инъекции в большую

цистерну. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят в составе, содержащем около 20 мМ Трис, pH 8,0, около 1 мМ MgCl₂, около 200 мМ NaCl и около 0,001% полоксамера 188.

В настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая:

(i) гAAV, содержащий:

(a) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; а также

(b) капсидный белок AAV9; и

(ii) около 20 мМ Трис, pH 8,0,

(iii) около 1 мМ MgCl₂,

(iv) около 200 мМ NaCl, и

(v) около 0.001% мас./об. полоксамера 188. В настоящем изобретении предлагается гAAV, содержащий:

(a) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(b) капсидный белок AAV9,

для применения в способе лечения болезни Гоше 1 типа, болезни Гоше 2 типа, болезни Гоше 3 типа или болезни Паркинсона с мутацией GBA1 у субъекта.

В настоящем изобретении предлагается гAAV, содержащий:

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

(a) последовательность, кодирующую белок G-казу, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; а также

(b) последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; а также

(ii) капсидный белок AAV9,

для применения в способе лечения синуклеинопатии или паркинсонизма у субъекта. В настоящем изобретении предлагается гAAV, содержащий:

(i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, содержащей последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; и

(ii) капсидный белок AAV9, для применения в способе лечения синуклеинопатии или паркинсонизма у субъекта.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть).

Фиг. 2 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть) и LIMP2 (SCARB2) или его часть. Кодирующие последовательности G-казы и LIMP2 разделены внутренним участком посадки рибосомы (IRES).

Фиг. 3 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть) и LIMP2 (SCARB2) или его часть. Каждая экспрессия кодирующих последовательностей G-казы и LIMP2 управляется отдельным промотором.

Фиг. 4 представляет собой схематическое изображение одного варианта плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть), LIMP2 (SCARB2) или его часть, а также интерферирующую РНК для α -Syn.

Фиг. 5 представляет собой схематическое изображение одного варианта плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть), просапозин (например, PSAP или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn.

Фиг. 6 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть) и просапозин (например, PSAP или его часть). Кодирующие последовательности G-казы и просапозина разделены внутренним участком посадки рибосомы (IRES).

Фиг. 7 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления вектора гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть).

В этом варианте осуществления вектор содержит промоторный элемент СВА (СВА), состоящий из

четырёх частей: энхансера CMV (CMVe), промотора CBA (CBAp), экзона 1 и интрона (int) для постоянной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности GBA1 человека. 3'-область также содержит регуляторный элемент WPRE, за которым следует bGH полиА хвост. На 5' конце промоторной области включены три сайта активации транскрипции: TATA, RBS и YY1. Фланкирующие ITR позволяют правильно упаковывать вставочные последовательности. Оценивали два варианта 5' ITR-последовательности (вставка); они имеют несколько нуклеотидных различий в 20-нуклеотидной области "D" ITR AAV2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вектор gAAV содержит нуклеотидную последовательность домена "D", приведенную в верхней строке. В некоторых вариантах осуществления вектор gAAV содержит мутантный домен "D" (например, домен "S", изменения нуклеотидов приведены в нижней строке).

Фиг. 8 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов осуществления плазмиды, кодирующей вектор gAAV, продемонстрированный на фиг. 7.

На фиг. 9A-фиг. 9F продемонстрированы репрезентативные данные относительно валидации мышинной модели СВЕ. Выживаемость (фиг. 9A) проверяли 2 раза в день, а вес (фиг. 9B) регистрировали ежедневно и анализировали в P27 (фиг. 9C). Все группы начинали с n=8. Поведение оценивали по времени удерживания на вращающемся барабане (фиг. 9D) в P24 и по общему пройденному расстоянию в открытом поле (фиг. 9F). Из-за ранней летальности количество животных в каждой группе разное: n=8 для PBS и 25 мг/кг СВЕ, n=4 для СВЕ 37,5 мг/кг. Группу, получавшую 50 мг/кг СВЕ, не оценивали на вращающемся барабане из-за абсолютно полной летальности в P24. Статистические результаты представлены для сравнения с группой PBS с применением анализа ANOVA с последующим HSD-критерием Тьюки. Уровни субстратов G-казы анализировали в коре головного мозга мышей в группах лечения PBS и 25 мг/кг СВЕ. Совокупные уровни GluSph и GalSph (фиг. 9E) приведены в пмоль на мг веса ткани. Статистические результаты представлены с использованием t-критерия Стьюдента. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM). * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Фиг. 10 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов осуществления дизайна исследования максимальной дозы gAAV, кодирующего G-казу, в мышинной модели СВЕ. 4 мкл PR001B или dPBS вводили путем ICV-инъекции в P3, и ежедневное введение СВЕ в дозе 25 мг/кг начинали в P8. Поведение оценивали в тесте на вращающемся барабане в P24. Половину животных умерщвляли в P36, через 1 день после их последней дозы СВЕ в P35, в то время как оставшуюся половину умерщвляли в P38, через 3 дня после их последней дозы СВЕ в P35. "vg" означает "геномы вектора".

Фиг. 11A-фиг. 11D демонстрируют репрезентативные данные относительно оценки максимальной дозы PR001B gAAV при жизни в мышинной модели СВЕ. В P3, мышам вводили либо вспомогательное вещество, либо 8,8e9 vg gAAV посредством ICV-введения. Ежедневную IP доставку PBS или 25 мг/кг СВЕ начинали в P8. В конце исследования половину мышей умерщвляли через день после получения ими последней дозы СВЕ в P36 (день 1), в то время как для оставшейся половины отменяли СВЕ в течение 3 дней перед умерщвлением в P38 (День 3). Все группы лечения (вспомогательное вещество+PBS n=8, gAAV+PBS n=7, вспомогательное вещество+СВЕ n=8 и gAAV+СВЕ n=9) взвешивали ежедневно (фиг. 11 A) и анализировали вес в P33 (фиг. 11B). Поведение оценивали по общему пройденному расстоянию в открытом поле в P23 (фиг. 11D) и по периоду времени до падения из вращающегося барабана в P24 (фиг. 11C), что оценивалось для каждого животного как медианное значение за 3 испытания. Учитывая летальность, n=7 для группы "вспомогательное вещество+СВЕ" для анализов поведения, и n=8 для всех остальных групп. Представлены средние значения по животным. Планки погрешностей представляют собой SEM. *p<0,05; ***p<0,001, номинальные p-значения для групп лечения методом линейной регрессии у животных, получавших СВЕ.

Фиг. 12A, фиг. 12B демонстрируют репрезентативные данные относительно биохимической оценки максимальной дозы PR001B gAAV в мышинной модели СВЕ. Кору головного мозга мышей всех групп лечения использовали для измерения геномов вектора (фиг. 12A) и активности G-казы (фиг. 12B). Биораспределение представлено в виде геномов вектора на 1 мкг геномной ДНК (гДНК). Пунктирная линия (100 геномов вектора/мкг гДНК) представляет порог определения положительного наличия вектора. Ферментативную активность оценивали путем измерения скорости продукции глюкозы по уровню G-казы с применением Amplex Red (Invitrogen; # A22189), а затем конвертировали в эффективный уровень активности G-казы с помощью референсной стандартной кривой рекомбинантной G-казы. Одна единица была определена как активность 1 нг/мл рекомбинантной очищенной G-казы, нормированная на мг общего белка, n=6-9 на группу. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. *P<0,05, номинальные P-значения для групп лечения у животных, получавших СВЕ, с поправками на дни сбора и пол в качестве коварианта.

Фиг. 12C, фиг. 12D демонстрируют репрезентативные данные относительно гликолипидного анализа максимальной дозы PR001B gAAV в мышинной модели СВЕ. Кору головного мозга всех групп лечения (PBS+dPBS [левые столбцы на каждом графике] n=4, СВЕ+dPBS [центральные столбцы на каждом графике] n=6 и СВЕ+PR001B [правые столбцы на каждом графике] n=9) использовали для измерения уровней GluSph (фиг. 12C) и уровней GluCer (фиг. 12D) в группах до (день 1) или после (день 3) отмены СВЕ.

Уровни GluSph и GluCer приведены в пмоль на нмоль фосфата. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$, номинальные P -значения для групп лечения у животных, получавших СВЕ, с поправками на дни сбора и пол в качестве ковариант.

Фиг. 13 демонстрирует репрезентативные данные относительно поведенческих и биохимических корреляций в модели мышей СВЕ после введения для следующих групп: вспомогательное вещество+PBS, вспомогательное вещество+СВЕ и PR001В гAAV+СВЕ. Во всех группах лечения способность удерживаться на вращающемся барабане отрицательно коррелировала с накоплением GluCer (А, $p = 0,0012$ по методу линейной регрессии), а накопление GluSph отрицательно коррелировало с увеличением активности G-казы (В, $p = 0,0086$ по методу линейной регрессии).

Фиг. 14 демонстрирует репрезентативные данные относительно биораспределения PR001В гAAV в мышинной модели СВЕ. Присутствие генома вектора количественно оценивали с помощью количественной PCR с помощью эталонной стандартной кривой вектора; концентрацию геномной ДНК оценивали путем измерения оптической плотности A260. Пунктирная линия (100 геномов вектора/мкг г ДНК) представляет порог определения положительного наличия вектора. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. $n = 7-9$ на группу.

Фиг. 15А представляет собой схематическое изображение одного из вариантов дизайна исследования для определения диапазона доз гAAV, кодирующего G-казу, в мышинной модели СВЕ. PR001А вводили путем ICV-инъекции в P3, а ежедневное введение 25 мг/кг СВЕ начинали в P8. Поведение оценивали в тестах открытого поля и способности удерживаться на вращающемся барабане в P21-P22, а также в тесте на сужающейся балке в P28. Животных умерщвляли в P38-P40, через 1 день после получения ими последней дозы СВЕ. Кортикальный слой анализировали на уровни субстратов GluSph и GluCer и активность G-казы. В каждой группе лечения было 10 мышей (5 самцов, 5 самок).

Фиг. 15В-фиг. 15Е демонстрируют репрезентативные данные относительно оценки диапазона дозы PR001 гAAV при жизни в мышинной модели СВЕ. Мыши получали вспомогательное вещество или 1 из 3 различных доз PR001А путем ICV-введения в 4 мкл в P3: низкая доза (средний столбец), средняя доза (второй справа столбец) или высокая доза (крайний правый столбец). В P8 начали ежедневное IP-введение в дозе 25 мг/кг СВЕ. Мыши, которые получали вспомогательное вещество и СВЕ (второй слева столбец) или вспомогательное вещество и PBS (крайний левый столбец), служили в качестве контроля. Все группы лечения начинали с $n = 10$ (5М/5F) на группу. Всех мышей умерщвляли через 1 день после введения последней дозы СВЕ (P38-P40). Все группы лечения взвешивали ежедневно (фиг. 15В), и их вес анализировали в P37 (фиг. 15С). Двигательную активность оценивали по периоду времени до падения из вращающегося барабана в P24 (фиг. 15D) и по периоду времени до разворота на сужающейся балке в P30 (фиг. 15Е). Из-за ранней летальности количество мышей, участвовавших в поведенческих анализах, составляло: вспомогательное вещество+PBS (крайний левый столбец) $n = 10$; вспомогательное вещество+СВЕ (второй слева столбец) $n = 9$; низкая доза PR001А+СВЕ (средний столбец) $n = 6$; средняя доза PR001А+СВЕ (второй справа столбец) $n = 10$; высокая доза PR001А+СВЕ (крайний правый столбец) $n = 7$. Представлены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$ для номинальных p -значений для групп лечения, получавших СВЕ, с поправкой на пол в качестве коварианта.

Фиг. 16А демонстрирует репрезентативные данные относительно биораспределения в исследовании PR001А с применением модели СВЕ с диапазоном доз. Мыши получали вспомогательное вещество или 1 из 3 различных доз PR001А путем ICV-введения в P3: низкая доза (средний столбец), средняя доза (второй справа столбец) или высокая доза (крайний правый столбец). В P8 начали ежедневное IP-введение в дозе 25 мг/кг СВЕ. Мыши, которые получали вспомогательное вещество и СВЕ (второй слева столбец) или вспомогательное вещество и PBS (крайний левый столбец), служили в качестве контроля. Всех мышей умерщвляли в P38-P40, через 1 день после введения последней дозы СВЕ. Наличие геномов вектора оценивали в каждой ткани и во всех группах лечения, как продемонстрировано в виде числа копий вектора на 1 мкг геномной ДНК. Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонную стандартную кривую вектора; $n = 10, 9, 6, 10, 7$ на группу соответственно. Пунктирные линии представляют порог обнаружения положительного наличия вектора. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM.

Фиг. 16В демонстрирует репрезентативные данные относительно ферментативной активности G-казы в исследовании PR001А с применением модели СВЕ с диапазоном доз. Эффективная ферментативная активность G-казы продемонстрирована для каждой ткани и всех групп лечения. Активность приведена в единицах на мг общего белка с одной единицей, определяемой как активность 1 нг/мл рекомбинантной очищенной G-казы. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. Статистические результаты представлены для сравнения с группами вспомогательное вещество+СВЕ (второй слева столбец). $n = 10, 9, 6, 10, 7$ на группу соответственно. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 16С-фиг. 16D демонстрируют репрезентативные данные относительно анализа гликолипидов в исследовании PR001А с применением модели СВЕ с диапазоном доз. Уровни GluSph (фиг. 16С) и GluCer

(фиг. 16D) приведены в пмоль на нмоль фосфата. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. ** P<0,01; *** P<0,001 с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 16Е демонстрирует репрезентативные данные относительно анализа окрашивания гематоксилином и эозином в исследовании PR001А с применением модели СВЕ с диапазоном доз. Ткань головного мозга обрабатывали для окрашивания гематоксилином и эозином (H&E), а срезы тканей оценивали на предмет патологических изменений. Приведен процент животных с положительным результатом на наличие цереброкортикальных глиальных рубцов, являющихся признаком нейровоспаления. Введение СВЕ привело к значительному увеличению глиальных рубцов по сравнению с контрольной группой, получавшей вспомогательное вещество. PR001А значительно уменьшал вызванное СВЕ глиальное рубцевание дозозависимым образом. Статистические результаты представлены для сравнения с группами СВЕ+вспомогательное вещество (левый столбец). n=10, 9,6, 10,7 на группу соответственно. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 для точного критерия Фишера.

Фиг. 16F демонстрирует репрезентативные данные относительно цереброкортикального иммуногистохимического анализа в исследовании PR001А с применением модели СВЕ с диапазоном доз. На графике представлены средние значения иммунореактивной площади, измеренной в коре головного мозга (n=5-10 на группу). Иммунореактивная площадь Ibal (ионизирующая кальций-связывающая адаптерная молекула 1) была значительно больше у животных, получавших СВЕ+вспомогательное вещество (второй слева столбец), чем у мышей всех других исследованных групп. Приведены средние значения, а планки погрешностей представляют собой SEM. Данные анализировали с помощью однофакторного анализа ANOVA и апостериорного критерия Сидака для множественных сравнений. **: P<0,01; ***: P<0,001.

Фиг. 17 демонстрирует репрезентативные данные относительно анализа поведения на сужающейся балке при максимальной дозе GBA1 гAAV на генетической мышшиной модели. Двигательную активность групп лечения (WT+вспомогательное вещество, n=5), 4L/PS-NA+вспомогательное вещество (n=6) и 4L/PS-NA+rAAV (n=5)) оценивали с помощью теста ходьбы по балке через 4 недели после введения гAAV.

Суммарные количества соскальзываний и активное время приведены как общее количество за 5 испытаний на разных балках. Скорость и соскальзывание на скорость приведены как среднее значение за 5 испытаний на разных балках. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM.

Фиг. 18 демонстрирует репрезентативные данные относительно экспрессии *in vitro* конструкций гAAV, кодирующих GBA1 в комбинации с просапозином (PSAP), SCARB2, и/или одной или большим количеством ингибирующих нуклеиновых кислот. Данные указывают на то, что трансфекция клеток НЕК293 каждой из конструкций приводила к сверхэкспрессии представляющих интерес трансгенов по сравнению с GFP-трансфицированными клетками.

Фиг. 19 представляет собой схему, изображающую векторы гAAV, содержащие область "D", расположенную "с наружной стороны" ITR (например, проксимальнее конца ITR относительно вставки трансгена или экспрессионной конструкции) (вверху) и векторы гAAV дикого типа, имеющие ITR на "с внутренней стороны" вектора (например, проксимальнее вставки трансгена в вектор).

Фиг. 20 демонстрирует данные относительно трансдукции клеток НЕК293 с применением гAAV, имеющих ITR с диким (кружки) или альтернативным (например, "с наружной стороны"; квадраты) размещением последовательности "D". гAAV, имеющие ITR, размещенные "с наружной стороны", были способны трансдуцировать клетки так же эффективно, как и гAAV, имеющие ITR дикого типа.

Фиг. 21 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть).

Фиг. 22 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть).

Фиг. 23 представляет собой схематическое изображение одного варианта плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессивную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn.

Фиг. 24 представляет собой схематическое изображение одного варианта плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессивную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn.

Фиг. 25 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую просапозин (например, PSAP или его часть).

Фиг. 26 представляет собой схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей вектор гAAV, который включает экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть).

Фиг. 27 представляет собой схематическое изображение одного варианта плазмиды, содержащей

вектор gAAV, который включает экспрессивную конструкцию, кодирующую G-казу (например, GBA1 или ее часть), просапозин (например, PSAP или его часть), а также интерферирующую РНК для α -Syn.

На фиг. 28 приведены репрезентативные данные, демонстрирующие, что введение вектора gAAV, кодирующего G-зу, снижает глиальное рубцевание *in vivo*. Ткани обрабатывали для окрашивания гематоксилином и эозином (H&E), а предметные стекла оценивали на предмет патологических изменений. Процент животных, положительных по наличию глиальных рубцов, что является подтверждением реактивного астроглиоза, в каждой группе показан светлым затемнением, а процент животных, отрицательных по наличию глиальных рубцов - черным. Применение СВЕ привело к значительному увеличению глиальных рубцов по сравнению с контрольной группой, получавшей вспомогательное вещество. gAAV-GBA1 значительно уменьшал вызванное СВЕ глиальное рубцевание дозозависимым образом. Статистические результаты представлены для сравнения с группами вспомогательное вещество+СВЕ (красный). n=10, 9, 6, 10, 7 на группу соответственно. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 для точного критерия Фишера.

Фиг. 29А, фиг. 29В демонстрируют репрезентативные данные относительно средних показателей иммунофлуоресцентного сигнала, измеренных в коре головного мозга (n=6-10 на группу) мышей, которым вводили gAAV-GBA1 или вспомогательное вещество. Количественная оценка иммуномечения G-казы (фиг. 19А) выявила наиболее сильное иммунофлуоресцентное мечение у животных, получавших высокие дозы gAAV-GBA1, за которыми следовали животные, получавшие средние и низкие дозы gAAV-GBA1. Иммунореактивная площадь Iba1 (фиг. 29В) была значительно больше у животных, получавших СВЕ /вспомогательное вещество, чем у мышей всех других исследованных групп. Данные анализировали с помощью однофакторного анализа ANOVA и апостериорного критерия множественного сравнения Сидака. Гистограммы представляют средние значения группы+SEM.

Фиг. 30 представляет собой гистограмму, демонстрирующую репрезентативные данные относительно биораспределения трансгена PR001A в исследовании PRV-2018-016 в день 183. Это исследование описано в Примере 12 Уровни трансгенов анализировали с помощью методик qPCR в организмах NHP (приматы, не относящиеся к человеку) через 183 дня после инъекции в большую цистерну (ICM) либо вспомогательного вещества, либо низкой дозы PR001A ($6,2 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), либо высокой дозы PR001A ($2,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга). Каждый столбец представляет собой среднее значение \pm SEM для 3 животных в группе; значения, которые были ниже предела количественного определения, были отмечены как нулевые. Поскольку значения qPCR для животных, получавших вспомогательное вещество, были равны нулю для каждой области, столбцы для вспомогательного вещества не показаны на графике с этой шкалой.

Фиг. 31А, фиг. 31В представляют собой графики, демонстрирующие репрезентативные данные относительно экспрессии G-казы человека в День 183 в исследовании PRV-2018-016. Это исследование описано в Примере 12. Уровни экспрессии G-казы определяли с помощью анализа Simple Western™ (Jess) в образцах коры, гиппокампа и среднего мозга NHP (приматов, не относящихся к человеку), которые были собраны в День 183 день. Приведены уровни экспрессии G-казы от NHP, получавших вспомогательное вещество (слева на каждой панели), низкую дозу PR001A ($6,2 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга; в центре на каждой панели) или высокую дозу PR001A ($2,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга; справа на каждой панели). Фиг. 31А представляет данные для отдельных областей коры, гиппокампа и среднего мозга. Фиг. 31В представляет процентное изменение для группы, получавшей вспомогательное вещество (слева), группы с низкой дозой (в центре) и группы с высокой дозой (справа). Данные для этого графика были нормализованы по среднему значению в пределах ткани и объединены для коры головного мозга, гиппокампа и среднего мозга. Каждый столбец представляет собой процент от медианы группы вспомогательного вещества для каждой дозы средних нормированных данных. Для расчета значимости был проведен однофакторный анализ ANOVA для оценки значимости для группы комбинированного лечения, которая включала животных, получавших как низкие, так и высокие дозы, по сравнению с группой вспомогательного вещества. P значение=0,014 (*<0,05).

Фиг. 32 представляет собой серию графиков, демонстрирующих репрезентативные данные относительно биораспределения трансгена PR001A, количественно определенному с помощью qPCR в исследовании PRV-2019-005. Это исследование описано в Примере 12 Уровни трансгенов анализировали с помощью методик qPCR в организмах NHP (приматы, не относящиеся к человеку) через 30 и 90 дней после инъекции в большую цистерну (ICM) либо вспомогательного вещества, либо PR001A ($7,0 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга). Каждый график представляет каждое отдельное животное (n=3/группа) со средним значением \pm SEM.

Фиг. 33 представляет собой линейный график, демонстрирующий репрезентативные данные относительно активности G-казы после трансдукции *in vitro* клеток НЕК293Т с применением PR001A. Клетки НЕК293Т, трансдуцированные PR001A при различной множественности инфицирования (MOI), анализировали на активность G-казы. Активность измеряли по гидролизу про флуоресцентного субстрата резорурфина Р-D-глюкопиранозида. Флуоресценцию расщепленного субстрата определяли с помощью считывающего устройства для планшетов при возбуждении 573 нм и испускании 610 нм. Значения представляют собой средние значения \pm SEM, n=2; единица эквивалентна активности 1 нг/мл рекомбинант-

ной очищенной G-казы.

Фиг. 34А, фиг. 34В представляют собой гистограммы, демонстрирующие репрезентативные данные относительно активности G-казы (фиг. 34А) и уровней α -синуклеина (фиг. 34В) после трансдукции *in vitro* клеток HeLa с применением PR001А. Клетки HeLa, обработанные вспомогательным веществом (левый столбец) или трансдуцированные 2×10^5 vg/клетку PR001А (центральный столбец) или 2×10^6 vg/клетку PR001А (правый столбец), собирали через 72 часа после обработки и анализировали на уровни активности G-казы (фиг. 34А) с помощью флуорометрического ферментного анализа или на уровни α -синуклеина (фиг. 34В) с помощью ИФА. Эффективная ферментативная активность G-казы приведена в единицах на мг общего белка с одной единицей, определяемой как активность 1 нг/мл рекомбинантной очищенной G-казы. Концентрация α -синуклеина представлена в нг/мл на мг общего белка. Исследования проводили в трех биологических повторностях. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. Однофакторный анализ ANOVA с последующим критерием множественного сравнения Даннета.

Фиг. 35А, фиг. 35В представляют собой гистограммы, демонстрирующие репрезентативные данные относительно активности G-казы (фиг. 35А) и уровней α -синуклеина (фиг. 35В) после трансдукции *in vitro* нейронов гиппокампа мыши с применением PR001А. Первичные культуры нейронов гиппокампа мыши обрабатывали вспомогательным веществом (левый столбец) или трансдуцированные $1,3 \times 10^5$ vg/клетку PR001А (центральный столбец) или $1,3 \times 10^6$ vg/клетку PR001А (правый столбец) в День 2 *in vitro* (DIV). В DIV9 клетки собирали и анализировали на уровни активности G-казы (фиг. 35А) с помощью флуорометрического ферментного анализа или на уровни α -синуклеина (фиг. 35В) с помощью ИФА. Активность G-казы приведена в виде относительных флуоресцентных единиц (RFU) в час на мг общего белка. Концентрация α -синуклеина представлена в нг/мл на мг общего белка. Исследования проводили в двух биологических повторностях. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. Однофакторный анализ ANOVA с последующим критерием множественного сравнения Даннета.

Фиг. 36 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов дизайна исследования с длительным применением gAAV, кодирующего G-казу, в мышинной модели СВЕ. PR001А вводили путем ICV-инъекции в Р3, а ежедневное введение СВЕ начинали в Р8. Поведение оценивали в тесте на вращающемся барабане на Неделях 3, 6 и 15, а также в тесте на сужающейся балке на Неделях 4, 7, 13. Животных умерщвляли приблизительно на Неделе 26, через 1 день после введения последней дозы СВЕ. Кортикальный слой головного мозга анализировали на уровни субстратов GluSph и GluCer и активность G-казы. В каждой экспериментальной группе было 10-11 животных, каждая из которых включала самцов и самок мышей.

Фиг. 37А-фиг. 37D демонстрируют репрезентативные данные относительно оценки длительного применения PR001А в модели СВЕ. Кору головного мозга от мышей всех групп лечения (PBS+вспомогательное вещество: левый столбец, СВЕ+вспомогательное вещество: центральный столбец, СВЕ+ $2,0 \times 10^{10}$ vg PR001А: правый столбец) использовали для измерения геномов вектора (фиг. 37А), активности G-казы (фиг. 37В), уровней GluSph (фиг. 37С) и уровней GluCer (фиг. 37D). Наличие геномов вектора оценивали в каждой ткани и во всех группах лечения, как продемонстрировано в виде числа копий вектора на 1 мкг геномной ДНК. Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонную стандартную кривую вектора. Эффективная ферментативная активность G-казы приведена в единицах на мг общего белка с одной единицей, определяемой как активность 1 нг/мл рекомбинантной очищенной G-казы. Уровни GluSph и GluCer приведены как пмоль на нмоль фосфата. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. $n=10, 11, 10$ на группу соответственно. (*) $P < 0,1$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 38А-фиг. 38Е демонстрируют репрезентативные данные относительно оценки при жизни дополнительного диапазона доз PR001А в модели СВЕ. Мышей всех групп лечения взвешивали ежедневно (фиг. 38А), и их вес анализировали в Р45 (фиг. 38В). Двигательные характеристики оценивали по периоду времени удерживания на вращающемся барабане на Неделе 3 (фиг. 38С) и на Неделе 5 (фиг. 38D), а также по периоду времени до разворота на сужающейся балке (фиг. 38Е) на Неделе 4. $n=8-11$ на группу. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. Статистические результаты представлены для сравнения с группой СВЕ+вспомогательное вещество (второй столбец слева). *** $P < 0,001$ с помощью анализа ANOVA с последующим критерием Тьюки HSD.

Фиг. 39 демонстрирует репрезентативные данные относительно биораспределения в дополнительном исследовании с применением модели СВЕ с диапазоном доз. Наличие геномов вектора оценивали в каждой ткани и во всех группах лечения, как продемонстрировано в виде числа копий вектора на 1 мкг гДНК. Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонную стандартную кривую вектора; $n=9-11$ на группу. Черная пунктирная линия (100 геномов вектора/мкг гДНК) представляет порог определения положительного наличия вектора. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM.

Фиг. 40 демонстрирует репрезентативные данные относительно ферментативной активности G-казы в дополнительном исследовании с применением модели СВЕ с диапазоном доз. Эффективную ферментативную активность G-казы измеряли и демонстрировали для коры головного мозга всех групп лечения. Активность приведена в единицах на мг общего белка с одной единицей, определяемой как активность 1 нг/мл рекомбинантной очищенной G-казы. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. Статистические результаты представлены для сравнения с группой СВЕ+вспомогательное вещество (второй столбец слева), n=9-11 на группу. (*P<0,1 с помощью анализа ANOVA с последующим критерием Тьюки HSD.

Фиг. 41А, фиг. 41В демонстрируют репрезентативные данные относительно анализа гликолипидов в дополнительном исследовании с применением модели СВЕ с диапазоном доз. Уровни GluSph (фиг. 41А) и GluCer (фиг. 41В) приведены в пмоль на нмоль фосфата. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. Статистические результаты представлены для сравнения с группой СВЕ+вспомогательное вещество (второй столбец слева), n=9-11 на группу. ***P<0,01; ****p<0,001, с помощью анализа ANOVA с последующим критерием Тьюки HSD.

Фиг. 42А - фиг. 42D демонстрируют репрезентативные данные относительно оценки при жизни дополнительного диапазона доз PR001А в модели СВЕ. Мышей всех групп лечения взвешивали ежедневно (фиг. 42А), и их вес анализировали в P37 (фиг. 42В). Двигательные характеристики оценивали по периоду времени удерживания на вращающемся барабане на Неделе 3 (фиг. 42С), а также по периоду времени до разворота на сужающейся балке (фиг. 42D) на Неделе 4. n=9-10 на группу. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. Статистические результаты представлены для сравнения с группой СВЕ+вспомогательное вещество (второй столбец слева). *** P<0,001 с помощью анализа ANOVA с последующим критерием Тьюки HSD.

Фиг. 43А, фиг. 43В демонстрируют репрезентативные данные относительно биораспределения и ферментативной активности G-казы в дополнительном исследовании с диапазоном доз PR001А в модели СВЕ. Геномы вектора измеряли в коре головного мозга (фиг. 43А) во всех группах лечения и демонстрировали как число копий вектора на 1 мкг геномной ДНК (гДНК). Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонную стандартную кривую вектора. Черная пунктирная линия представляет порог обнаружения положительного наличия вектора (при 100 геномах вектора/мкг гДНК). Эффективную ферментативную активность G-казы измеряли в коре головного мозга (фиг. 43В) и демонстрировали в единицах на мг общего белка с одной единицей, определяемой как активность 1 нг/мл рекомбинантной очищенной G-казы. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. n=9-10 на группу. *** P<0,001; с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 44А, фиг. 44В демонстрируют репрезентативные данные относительно анализа гликолипидов дополнительного диапазона доз PR001А в модели СВЕ. Уровни GluSph (фиг. 44А) и GluCer (фиг. 44В) приведены в пмоль на нмоль фосфата. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. Статистические результаты представлены для сравнения с группой СВЕ+вспомогательное вещество (второй столбец слева), n=9-10 на группу. ***P<0,001 с помощью анализа ANOVA с последующим критерием Тьюки HSD.

Фиг. 45 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов дизайна исследования с применением gAAV, кодирующего G-казу, в генетической мышинной модели 4L/PS-NA. PR001А вводили с помощью ICV-инъекции мышам 4L/PS-NA в возрасте 3-4 недель. Поведение на сужающейся балке анализировали на Неделях 8, 12 и 18 жизни (5, 9 и 15 недель после ICV-введения), а поведение на вращающемся барабане анализировали на Неделях 12 и 18 жизни (9 и 15 недель после ICV-введения). Мышей умерщвляли на Неделе 18. Кору головного мозга анализировали на ферментативную активность G-казы, а мозжечок анализировали на уровни субстратов GluSph и GluCer. В каждой экспериментальной группе было 3 самца и 3 самки.

Фиг. 46 демонстрирует репрезентативные данные относительно биораспределение в максимальной дозе PR001А в генетической модели мышей 4L/PS-NA. Наличие геномов вектора оценивали в каждой ткани и во всех группах лечения, как продемонстрировано в виде числа копий вектора на 1 мкг геномной ДНК (гДНК). Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонную стандартную кривую вектора. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. n=4-5 на группу. Пунктирные линии представляют порог обнаружения положительного наличия вектора (при 100 геномах вектора/мкг г ДНК).

Фиг. 47 демонстрирует репрезентативные данные относительно ферментативной активности G-казы в максимальной дозе PR001А в генетической модели мышей 4L/PS-NA. Эффективную ферментативную активность G-казы измеряли и демонстрировали для каждой ткани и всех групп лечения. Активность приведена в единицах на мг общего белка с одной единицей, определяемой как активность 1 нг/мл рекомбинантной очищенной G-казы. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют SEM. n=4-5 на группу. *: P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 48А, фиг. 48В демонстрируют репрезентативные данные гликолипидного анализа PR001А в

генетической модели мыши 4L/PS-NA. Мыши 4L/PS-NA получали вспомогательное вещество (центральный столбец) или $1,5 \pm 10^{10}$ vg PR001A (правый столбец), и контрольные мыши получали вспомогательное вещество (правый столбец) путем ICV-введения в постнатальный День P23. В мозжечке измеряли уровни GluSph (фиг. 48A) и GluCer (фиг. 48B). Уровни приведены в пмоль на нмоль фосфата. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. $n=4, 5, 5$ на группу, соответственно. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 49А, фиг. 49В демонстрируют репрезентативные данные относительно биохимической оценки накопления α -синуклеина в коре головного мозга в генетической модели мыши 4L/PS-NA. Мыши 4L/PS-NA получали вспомогательное вещество путем ICV-введения (центральный столбец) или $1,5 \times 10^{10}$ vg PR001A (правый столбец), и контрольные мыши получали вспомогательное вещество (правый столбец) путем ICV-введения в постнатальный День 23. Фракции лизатов головного мозга из коры головного мозга, растворимые в Triton X и не растворимые в Triton X, анализировали на уровни α -синуклеина с помощью специального иммуносорбентного анализа. Продемонстрированы нерастворимый альфа-синуклеин (фиг. 49А) и отношение нерастворимого альфа-синуклеина к растворимому (фиг. 49В). Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. $n=3-5$ на группу. (*): $P<0,20$, с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 50 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов дизайна исследования с диапазоном доз PR001A гAAV в генетической модели мыши 4L/PS-NA. PR001A вводили с помощью ICV-инъекции мышам 4L/PS-NA в возрасте 3-4 недель. Поведение на сужающейся балке анализировали на Неделях 8, 12 и 18 жизни (5, 9 и 15 недель после ICV-введения), а поведение на вращающемся барабане анализировали на Неделях 12 и 18 жизни (9 и 15 недель после ICV-введения). Мышей умерщвляли на Неделе 18. Кору головного мозга анализировали на ферментативную активность G-казы, а мозжечок анализировали на уровни субстратов GluSph и GluCer. В каждой группе лечения было 10-11 мышей.

Фиг. 51 демонстрирует репрезентативные данные относительно поведенческих анализов на Неделе 18 для диапазона доз PR001A в генетической модели мышей 4L/PS-NA. Оценивали двигательные характеристики на сужающейся балке, при этом средний показатель из общего количества соскальзываний относительно скорости продемонстрирован в двух испытаниях на разных балках. $n=10, 6, 5, 7, 4, 8$ для группы, соответственно. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. *: $P<0,05$; ***: $P<0,001$ с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 52А, фиг. 52В демонстрируют репрезентативные данные относительно биораспределения и ферментативной активности G-казы в исследовании с диапазоном доз PR001A в генетической модели мышей 4L/PS-NA. Геномы вектора измеряли в коре головного мозга (фиг. 52А) во всех группах лечения и демонстрировали как число копий вектора на 1 мкг геномной ДНК (гДНК). Наличие геномов вектора количественно оценивали с помощью qPCR, применяя эталонную стандартную кривую вектора. Пунктирная линия представляет порог обнаружения положительного наличия генома вектора (при 100 геномах вектора/мкг гДНК). Эффективную ферментативную активность G-казы измеряли в коре головного мозга (фиг. 52В) и демонстрировали в единицах на мг общего белка с одной единицей, определяемой как активность 1 нг/мл рекомбинантной очищенной G-казы. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. $n=10, 10, 10, 10, 7, 8$ на группу соответственно. *** $P<0,001$ с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 53 А, фиг. 53В демонстрируют репрезентативные данные относительно анализа гликолипидов в исследовании с диапазоном доз PR001A в генетической модели мышей 4L/PS-NA. В мозжечке измеряли уровни GluSph (фиг. 53А) и GluCer (фиг. 53В). Уровни приведены в пмоль на нмоль фосфата. Приведены средние значения. Планки погрешностей представляют собой SEM. $n=10, 10, 10, 10, 7, 8$ на группу соответственно. *** $P<0,001$ с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки. (#): $P<0,1$; #: $P<0,05$ с помощью множественной линейной регрессии для генотипа и дозы для всех животных.

Фиг. 54А, фиг. 54В демонстрируют репрезентативные данные относительно биохимической оценки уровней белка α -синуклеина у трансгенных мышей, получавших СВЕ. Лизаты гиппокампа головного мозга анализировали на концентрацию α -синуклеина с помощью автоматизированной системы капиллярного вестерн-блоттинга Simple Western™ (Jess) и с применением антитела к α -синуклеину MJFR-14-6-4-2. Наблюдались множественные полосы между 48 кДа и 230 кДа, которые были сгруппированы как "высокомолекулярные" (HMW). Одна полоса присутствовала при 18 кДа, что соответствовало прогнозируемой молекулярной массе мономера α -синуклеина. Представлено среднее кратное изменение по сравнению с нормализованным средним для группы A53T+вспомогательное вещество. Планки погрешностей представляют собой SEM. $n=3-5$ на группу. *: $P<0,05$, с применением анализа ANOVA с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений HSD Тьюки.

Фиг. 55 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов осуществления плазмиды, кодирующей вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (PR001A), содержащего

экспрессивную конструкцию, кодирующую G-казу человека, "п.о." означает "пары оснований", "кан" означает "ген, который придает устойчивость к канамицину". "ORF1" означает открытую рамку считывания для G-казы. "ITR" относится к инвертированной концевой повторяющейся последовательности аденоассоциированного вируса. "TRY" относится к последовательности, содержащей три сайта регуляции транскрипции: TATA, RBS и YY1. "СВАp" относится к промотору куриного β -актина. "CMVe" относится к энхансеру цитомегаловируса. "WPRE" относится к посттранскрипционному регуляторному элементу вируса гепатита сурка. "bGH" относится к сигнальному хвосту полиА бычьего гормона роста, "int" относится к интрону. Нуклеотидные последовательности двух цепей PR001A представлены в SEQ ID NO: 39 и 40.

Фиг. 56 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов осуществления плазмиды, кодирующей вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (PR004X), содержащего экспрессивную конструкцию, кодирующую G-казу человека, и shPHK, нацеленную на α -синуклеин. "п.о." означает "пары оснований", "кан" означает "ген, который придает устойчивость к канамицину". "aSynMshPHK" относится к области, кодирующей shPHK, ингибирующую α -синуклеин. "GBACDSopt" означает открытую рамку считывания для G-казы. "ITR" относится к инвертированной концевой повторяющейся последовательности аденоассоциированного вируса. "TRY" относится к последовательности, содержащей три сайта регуляции транскрипции: TATA, RBS и YY1. "СВАp" относится к промотору куриного β -актина. "CMVe" относится к энхансеру цитомегаловируса. "WPRE" относится к посттранскрипционному регуляторному элементу вируса гепатита сурка. "bGH" относится к сигнальному хвосту полиА гормона роста крупного рогатого скота, "int" относится к интрону. Нуклеотидные последовательности (последовательность верифицирована) двух цепей PR004X представлены в SEQ ID NO: 41 и 42.

Фиг. 57 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов осуществления плазмиды, кодирующей вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (PR004Y), содержащего экспрессивную конструкцию, кодирующую G-казу человека, и shPHK, нацеленную на α -синуклеин. "п.о." означает "пары оснований", "кан" означает "ген, который придает устойчивость к канамицину". "shSNCA" относится к области, кодирующей shPHK, которая ингибирует α -синуклеин. "GBACDSopt" означает открытую рамку считывания для G-казы. "ITR" относится к инвертированной концевой повторяющейся последовательности аденоассоциированного вируса. "TRY" относится к последовательности, содержащей три сайта регуляции транскрипции: TATA, RBS и YY1. "СВАp" относится к промотору куриного β -актина. "CMVe" относится к энхансеру цитомегаловируса. "WPRE" относится к посттранскрипционному регуляторному элементу вируса гепатита сурка. "bGH" относится к сигнальному хвосту полиА гормона роста крупного рогатого скота, "int" относится к интрону. Нуклеотидные последовательности (теоретические) двух цепей PR004Y представлены в SEQ ID NO: 43 и 44.

Фиг. 58 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов осуществления плазмиды, кодирующей вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (PR014X), содержащего экспрессивную конструкцию, кодирующую shPHK, нацеленную на α -синуклеин. "п.о." означает "пары оснований", "кан" означает "ген, который придает устойчивость к канамицину". "aSyn_MshPHK" относится к области, кодирующей shPHK, которая ингибирует α -синуклеин. "ITR" относится к инвертированной концевой повторяющейся последовательности аденоассоциированного вируса. "TRY" относится к последовательности, содержащей три сайта регуляции транскрипции: TATA, RBS и YY1. "СВАp" относится к промотору куриного β -актина. "CMVe" относится к энхансеру цитомегаловируса. "WPRE" относится к посттранскрипционному регуляторному элементу вируса гепатита сурка. "bGH" относится к сигнальному хвосту полиА гормона роста крупного рогатого скота, "int" относится к интрону. Нуклеотидные последовательности (теоретические) двух цепей PR014X представлены в SEQ ID NO: 45 и 46. Нуклеотидные последовательности (теоретические) двух цепей области, кодирующей shPHK, представлены в SEQ ID NO: 47 и 48.

Фиг. 59 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов дизайна исследования с диапазоном доз PR001 gAAV в генетической модели мыши D409V Нот. PR001 вводили посредством внутривенной (в/в) инъекции мышам D409V Нот. Параметры, указанные на фигуре, были оценены через 5 недель.

Фиг. 60А-фиг. 60С демонстрируют репрезентативные данные относительно биохимии печени при внутривенном (в/в) введении PR001 в генетической модели мыши D409V Нот. Мышей умерщвляли через 5 недель после в/в инъекции. Количественно оценивали уровни цитокинов (фиг. 60А) и уровни гликолипидов (фиг. 60В; фиг. 60С). Статистические данные определяли с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета для сравнения с группой D409V Нот+вспомогательное вещество. Средние значения представлены +/- SEM (n=8-10/группу). ****: p 0,0001; ***: p<0,001; **: p<0,01; *: p<0,05; (*) p=0,10. Glu-Seg=глюкозилцерамид. GluSph=глюкозилсфингозин. WT=дикий тип.

Фиг. 61А, фиг. 61В демонстрируют репрезентативные данные относительно биохимии головного мозга при внутривенном (в/в) введении PR001 в генетической модели мыши D409V Нот. Мышей умерщвляли через 5 недель после в/в инъекции. Уровни гликолипидов определяли количественно. Статистические данные определяли с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета для сравнения с

группой D409V Hom+вспомогательное вещество. Средние значения представлены +/- SEM (n=8-10/группу). ****: $p < 0,0001$; *: $p < 0,05$. GluCer=глюкозилцерамид. GluSph=глюкозилсфингозин. WT=дикий тип.

Фиг. 62 демонстрирует репрезентативные данные относительно биохимии легкого при внутривенном (в/в) введении PR001 в генетической модели мыши D409V Hom. Мышей умерщвляли через 5 недель после в/в инъекции. Уровни цитокинов определяли количественно. Статистические данные определяли с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета для сравнения с группой D409V Hom+вспомогательное вещество. Средние значения представлены +/- SEM (n=8-10/группу). *: $p < 0,05$. WT=дикий тип.

Фиг. 63 представляет собой схематическое изображение одного из вариантов дизайна исследования с диапазоном доз PR001 gAAV в генетической модели мыши 4L/PS-NA. PR001 вводили посредством внутривенной (в/в) инъекции мышам 4L/PS-NA. Параметры, приведенные на фигуре, были оценены в указанные моменты времени.

Фиг. 64А, фиг. 64В демонстрируют репрезентативные данные относительно биохимии печени при внутривенном (в/в) введении PR001 в генетической модели мыши 4L/PS-NA. Мышей умерщвляли через 15 недель после в/в инъекции. Уровни гликолипидов определяли количественно. Статистические данные определяли с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета для сравнения с группой 4L/PS-NA+вспомогательное вещество. Средние значения представлены +/- SEM (n=10/группу). ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$. GluCer= глюкозилцерамид. GluSph=глюкозилсфингозин.

Фиг. 65А, фиг. 65В демонстрируют репрезентативные данные относительно биохимии головного мозга при внутривенном (в/в) введении PR001 в генетической модели мыши 4L/PS-NA. Мышей умерщвляли через 15 недель после в/в инъекции. Уровни гликолипидов определяли количественно. Статистические данные определяли с помощью ANOVA с последующим критерием Даннета для сравнения с группой 4L/PS-NA+вспомогательное вещество. Средние значения представлены +/- SEM (n=10/группу). ****: $p < 0,0001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$. GluCer= глюкозилцерамид. GluSph=глюкозилсфингозин.

Фиг. 66А, фиг. 66В демонстрируют репрезентативные данные относительно уровней белка α -синуклеина и активности G-казы в клетках HeLa после трансдукции с применением PR004 или PR014. Клетки HeLa обрабатывали PR004, PR014 или вспомогательным веществом, и через 72 часа измеряли уровни α -синуклеина (фиг. 66А) и активность G-казы (фиг. 66В) в клеточных лизатах. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM (n=3/условие).

Фиг. 67А-фиг. 67С демонстрируют репрезентативные данные относительно эффективности PR004 в культурах нейронов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациента с болезнью Паркинсона (iPSC). Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные от пациента с болезнью Паркинсона с трипликацией SNCA, были дифференцированы в нейроны (фиг. 67А). Нейроны, полученные из iPSC, обрабатывали PR004 или вспомогательным веществом, и через две недели измеряли активность G-казы (фиг. 67В) и уровни α -синуклеина (фиг. 67С) в клеточных лизатах. Статистические данные определяли с помощью непарного t-критерия; *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM (n=2-3/группу).

Фиг. 68А, фиг. 68В демонстрируют репрезентативные данные относительно исследований, оценивающих нацеливание shPHK на SNCA из вектора PR004 в клетках HEK293 с помощью qRT-PCR. Клетки HEK293 трансфицировали PR004 или контролем, и PHK экстрагировали через 72 часа. qRT-PCR для различных генов выполняли и нормализовали по экспрессии GAPDH. Данные нормализованы к контрольным условиям и представлены как среднее значение \pm SEM (n=3/группа).

Фиг. 69 представляет собой схематическое изображение одного варианта дизайна исследования, изучающего желудочно-кишечные, двигательные и биохимические критерии на мышинной модели SNCA-A53T PAC после введения PR004. ICV=интрацеребровентрикулярный.

Фиг. 70 представляет собой схематическое изображение одного варианта дизайна исследования, изучающего двигательные и биохимические критерии на мышинной модели AAV2-SNCA-A53T после IPa-введения PR004. IPa=интрапаренхимный. Sn=черная субстанция. ICV=интрацеребровентрикулярный.

Фиг. 71А, фиг. 71В демонстрируют репрезентативные данные относительно оценки двигательных фенотипов после введения PR004 на мышинной модели AAV2-SV4-A53T. Мышам в возрасте 10 недель вводили (1) AAV-Null или AAV-SNCA-A53T посредством IPa-инъекции в SN и (2) вспомогательное вещество или PR004 посредством ICV-инъекции. Кинематический анализ мелкой моторики (MotoRater) проводили через 4 недели (фиг. 71А) и 9 недель (фиг. 71В) после лечения. Статистические данные определяли с помощью анализа ANOVA, с последующей коррекцией по критерию множественных сравнений Даннета; *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM (n=10/группу). IPa=интрапаренхимный. Sn=черная субстанция. ICV=интрацеребровентрикулярный.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение частично основано на композициях и способах экспрессии комбинаций определенных генных продуктов (например, генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС) у субъекта. Генный продукт может представлять собой белок, фрагмент (например, часть) белка, интерфе-

рирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС, и т.д. В некоторых вариантах осуществления генный продукт представляет собой белок или фрагмент белка, кодируемый геном, ассоциированным с заболеванием ЦНС. В некоторых вариантах осуществления генный продукт представляет собой интерферирующую нуклеиновую кислоту (например, shРНК, siРНК, miРНК, amiРНК, т.д.), которая ингибирует ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС.

Ген, ассоциированный с заболеванием ЦНС, относится к гену, кодирующему генный продукт, который генетически, биохимически или функционально ассоциирован с заболеванием ЦНС, таким как болезнь Паркинсона (PD), болезнь Гоше (GD) или синуклеинопатия. Например, у индивидуумов, имеющих мутации в гене GBA1 (который кодирует белок Gcase), наблюдался повышенный риск развития PD по сравнению с индивидуумами, у которых нет мутации в GBA1. В другом примере PD ассоциирована с накоплением белковых агрегатов, содержащих белок α -синуклеин (α -Syn); соответственно, SNCA (который кодирует α -Syn) является геном, ассоциированным с заболеванием ЦНС. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе экспрессионная кассета кодирует дикую или немутантную форму гена, ассоциированного с заболеванием ЦНС (или его кодирующую последовательность). Примеры генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, перечислены в табл. 1.

Примеры генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС

Название	Ген	Функция	Номер доступа NCBI
Белок лизосомальной мембраны 2	<i>SCARB2/LIMP2</i>	лизосомальный рецептор глюкозилцерамидазы (нацеливающийся на GBA)	NP_005497.1 (Изоформа 1), NP_001191184.1 (Изоформа 2)
Просапозин	<i>PSAP</i>	предшественник сапозинов А, В, С и D, которые локализируются в лизосомальном компартменте и способствуют катаболизму гликофинголипидов с короткими олигосахаридными группами	AAH01503.1, AAH07612.1, AAH04275.1, AAA60303.1
бета-глюкоцереброзидаза	<i>GBA1</i>	расщепляет бета-глюкозидную связь глюкоцереброзида	NP_001005742.1 (Изоформа 1), NP_001165282.1 (Изоформа 2), NP_001165283.1 (Изоформа 3)
альфа-синуклеин	<i>SNCA</i>	играет роль в поддержании снабжения синаптических везикул в пресинаптических окончаниях за счет кластеризации синаптических везикул и может способствовать регуляции высвобождения дофамина	NP_001139527.1

Дефицит ферментов, таких как лизосомальная кислая β -глюкоцереброзидаза (например, генный продукт гена *GBA1*; также называемая G-казой), а также общие варианты многих генов, участвующих в функции лизосом или переносе макромолекул в лизосомы (например, лизосомный мембранный белок 1 (*LIMP*), также называемый как *SCARB2*), были ассоциированы с повышенным риском PD и/или повышенным риском болезни Гоше (например, нейропатической болезни Гоше, такой как болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа). Настоящее изобретение частично основано на экспрессионных конструкциях (например, векторах), кодирующих G-казу (или ее часть), просапозин (или его часть), *LIMP2* (или его часть) или комбинации G-казы (или ее части) и одного или большего количества дополнительных генных продуктов из генов (например, *LIMP2*, просапозин и/или α -синуклеин (α -Syn)), ассоциированных с заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС), например PD, болезнью Гоше и т.д. В некоторых вариантах осуществления комбинации генных продуктов, описанные в настоящем документе, действуют вместе (например, синергетически) для уменьшения одного или большего количества признаков и симптомов заболевания ЦНС при экспрессии их у субъекта.

Соответственно, в некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, генный продукт гена GBA1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую G-казу, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая G-казу, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14 (например, как указано в эталонной последовательности NCBI NP000148.2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую G-казу.

В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую просапозин (например, генный продукт гена PSAP). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую просапозин, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая просапозин, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16 (например, как указано в эталонной последовательности NCBI NP002769.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую просапозин.

В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую LIMP2/SCARB2 (например, генный продукт гена SCARB2). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SCARB2, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая LIMP2/SCARB2, кодирует белок, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18 (например, как указано в эталонной последовательности NCBI NP005497.1). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция содержит инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), например, ITR AAV, фланкирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SCARB2.

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

В некоторых вариантах осуществления первый генный продукт или второй генный продукт представляет собой белок G-казу или его часть. В некоторых вариантах осуществления первый генный продукт или второй генный продукт представляет собой белок LIMP2 или его часть, или просапозин, или его часть. В некоторых вариантах осуществления первый генный продукт представляет собой белок G-казу и второй генный продукт представляет собой белок LIMP2 или его часть, или просапозин, или его часть. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция кодирует (например, отдельно или в дополнение к другому генному продукту) интерферирующую нуклеиновую кислоту (например, shRNA, miRNA, dsRNA и т.д.). В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию α -синуклеина (α -синуклеин). В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на α -синуклеин, содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 20-25. В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на α -синуклеин, содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на α -синуклеин, связывается с (например, гибридизуется с) последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 20-25. В некоторых вариантах осуществления интерферирующая нуклеиновая кислота, нацеленная на α -синуклеин, связывается (например, гибридизуется с) последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит один или большее количество промоторов. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA), промотор CAG, промотор CD68 или промотор JeT. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК pol II (или промотор РНК

роI III (например, U6 и т.д.).

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

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

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

В некоторых аспектах настоящего изобретения относится к векторам gAAV, содержащим ITR, имеющий модифицированную область "D" (например, последовательность D, которая модифицирована относительно ITR AAV2 дикого типа, SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления ITR, имеющий модифицированную область D, представляет собой 5' ITR вектора gAAV. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область "D" содержит последовательность "S", например, как указано в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления ITR, имеющий модифицированную область "D", представляет собой 3' ITR вектора gAAV. В некоторых вариантах осуществления модифицированная область "D" включает 3'ITR, в которой область "D" расположена на 3'-конце ITR (например, на внешнем или терминальном конце ITR относительно трансгенной вставки вектора). В некоторых вариантах осуществления модифицированная область "D" содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26 или 27. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота (например, вектор gAAV) содержит область TRY. В некоторых вариантах осуществления область TRY содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: с 1 по 13, 15, 17, 19 и 32-48. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, кодирует пептид, содержащий или состоящий из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 14, 16 и 18.

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

В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе, или вектор, как описано в данном документе. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается рекомбинантный аденоассоциированный вирус (gAAV), содержащий капсидный белок и выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в данном документе.

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

В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющимся или подозреваемым заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), при этом указанный способ включает введение субъекту (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, или gAAV), как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой нейродегенеративное заболевание, такое как нейродегенеративное заболевание, указанное в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой синуклеинопатию, такую как синуклеинопатия, указанная в табл. 5. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой таупатию, такую как таупатия, указанная в табл. 6. В некоторых вариантах осуществления заболевание ЦНС представляет собой лизосомальную болезнь накопления, такую как лизосомальная болезнь накопления, указанная в табл. 7. В некоторых вариантах осуществления лизосомальная болезнь накопления представляет собой нейропатическую болезнь Гоше, такую как болезнь Гоше 1-го типа, болезнь Гоше 2-го типа или болезнь Гоше 3-го типа. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой болезнью Паркинсона, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, или gAAV), как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше 2 типа или болезнью Гоше 3 типа, при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок G-казу, при этом последовательность, кодирующая белок G-казу, содержит SEQ ID NO: 15; и при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту, страдающему болезнью Гоше 2 типа или болезнью Гоше 3 типа, в дозе около $1,3 \times 10^{11}$ геномов вектора (vg)/г головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ лечения субъекта, страдающего болезнью Паркинсона, с мутацией глюкоцереброзидазы-1 (GBA1), при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок G-казу, при этом последовательность, кодирующая белок G-казу, содержит SEQ ID NO: 15; и при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту, страдающему болезнью Паркинсона, в дозе около 1×10^{14} геномов вектора (vg) или около 2×10^{14} vg. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят путем субокипитальной инъекции в большую цистерну.

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

Выделенные нуклеиновые кислоты и векторы

Выделенная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую G-казу (например, генный продукт гена GBA1), или ее часть. G-каза, также называемая β -глюкоцереброзидазой или GBA, относится к лизосомальному белку, который расщепляет бета-гликозидную связь химического глюкоцереброзида, промежуточного продукта метаболизма гликолипидов. Дефицит G-казы, ключевого лизосомального фермента, необходимого для нормального метаболизма гликолипидов, приводит к накоплению гликолипидных субстратов G-казы: глюкозилцерамида (GluCer) и глюкозилсфингозина (GluSph). У человека G-каза кодируется геном GBA1, расположенным на хромосоме 1. В некоторых вариантах осуществления GBA1 кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP_000148.2 (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую G-казу, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека), такая как последовательность, указанная в SEQ ID NO: 15.

В некоторых аспектах данного изобретения предлагается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую просапозин (например, генный продукт гена PSAP). Просапозин является гликопротеином-предшественником для белков-активаторов сфинголипидов (сапозин) А, В, С и D, которые способствуют катаболизму гликофинголипидов с короткими олигосахаридными группами. У людей ген PSAP находится на хромосоме 10. В некоторых вариантах осуществления PSAP кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP002769.1 (например, SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую просапозин, которая была кодон-оптимизирована (например, кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих, например, в клетках человека), такая как последовательность, указанная в SEQ ID NO: 17.

Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую LIMP2/SCARB2 (например, генный продукт гена SCARB2). SCARB2 относится к мембранному белку, который регулирует лизосомальный и эндосомальный транспорт внутри клетки. У человека ген SCARB2, расположен на хромосоме 4. В некоторых вариантах осуществления ген SCARB2 кодирует пептид, который представлен эталонной последовательностью NCBI NP005497.1 (SEQ ID NO: 18). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления вы-

деленная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую SCARB2, которая была кодон-оптимизирована.

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

В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор gAAV), описанные в данном документе, содержат последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-48, или состоят из нее. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор gAAV), описанные в данном документе, содержат или состоят из последовательности, которая является комплементарной (например, комплементарной для) последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-48. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор gAAV), описанные в данном документе, содержат или состоят из последовательности, которая является обратным комплементом последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-48. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или вектор (например, вектор gAAV), описанные в данном документе, содержат или состоят из части последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-48. Часть может содержать по меньшей мере 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-48. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, представляет собой смысловую цепь нуклеиновой кислоты (например, цепь от 5' к 3') или, в контексте вирусных последовательностей, плюс (+) цепь. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе, представляет собой антисмысловую цепь нуклеиновой кислоты (например, цепь от 3' к 5') или, в контексте вирусных последовательностей, минус (-) цепь.

В некоторых вариантах осуществления генный продукт кодируется кодирующей частью (например, кДНК) встречающегося в природе гена. В некоторых вариантах осуществления первый генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый геном GBA1m. В некоторых вариантах осуществления генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый геном SCARB2/LIMP2 или геном PSAP. Однако квалифицированный специалист понимает, что порядок экспрессии первого генного продукта (например, G-казы) и второго генного продукта (например, LIMP2) обычно может быть обратным (например, LIMP2 является первым генным продуктом, а G-каза - вторым генным продуктом). В некоторых вариантах осуществления генный продукт представляет собой фрагмент (например, часть) гена, указанного в табл. 1. Фрагмент белка может содержать около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или около 99% белка, кодируемого генами, указанными в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент белка содержит от 50% до 99,9% (например, любое значение от 50% до 99,9%) белка, кодируемого геном, указанным в табл. 1.

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

Полицистронный экспрессионный вектор может содержать один или большее количество (например, 1, 2, 3, 4, 5, или более) промоторов. Можно применять любой пригодный промотор, например, конститутивный промотор, индуцибельный промотор, эндогенный промотор, тканеспецифический промотор (например, ЦНС-специфический промотор) и т.д. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина курицы (промотор CBA), промотор CAG (например, как описано в публикации Alexopoulos et al. (2008) BMC Cell Biol. 9:2; doi: 10.1186/1471-2121-9-2), промотор CD68 или промотор JeT (например, как описано в публикации Tornøe et al. (2002) Gene 297(1-2):21-32). В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей первый генный продукт, второй генный продукт или первый генный продукт и второй генный продукт. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета содержит одну или большее количество дополнительных регуляторных последовательностей, включая, помимо прочего, последовательности связывания факторов транскрипции, сайты сплайсинга интронов, сайты присоединения поли(A), энхансерные последовательности, сайты связывания репрессоров или любую комбинацию вышеперечисленных элементов.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый генный продукт, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй генный продукт, разделены последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей внутренний участок посадки рибосомы (IRES). Примеры участков IRES описаны, например, в публикации Mokrejs et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34(Database issue):D125-30. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый генный продукт, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй генный продукт, разделены последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей

шей саморасщепляющийся пептид. Примеры саморасщепляющихся пептидов включают, помимо прочего, T2A, P2A, E2A, F2A, BmCPV 2A и BmIFV 2A, а также пептиды, описанные в публикации Liu et al. (2017) *Sci Rep.* 7: 2193. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид T2A.

Патогенетически, такие нарушения, как болезнь Паркинсона и болезнь Гоше, ассоциированы с накоплением белковых агрегатов, состоящих в основном из белка α -синуклеина (α -Syn). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, содержат ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая снижает или предотвращает экспрессию белка α -Syn. Последовательность, кодирующая ингибирующую нуклеиновую кислоту, может быть помещена в нетранслируемую область (например, интрон, 5'UTR, 3'UTR и т.д.) экспрессионного вектора. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота расположена в интроне экспрессионной конструкции, например, в интроне выше последовательности, кодирующей первый генный продукт. Ингибирующая нуклеиновая кислота может быть двухцепочечной РНК (dsРНК), siРНК, shРНК, микроРНК (miРНК), искусственной miРНК (amiРНК) или аптамером РНК. Обычно ингибирующая нуклеиновая кислота связывается с (например, гибридизуется с) от около 6 до около 30 (например, любое целое число от 6 до 30 включительно) смежных нуклеотидов целевой РНК (например, мРНК). В некоторых вариантах осуществления ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой miРНК или amiРНК, например, miРНК, нацеленную на SNCA (ген, кодирующий белок α -Syn). В некоторых вариантах осуществления miРНК не содержит каких-либо несовпадений с областью SNCA мРНК с которой она гибридизуется (например, miРНК является "усовершенствованной") В некоторых вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой shРНК (например, shРНК, нацеленную на SNCA). В некоторых вариантах осуществления shРНК, которая нацеливается на SNCA, кодируется SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления shРНК, которая нацеливается на SNCA, кодируется последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 20.

Квалифицированному специалисту будет понятно, что когда речь идет о последовательностях нуклеиновых кислот, содержащих или кодирующих ингибирующие нуклеиновые кислоты (например, dsРНК, siРНК, shРНК, miРНК, amiРНК и т.д.), любой один или большее количество нуклеотидов тимидина (Т) или нуклеотидов уридина (U) в последовательности, представленной в данном документе, может быть заменен любым другим нуклеотидом, подходящим для спаривания оснований (например, посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику) с нуклеотидом аденозина. Например, Т можно заменить на U, а U можно заменить на Т.

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

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

Аспекты настоящего изобретения относятся к выделенным нуклеиновым кислотам (например, векторам rAAV), содержащим ITR, имеющего одну или большее количество модификаций (например, дублирования, делеции, замены нуклеиновых кислот и т.д.) относительно ITR AAV дикого типа, например, относительно ITR AAV2 дикого типа (например, SEQ ID NO: 29). Структура ITR AAV2 дикого типа приведена на фиг. 19. Как правило, ITR дикого типа содержит 125 нуклеотидную область, которая самоотжигается с образованием палиндромной двухцепочечной Т-образной шпильчатой структуры, состоя-

шей из двух поперечных плеч (образованных последовательностями, обозначаемыми как В/В' и С/С соответственно), более длинной стеблевой области (образованной последовательностями А/А') и одноцепочечной концевой области, называемой областью "D". (фиг. 19). Как правило, область "D" ITR расположена между областью стебля, образованной последовательностями А/А', и вставкой, содержащей трансген вектора гAAV (например, расположенной "внутри" ITR относительно конца ITR или проксимальнее вставки трансгена или экспрессионной конструкции вектора гAAV). В некоторых вариантах осуществления область "D" содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27. Было обнаружено, что область "D" играет важную роль в инкапсидации векторов гAAV капсидными белками, например, как описано в публикации Ling et al. (2015) *J Mol Genet Med* 9(3).

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

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

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

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

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

HEK293T. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, например клетку *E. coli*.

гAAV

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

7;26(2):510-523. В некоторых вариантах осуществления вариант капсидного белка представляет собой капсидный белок AAV TM6, например, как описано в публикации Rosario et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016; 3: 16026. В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в данном документе, легко распространяются в ЦНС, особенно при введении в пространство, где циркулирует СМЖ, или непосредственно в паренхиму головного мозга. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в данном документе, содержат капсидный белок, который способен проходить через гемато-энцефалический барьер (BBB). Например, в некоторых вариантах осуществления гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9 или AAVrh. 10. Производство гAAV описывается, например, в публикациях Samulski et al. (1989) *J Virol.* 63(9):3822-8 и Wright (2009) *Hum Gene Ther.* 20(7): 698-706. В некоторых вариантах осуществления гAAV содержит капсидный белок, который специфически или предпочтительно нацелен на миелоидные клетки, например, клетки микроглии.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается гAAV, именуемый "PR001". Этот гAAV экспрессирует кодон-оптимизированную кодирующую последовательность GBA1 человека (SEQ ID NO:15). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается гAAV, именуемый "PR001A". PR001A (AAV9.CBA.GBA1.A) представляет собой гAAV, который доставляет функциональный ген GBA1 человека, приводящий к повышенной экспрессии функционального гена G-казы человека. Вставка вектора PR001A содержит элемент промотора куриного β -актина (CBA), состоящий из 4 частей: энхансера цитомегаловируса (CMV), промотора CBA, экзона 1 и интрона (int) для постоянной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности GBA1 человека (SEQ ID NO:15). 3'-область также содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), за которым следует сигнальный хвост полиаденилирования бычьего гормона роста. Три хорошо охарактеризованных регуляторных сайта активации транскрипции включены на 5' конце промоторной области: TATA, RBS и YY1 (см., например, публикацию Francois et al., (2005) *J. Virol.* 79(17): 11082-11094).

Фланкирующие инвертированные концевые повторы (ITR) позволяют правильно упаковывать вставочные последовательности. Представлены два варианта 5' ITR-последовательности (фиг. 7, вставка, нижняя последовательность); эти варианты имеют несколько нуклеотидных различий в пределах 20-нуклеотидной "D" области ITR, что, как полагают, влияет на эффективность упаковки и экспрессии. PR001A содержит нуклеотидную последовательность домена "D", продемонстрированную на фиг. 7 (вставка, верхняя последовательность; SEQ ID NO:30). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается вариантный вектор, называемый "PR001B", который несет мутантный домен "D" (называемый в данном документе доменом "S", с нуклеотидными изменениями, продемонстрированными затенением в SEQ ID NO: 31 на фиг. 7). За исключением другой последовательности 5'ITR, PR001B является идентичным PR001A. Каркас содержит ген, придающий устойчивость к канамицину, а также спейсерную последовательность, предотвращающую обратную упаковку. Схематическое изображение плазмиды, кодирующей вектор гAAV, приведено на фиг. 55. SEQ ID NO: 39 представляет собой нуклеотидную последовательность первой цепи (в порядке от 5' до 3') плазмиды, кодирующей вектор PR001A, продемонстрированной на фиг. 55. SEQ ID NO: 40 представляет собой нуклеотидную последовательность второй цепи (в порядке от 5' до 3') плазмиды, кодирующей вектор PR001A, продемонстрированной на фиг. 55. PR001A содержит капсидные белки AAV9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается гAAV, именуемый "PR004". Этот гAAV экспрессирует кодонно-оптимизированную кодирующую последовательность GBA1 человека (SEQ ID NO:15) и последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая нацелена на снижение уровня α -синуклеина и включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается гAAV, именуемый "PR004X". В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается гAAV, именуемый "PR004Y". Каждый из PR004X и PR004Y представляет собой гAAV, который (i) доставляет функциональный ген GBA1 человека, приводящий к повышенной экспрессии функциональной G-казы человека, и (ii) кодирует shРНК, которая снижает уровни α -синуклеина посредством РНК-интерференции. Вставка вектора PR004 содержит элемент промотора куриного β -актина (CBA), состоящий из 4 частей: энхансера цитомегаловируса (CMV), промотора CBA, экзона 1 и интрона (int) для постоянной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности GBA1 человека (SEQ ID NO:15), а также последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20. 3'-область также содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), за которым следует сигнальный хвост полиаденилирования бычьего гормона роста. На 5' конце промоторной области включены три хорошо охарактеризованных регуляторных сайта активации транскрипции: TATA, RBS и YY1 (см. например, публикацию Francois et al., (2005) *J. Virol.* 79(17): 11082-11094). Фланкирующие инвертированные концевые повторы (ITR) позволяют правильно упаковывать вставочные последовательности. Каркас содержит ген, придающий устойчивость к канамицину, а также спейсерную последовательность, предотвращающую обратную упаковку. Схематическое изображение плазмиды, кодирующей вектор гAAV PR004X, приве-

дено на фиг. 56. SEQ ID NO: 41 представляет собой нуклеотидную последовательность первой цепи (в порядке от 5' до 3') плазмиды, кодирующей вектор PR004X, продемонстрированной на фиг. 56. SEQ ID NO: 42 представляет собой нуклеотидную последовательность второй цепи (в порядке от 5' до 3') плазмиды, кодирующей вектор PR004X, продемонстрированной на Фиг. 56. Схематическое изображение плазмиды, кодирующей вектор гAAV PR004Y, приведено на фиг. 57. SEQ ID NO: 43 представляет собой нуклеотидную последовательность первой цепи (в порядке от 5' до 3') плазмиды, кодирующей вектор PR004Y, продемонстрированной на фиг. 57. SEQ ID NO: 44 представляет собой нуклеотидную последовательность второй цепи (в порядке от 5' до 3') плазмиды, кодирующей вектор PR004Y, продемонстрированной на фиг. 57. Каждый из PR004X и PR004Y содержит капсидные белки AAV9. Векторы PR004X и PR004Y разработаны для уменьшения накопления всех форм α -синуклеина, включая агрегированные и внеклеточные формы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается гAAV, именуемый "PR014". Этот гAAV экспрессирует последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая нацелена на снижение уровня α -синуклеина и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается гAAV, именуемый "PR014X". PR014X представляет собой гAAV, который кодирует shPHK, которая снижает уровни α -синуклеина посредством РНК-интерференции. Вставка вектора PR014X содержит элемент промотора куриного β -актина (CBA), состоящий из 4 частей: энхансера цитомегаловируса (CMV), промотора CBA, экзона 1 и интрона (int) для постоянной экспрессии последовательности, кодирующей ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20. 3'-область также содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), за которым следует сигнальный хвост полиаденилирования бьего гормона роста. На 5' конце промоторной области включены три хорошо охарактеризованных регуляторных сайта активации транскрипции: TATA, RBS и YY1 (см., например, публикацию Francois et al., (2005) J. Virol. 79(17): 11082-11094). Фланкирующие инвертированные концевые повторы (ITR) позволяют правильно упаковывать вставочные последовательности. Каркас содержит ген, придающий устойчивость к канамицину, а также спейсерную последовательность, предотвращающую обратную упаковку. Схематическое изображение плазмиды, кодирующей вектор гAAV, приведено на фиг. 58. SEQ ID NO: 45 представляет собой нуклеотидную последовательность первой цепи (в порядке от 5' до 3') плазмиды, кодирующей вектор PR014X, продемонстрированной на фиг. 60. SEQ ID NO: 46 представляет собой нуклеотидную последовательность второй цепи (в порядке от 5' до 3') плазмиды, кодирующей вектор PR014X, продемонстрированной на фиг. 60. SEQ ID NO: 47 представляет собой нуклеотидную последовательность первой цепи (в порядке от 5' до 3') shPHK в плазмиде, кодирующей вектор PR014X, продемонстрированной на фиг. 58. SEQ ID NO: 48 представляет собой нуклеотидную последовательность второй цепи (в порядке от 5' до 3') shPHK в плазмиде, кодирующей вектор PR014X, продемонстрированной на фиг. 58. PR014X содержит капсидные белки AAV9. Вектор PR014X разработан для уменьшения накопления всех форм α -синуклеина, включая агрегированные и внеклеточные формы. В некоторых вариантах осуществления гAAV, как описано в данном документе (например, содержащий рекомбинантный геном гAAV, инкапсидированный капсидными белками AAV с образованием капсидной частицы гAAV), продуцируется в экспрессионной системе бакуловирусного вектора (BEVS). Продуцирование гAAV с применением BEVS описано, например, в публикациях Urabe et al. (2002) Hum Gene Ther 13(16):1935-43, Smith et al. (2009) Mo/ Ther 17(11):1888-1896, патенте США № 8945918, патенте США 9879282 и международной публикации PCT WO 2017/184879. Однако гAAV можно получить с использованием любого подходящего метода (например, с применением рекомбинантных генов гер и сар). В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе гAAV продуцируется в клетках HEK293 (эмбриональная почка человека).

Фармацевтические композиции

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

В контексте данного документа термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, стабилизатор, диспергирующий агент, суспендирующий агент, разбавитель, вспомогательное вещество, загуститель, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующие в переносе или транспортировке соединения, пригодного в контексте настоящего изобретения, внутрь организма или к пациенту, так что он может выполнять свою предполагаемую функцию. Дополнительные ингредиенты, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, применяемые в практике настоящего изобретения, известны в данной области техники и описаны, например, в публикации Remington's Pharma-

ceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA), которая включена в данный документ посредством ссылки.

Композиции (например, фармацевтические композиции), предлагаемые в настоящем изобретении, можно вводить любым путем, включая энтеральный (например, пероральный), парентеральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интрастекальный, подкожный, внутрижелудочковый, трансдермальный, межкожный, ректальный, интравагинальный, внутрибрюшинный, местный (например, в виде порошков, мазей, кремов и/или капель), мукозальный, назальный, буккальный, сублингвальный путь; путем интратрахеальной инстиляции, бронхиальной инсталляции и/или ингаляции; и/или в виде спрея для полости рта, спрея для носа и/или аэрозоля. Конкретно предполагаемыми путями являются пероральное введение, внутривенное введение (например, системная внутривенная инъекция), региональное введение через кровь и/или лимфу и/или прямое введение в пораженный участок. Как правило, наиболее подходящий способ введения будет зависеть от множества факторов, включая природу агента (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или состояние субъекта (например, от того, может ли субъект перорально принимать препарат). В определенных вариантах осуществления соединение или фармацевтическая композиция, описанные в настоящем документе, пригодны для местного введения в глаз субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается готовый лекарственный продукт PR001 (например, PR001A), содержащий PR001 гAAV, описанный выше, представленный в форме водного раствора. В некоторых вариантах осуществления буфер конечного состава содержит около 20 mM Трис, pH 8,0, около 1 mM MgCl₂, около 200 mM NaCl и около 0,001% полоксамера 188 (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления готовый лекарственный продукт и буфер конечного состава являются пригодными для инъекции в большую цистерну (ICM) или для внутривенного введения.

Способы

Аспекты настоящего изобретения относятся к доставке композиций (например, выделенных нуклеиновых кислот, гAAV и т.д.), сконструированных для экспрессии продуктов генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, в клетку или клетки (например, клетку или клетки субъекта).

Как описано далее в разделе "Примеры", аспекты настоящего изобретения относятся к композициям, экспрессирующим генные продукты, которые ингибируют или предотвращают рубцевание глии (например, глиоз). Соответственно, в некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ ингибирования рубцевания глии у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции (например, выделенной нуклеиновой кислоты или гAAV), как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или у него подозревают заболевание центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет болезнь Гоше (GD). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет нейронопатическую GD (nGD) (например, GD типа 2 или GD типа 3). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет GD типа 1. В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий болезнью GD, не имеет PD или не имеет симптомов PD. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет паркинсонизм. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет болезнь Паркинсона (PD). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет атипичное паркинсоническое расстройство. В некоторых вариантах осуществления атипичным паркинсоническим расстройством является деменция с тельцами Леви, прогрессирующий надъядерный паралич, множественная системная атрофия или кортикобазальный синдром.

Настоящее изобретение частично основано на композициях для экспрессии одного или большего количества продуктов генов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта, для лечения заболеваний, ассоциированных с ЦНС. Один или большее количество генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, могут кодироваться одной или большим количеством выделенных нуклеиновых кислот или векторов гAAV. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят один вектор (например, выделенную нуклеиновую кислоту, гAAV и т.д.) кодирующий один или большее количество (1,2, 3,4,5 или более) генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят множество (например, 2,3,4,5 или более) векторов (например, выделенные нуклеиновые кислоты, гAAV и т.д.), при этом каждый вектор кодирует другой генный продукт, ассоциированный с заболеванием ЦНС. В некоторых вариантах осуществления указанная композиция экспрессирует GVA или ее часть. В некоторых вариантах осуществления указанная композиция экспрессирует интерферирующую РНК, которая нацелена на альфа-синуклеин. В некоторых вариантах осуществления указанная композиция экспрессирует GVA или ее часть и интерферирующую РНК, нацеленную на альфа-синуклеин.

Заболевание с поражением ЦНС, может представлять собой нейродегенеративное заболевание, синуклеинопатию, таупатию или лизосомальную болезнь накопления. Примеры нейродегенеративных заболеваний и ассоциированных с ними генов перечислены в табл. 4.

Термин "синуклеинопатия" относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся накоплением альфа-синуклеина (генного продукта SNCA) у субъекта (например, по сравнению со здоровым субъектом, например, субъектом, не страдающим синуклеинопатией). Примеры синуклеинопатий и ассоциированных с ними генов перечислены в табл. 5.

Термин "таупатия" относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся накоплением аномального тау-белка у субъекта (например, по сравнению со здоровым субъектом, не страдающим таупатией). Примеры таупатий и ассоциированных с ними генов приведены в табл. 6. "Лизосомальная болезнь накопления" относится к заболеванию, характеризующемуся аномальным накоплением токсичных клеточных продуктов в лизосомах субъекта. Примеры лизосомальных болезней накопления и ассоциированных с ними генов перечислены в табл. 7.

В контексте данного документа термины "лечить" или "воздействовать" относятся к (a) предотвращению или отсрочке начала заболевания ЦНС; (b) уменьшению тяжести заболевания ЦНС; (c) уменьшению или предотвращению развития симптомов, характерных для заболевания ЦНС; (d) и/или предотвращению ухудшения симптомов, характерных для заболевания ЦНС. Симптомы заболевания ЦНС могут включать, например, двигательную дисфункцию (например, дрожь, ригидность, замедленность движений, трудности с ходьбой, паралич), когнитивную дисфункцию (например, слабоумие, депрессию, беспокойство, психоз), проблемы с памятью, эмоциональную и поведенческую дисфункцию. Настоящее изобретение частично основано на композициях для экспрессии одного или большего количества РД-ассоциированных генных продуктов у субъекта, которые действуют вместе (например, синергетически), для лечения болезни Паркинсона.

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

Настоящее изобретение частично основано на композициях для экспрессии одного или большего количества генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС, у субъекта, для лечения болезни Гоше (GD). Диагноз GD устанавливается по наличию двуаллельных патогенных мутаций в GBA1 или по обнаружению менее 15% нормальной активности G-казы в лейкоцитах периферической крови. GBA1 мутации, вызывающие более серьезный дефицит ферментов, ассоциированы с более ранним началом заболевания, более быстрым прогрессированием симптомов и более высокой вероятностью развития неврологических симптомов (Svennerholm et al., Clin Genet. 1986;30(2):131-5; Cox, Biologies. 2010;4:299-313). GD традиционно подразделяется на три более широких фенотипа, отличающихся наличием неврологических проявлений (нейронопатический [GD типа 2 и GD типа 3; nGD] или ненейронопатический [GD типа 1]). Среди nGD различия между GD типа 2 и типа 3 могут представлять фенотипический континуум от острого до хронического проявления ЦНС и висцеральных симптомов. У младенцев GD типа 2, известная как острая нейронопатическая форма, обычно проявляется ранними бульбарными признаками (такими как косоглазие и/или затрудненное глотание), опистотонусом или спастичностью, надъядерным параличом взгляда и неспособностью достичь двигательных, поведенческих и когнитивных активностей. Большинство детей умирают к 2 годам (Goker-Alpan et al., J Pediatr. 2003;143(2):273-6; Roshan and Sidransky, Diseases. 2017;5(1):pii:E10). Характерным клиническим признаком GD типа 3 является медленный горизонтальный надъядерный паралич взгляда с другими неврологическими проявлениями, от когнитивных нарушений до атаксии и судорог до смерти в детстве или раннем подростковом возрасте (Goker-Alpan et al., J Pediatr. 2003;143(2):273-6; Tytki-Szymanska et al., J Inherit Metab Dis. 2010;33(4):339-46).

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

В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше типа 2 или болезнью Гоше типа 3, при этом указанный способ включает введение субъекту gAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок G-казу, при этом последовательность, кодирующая белок G-казу, содержит SEQ ID NO: 15; и при этом gAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения неврологического симптома у субъекта, страдающего болезнью Гоше типа 2 или болезнью Гоше типа 3, при этом указанный способ включает введение субъекту gAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок G-казу, при этом последовательность, кодирующая белок G-казу, содержит SEQ ID NO: 15; и при этом gAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления неврологическим симптомом болезни Гоше типа 2 или типа 3 является надъядерный паралич взгляда, гипотония, судороги, спастичность, гипокинезия, задержка или нарушение моторного или поведенческого развития, задержка или нарушение когнитивных функций, атаксия, интенционный тремор или ригидность.

В некоторых вариантах осуществления у пациентов, страдающих определенными формами болезни Гоше, проявляются симптомы периферической невропатии, например, как описано в публикации Viegstraaten et al. (2010) Brain 133(10):2909-2919. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения периферической невропатии у субъекта, страдающего болезнью Го-

ше (например, болезнью Гоше типа 1), при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок G-казу, при этом последовательность, кодирующая белок G-казу, содержит SEQ ID NO: 15; и при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения болезни Гоше типа 1 у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок G-казу, при этом последовательность, кодирующая белок G-казу, содержит SEQ ID NO: 15; и при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят субъекту внутривенно для лечения болезни Гоше типа 1.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ лечения субъекта, страдающего болезнью Паркинсона (PD), с мутацией глюкоцереброзидазы-1 (GBA1) (например, а патогенной мутацией GBA1), при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок G-казу, при этом последовательность, кодирующая белок G-казу, содержит SEQ ID NO: 15; и при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления предлагается способ лечения симптома у субъекта, имеющего PD с мутацией GBA1 при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок G-казу, при этом последовательность, кодирующая белок G-казу, содержит SEQ ID NO: 15; и при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления двигательными симптомами PD являются тремор в покое, брадикинезия, ригидность или затрудненная походка. В некоторых вариантах осуществления недвигательными симптомами PD являются когнитивные нарушения/деменция, депрессия, бред/галлюцинации, психоз, нарушения сна, запоры, мочевые симптомы, боль, anosmia, затрудненное глотание или гипотония. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет PD с одной мутацией GBA1. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет PD с двумя мутациями GBA1.

В некоторых вариантах осуществления гAAV, кодирующий белок G-казу, для лечения болезни Гоше типа 1, болезни Гоше типа 2, болезни Гоше типа 3 или болезни Паркинсона с мутацией GBA1, вводят субъекту в дозе от около 1×10^{12} геномов вектора (vg) до около 1×10^{15} vg, или от около 1×10^{13} vg до около 5×10^{14} vg, или от около 5×10^{13} vg до около 5×10^{14} vg, или от около $3,4 \times 10^{13}$ vg до около 1×10^{14} vg, или от около 1×10^{14} vg до около 5×10^{14} vg, или от около 1×10^{14} vg до около 3×10^{14} vg, или от около 1×10^{14} vg до около 2×10^{14} vg. Общая доза предполагает массу головного мозга взрослого человека 1,3 кг (Nakim and Mathieson, *Neurology*, 1979;29(9 Pt 1): 1209-14). Для субъектов-детей доза может быть соответственно увеличена. В некоторых вариантах осуществления доза для субъектов-детей может быть скорректирована с учетом оценки веса головного мозга по возрасту, например, на основе составного набора данных, который включает полученные данные веса головного мозга из 21 публикации, описывающей аутопсии и нейровизуализации (Vannucci и Vannucci, *Am J Phys Anthropol.* 2019;168(2):247-61).

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят гAAV, кодирующий белок G-казу, для лечения болезни Паркинсона с мутацией GBA1 (например, взрослому субъекту -человеку) в дозе около 1×10^{14} vg, около 2×10^{14} vg, около 3×10^{14} vg, около 4×10^{14} vg, или около 5×10^{14} vg. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят гAAV, кодирующий белок G-казу, для лечения болезни Паркинсона с мутацией GBA1 (например, взрослому субъекту-человеку) в дозе около 1×10^{14} vg (около $7,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), около 2×10^{14} vg (около $1,5 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга), или около 3×10^{14} vg (около $1,9 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга).

В некоторых вариантах осуществления субъекту (например, субъекту-ребенку) вводят гAAV, кодирующий белок G-казу, для лечения болезни Гоше типа 2 или типа 3, в дозе от около 5×10^{10} vg/г головного мозга до около 5×10^{11} vg/г головного мозга. В некоторых вариантах осуществления субъекту (например, субъекту-ребенку) вводят гAAV для лечения болезни Гоше типа 2 или болезни Гоше типа 3, в дозе около $1,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга (от около $5,9 \times 10^{13}$ vg до около $1,7 \times 10^{14}$ vg). В некоторых вариантах осуществления субъекту (например, субъекту-ребенку) вводят гAAV для лечения болезни Гоше типа 2 или болезни Гоше типа 3, в дозе около $1,9 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга (от около $8,6 \times 10^{13}$ vg до около $2,5 \times 10^{14}$ vg). В некоторых вариантах осуществления субъекту (например, субъекту-ребенку) вводят гAAV для лечения болезни Гоше типа 2 или болезни Гоше типа 3, в дозе около $7,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга (от около $3,4 \times 10^{13}$ vg до около 1×10^{14} vg) или в дозе около $2,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга (от около 1×10^{14} vg до около 3×10^{14} vg).

В некоторых вариантах осуществления гAAV, кодирующий белок G-казу, для лечения болезни Гоше типа 1, типа 2 или типа 3 или болезни Паркинсона с мутацией GBA1, вводят субъекту в виде разовой дозы, а впоследствии субъекту не вводят гAAV.

В некоторых вариантах осуществления гAAV, кодирующий белок G-казу, вводят путем субоципи-

тальной инъекции в большую цистерну. В некоторых вариантах осуществления инъекцию в большую цистерну выполняют под рентгенологическим контролем.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта, страдающего синуклеинопатией или паркинсонизмом, при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую трансген, содержащий (а) последовательность, кодирующую белок G-казу, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и (b) последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; или SEQ ID NO: 47; при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта, имеющего множественную системную атрофию, болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с мутацией GBA1, болезнь с тельцами Леви, деменцию с тельцами Леви, деменцию с тельцами Леви с мутацией GBA1, прогрессирующий надъядерный паралич или кортикобазальный синдром, при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую трансген, содержащий (а) последовательность, кодирующую белок G-казу, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и (b) последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; или SEQ ID NO: 47; при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта, страдающего синуклеинопатией или паркинсонизмом, при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую трансген, содержащий последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 47; при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения субъекта, имеющего множественную системную атрофию, болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с мутацией GBA1, болезнь с тельцами Леви, деменцию с тельцами Леви, деменцию с тельцами Леви с мутацией GBA1, прогрессирующий надъядерный паралич или кортикобазальный синдром, при этом указанный способ включает введение субъекту гAAV, содержащего нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую трансген, содержащий последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 47; при этом гAAV содержит капсидный белок, имеющий серотип AAV9.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту периферически, например, путем периферической инъекции. Примеры периферической инъекции включают подкожную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутриартериальную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию или любую

комбинацию из вышеперечисленных инъекций. В некоторых вариантах осуществления периферическая инъекция представляет собой внутриартериальную инъекцию, например, инъекцию в сонную артерию субъекта.

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

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

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

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

Примеры

Пример 1. Векторы гAAV.

Векторы AAV генерируют с применением клеток, таких как клетки HEK293, для тройной плазмидной трансфекции. Последовательности ITR фланкируют экспрессионную конструкцию, содержащую элемент промотора/энхансера для каждого представляющего интерес трансгена, 3' полиА-сигнал и посттрансляционные сигналы, такие как элемент WPRE. Множественные генные продукты можно экспрессировать одновременно, такие как GBA1 и LIMP2 и/или просапозин, путем слияния белковых последовательностей; или с применением пептидного линкера 2A, такого как T2A или P2A, что приводит к образованию 2 пептидных фрагментов с добавленными аминокислотами из-за предотвращения формирования пептидной связи; или с применением элемента IRES; или путем экспрессии с 2 отдельными экспрессионными кассетами. Присутствие короткой интронной последовательности, которая эффективно сплайсируется перед экспрессируемым геном, может повысить уровни экспрессии. shRNA и другие регуляторные РНК потенциально могут быть включены в эти последовательности. Примеры плазмид, содержащих векторы гAAV, описанные в данном документе, приведены на фиг. 1-6, Фиг. 21-27 и Фиг. 55-58, а также в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Название	Промото р 1	shPH К	CDS1	ПолиА 1	Бицистр онный элемент	Пром отор 2	CDS2	По ли А2	Дли на ме жду ITR
CMVe_CBAp_GBA1_WPRE_bGH	CBA		GBA1	WPRE-bGH					374 1
LT1s_JetLong_mPHKiaSYn_SCARB2-T2A-GBA1_bGH	JetLong	aSyn	SCARB2	bGH	T2A		GBA1		421 5
LI1_JetLong_SCARB2-IRES-GBA1_bGH	JetLong		SCARB2	bGH	IRES		GBA1		439 9
FP1_JetLong_GBA1_bGH_JetLong_SCARB2_SV40L	JetLong		GBA1	bGH		JetLong	SCARB2	SV40L	446 4
PrevailBекtop_LT2s_JetLong_mPHKiaSYn_PSA-P-T2A-GBA1_bGH_4353nt	JetLong	aSyn	PSAP	bGH	T2A	-	GBA1	-	435 3
PrevailVector_LI2_JetLong_PSAP_IRES_GBA1_SymtheticpolyA_4337nt	JetLong	-	PSAP	Синтетически й рА	IRES	-	GBA1	-	433 7

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

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

Используя такие клеточные модели, лизосомальные дефекты количественно оценивают с точки зрения накопления белковых агрегатов, таких как α -синуклеин с антителом к этому белку или фосфо- α Syn, с последующей визуализацией с помощью флуоресцентной микроскопии. Также выполняют визуализацию лизосомальных аномалий с помощью ICC для белковых маркеров, таких как LAMP1, LAMP2, LIMP1, LIMP2, или с применением красителей, таких как LysoTracker, или посредством поглощения через эндоцитарный компартмент флуоресцентного декстрана или других маркеров. Также можно выполнить визуализацию накопления маркеров аутофагии из-за дефективного слияния с лизосомами, например, для LC3. Вестерн-блоттинг и/или ИФА применяют для количественной оценки аномального накопления этих маркеров. Кроме того, накопление гликолипидных субстратов и продуктов GBA1 измеряют с помощью стандартных подходов. Терапевтические критерии (например, уменьшение патологического процесса, ассоциированного с PD) оценивают в контексте экспрессии трансдукции векторов AAV для подтверждения и количественной оценки активности и функции. G-казу можно также количественно определить с помощью ИФА для белков или с помощью стандартных анализов активности G-казы.

Пример 2.1. Фармакологические исследования *in vitro* с rAAV, кодирующим G-казу.

Трансдукция и активность.

Исследование *in vitro* для оценки способности PR001A (AAV9.CBA.GBA1.A) (схематическое изображение плазмиды, кодирующей вектор, приведено на Фиг. 55), содержащего кодон-оптимизированную кодирующую последовательность GBA1 человека (SEQ ID NO: 15) для экспрессии трансгена GBA1 в клетках HEK293T, продемонстрировал дозозависимое увеличение активности G-казы после трансдукции PR001A в клетках HEK293T (фиг. 33).

Показатели эффективности (α -синуклеин).

Исследования *in vitro* также проводили на клетках HeLa, линии клеток человека и в первичных нейронах гиппокампа мыши. В клетках HeLa, обработанных PR001A в количестве 2×10^6 vg/клетку, наблюдалось приблизительно 2-кратное увеличение уровней активности G-казы и снижение общих уровней α -синуклеина по сравнению с обработанными вспомогательным веществом контрольными клетками (фиг. 34A и фиг. 34B). При более низкой дозе PR001A подобного эффекта не наблюдалось.

Нейроны гиппокампа мыши, трансдуцированные PR001A в количестве $1,3 \times 10^5$ vg/клетку или

$1,3 \times 10^6$ vg/клетку, продемонстрировали повышенные уровни активности G-казы и тенденцию к снижению общих уровней α -синуклеина (фиг. 35A и фиг. 35B).

Таким образом, трансдукция PR001A в клеточных линиях и культурах первичных нейронов приводит к повышению активности G-казы. В клетках HeLa и нейронах гиппокампа мышей трансдукция PR001A также приводила к снижению уровней α -синуклеина, что подтверждает связь между активностью G-казы и уровнями α -синуклеина. (Mazzulli et al., Cell. 2011;146(1):37-52).

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

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

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

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

Пример 4. Химические модели заболевания.

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

Инtrateкальная или внутрижелудочковая доставка контрольных носителей и векторов AAV (например, в дозе 2×10^{11} vg/мышь) выполняется с применением концентрированных запасов AAV, например, в объеме инъекции 5-10 мкл. Осуществляют интрапаренхимальную конвекционную усовершенствованную доставку. Периферическая доставка достигается посредством инъекции в хвостовую вену. Лечение начинают либо до появления симптомов, либо после их появления. Измеряемыми критериями являются накопление субстрата в ЦНС и СМЖ, оценка накопления фермента G-казы с помощью ИФА и активности фермента, моторные и когнитивные функции, лизосомальная дисфункция и накопление мономеров α -синуклеина, протофибрилл или фибрилл.

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

В некоторых вариантах осуществления пациенты, страдающие определенными формами болезни Гоше (например, GD1), имеют повышенный риск развития болезни Паркинсона (PD) или деменции с тельцами Леви (LBD). В этом примере описаны клинические исследования для оценки безопасности и эффективности гAAV, как описано в данном документе, у пациентов с болезнью Гоше, PD и/или LBD. Клинические исследования таких векторов для лечения болезни Гоше, PD и/или LBD выполняются с применением дизайна исследования, аналогичного описанному в публикации Grabowski et al. (1995) Ann. Intern. Med. 122(1):33-39.

Пример 6. Лечение периферического заболевания.

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

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

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

Пример 7. Лечение форм заболеваний с поражением ЦНС.

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

Вестерн-блоттинга, ферментативных функциональных анализов или визуализационных исследований.

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

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

Вставка вектора гAAV содержит промоторный элемент СВА (СВА), состоящий из четырех частей: энхансера CMV (CMVe), промотора СВА (СВАp), экзона 1 и интрона (int) для постоянной экспрессии кодон-оптимизированной кодирующей последовательности (CDS) GBA1 человека (темно-бордовый). 3' область также содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), за которым следует сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота (bGH полиА). Фланкирующие ITR позволяют правильно упаковывать вставочные последовательности. Оценивали два варианта 5' ITR-последовательности (фиг. 7, вставка, нижняя последовательность); эти варианты имеют несколько нуклеотидных различий в пределах 20-нуклеотидной "D" области ITR, что, как полагают, влияет на эффективность упаковки и экспрессии. Продукт вектора гAAV содержит нуклеотидную последовательность домена "D", продемонстрированную на фиг. 7 (вставка, верхняя последовательность) Вариант вектора содержит мутантный домен "D" (именуемый в данном документе "S" доменом, нуклеотидные изменения продемонстрированы заштрихованными), аналогично изученный в доклинических исследованиях. Каркас содержит ген, придающий устойчивость к канамицину, а также спейсерную последовательность, предотвращающую обратную упаковку. Схема вектора гAAV приведена на фиг. 8. Вектор гAAV упаковывают в гAAV с применением капсидных белков серотипа AAV9.

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

Пример 8.1. Фармакологические исследования *in vivo* с гAAV, кодирующим G-казу.

Первоначальные исследования были проведены на химической модели мыши, включающей ежедневное введение кондуритол-β-эпоксида (СВЕ), ингибитора G-казы, для оценки эффективности и безопасности вектора PR001A гAAV (AAV9.СВА.GBA1.A) (схематическое изображение плазмиды, кодирующей вектор, приведено на Фиг. 55), содержащего кодон-оптимизированную кодирующую последовательность GBA1 человека (SEQ ID NO: 15) и конструкцию S-варианта гAAV PR001B (как описано ниже). Кроме того, первоначальные исследования были выполнены на генетической модели мышей, несущей гомозиготную мутацию GBA1 и частично дефицитную по сапозинам (4L/PS-NA). Для дальнейшей оценки безопасности и эффективности вектора проводятся дополнительные исследования диапазона доз на мышцах и приматах, не относящихся к человеку (NHP).

Эти мышинные модели демонстрируют фенотипы, характерные для pGD (нейропатической болезни Гоше) и PD-GBA (болезни Паркинсона, характеризующейся мутацией в гене GBA1), включая пониженную активность G-казы, накопление гликолипидных субстратов G-казы, дефицит двигательных функций и невропатологические изменения, включая астроглиоз и микроглиоз, отражающие воспаление. Внутрицеребровентрикулярная инъекция PR001A подавляла все эти ассоциированные с заболеванием фенотипы. Кроме того, модель мыши 4L/PS-NA продемонстрировала накопление α-синуклеина, а ICV-введение PR001A в модели 4L/PS-NA уменьшало накопление α-синуклеина.

Две несколько отличающиеся версии 5'-инвертированного концевой повтора (ITR) в основной цепи AAV были протестированы для оценки возможности продуцирования и экспрессии трансгена (фиг. 7). Считается, что домен "D" из 20 п.о. в 5' ITR из 145 п.о. необходим для оптимального продуцирования вирусного вектора, но также сообщалось, что мутации в домене "D" в некоторых случаях увеличивают экспрессию трансгена. Таким образом, в дополнение к вирусному вектору PR001A, который содержит интактный домен "D", также оценивалась вторая форма вектора (PR001B) с мутантным доменом D (называемым в данном документе доменом "S"). Как PR001A гAAV, так и вариант PR001B гAAV экспрессируют один и тот же трансген. Хотя оба вектора продуцировали вирус, который был эффективен *in vivo*, как подробно описано ниже, для дальнейшей разработки был выбран PR001A гAAV, который содержит домен "D" дикого типа.

Доклинические исследования фармакологии (эффективности) *in vivo* представлены в табл. 14. Всего было выполнено 10 исследований; 4 основных исследования подробно обсуждаются в следующих разделах.

Пример 8.1.1. Исследования на мышинной модели СВЕ.

Обзор модели СВЕ.

В химической мышинной модели СВЕ фармакологическое ингибирование активности G-казы достигается с помощью селективного и необратимого ковалентного конкурентного ингибитора G-казы, что приводит к накоплению гликолипидов (GluCer и GluSph), невропатологическим изменениям, включая астроглиоз и микроглиоз, и дефициту двигательных функций (Manning-Bog et al., Neurotoxicology. 2009;30(6): 1127-32; Farfel-Becker et al., Dis Model Mech. 2011;4(6):746-52; Rocha et al., Antioxid Redox Signal. 2015;23(6):550-64).

СВЕ является фармакологическим ингибитором G-казы, и у мышей, получавших СВЕ, проявляются фенотипы, соответствующие потере функции G-казы. Изменяя дозу СВЕ и, таким образом, степень ингибирования G-казы *in vivo*, можно определить различные степени недостаточности фермента, наблюдаемые при различных нарушениях, ассоциированных с GBA1, тем самым модулируя тяжесть получаемого фенотипа. По этой причине мышьяная модель СВЕ имеет значительные технические преимущества над генетическими моделями дефицита G-казы, что делает ее привлекательной моделью для PD-GBA. Системное снижение активности G-казы в модели СВЕ повторяет болезнь человека, поскольку у пациентов с PD-GBA наблюдается снижение активности G-казы во всех отделах ЦНС и периферических органах. Ожидается, что эта модель будет недооценивать эффекты PR001A, поскольку СВЕ будет ингибировать как эндогенную активность G-казы, так и экзогенную активность G-казы, возникающую в результате введения PR001A.

Исследование PRV-2017-001: исследование диапазона доз СВЕ.

С целью создания СВЕ-модели дефицита G-казы, молодым мышам вводили СВЕ, специфический ингибитор G-казы. Мышам вводили СВЕ путем внутривентрикулярной инъекции ежедневно, начиная со Дня 8 после рождения (P8). Три различных дозы СВЕ (25 мг/кг, 37,5 мг/кг, 50 мг/кг) или ежедневное внутривентрикулярное (IP) введение носителя (PBS) тестировали для создания модели, которая демонстрирует поведенческий фенотип (фиг. 9A-Фиг. 9F). Более высокие дозы СВЕ приводили к летальному исходу в зависимости от дозы. Все мыши, получавшие СВЕ в дозе 50 мг/кг, умерли до P23, а 5 из 8 мышей, получавших СВЕ в дозе 37,5 мг/кг, умерли до P27 (фиг. 9A). У мышей, получавших СВЕ в дозе 25 мг/кг, летальности не наблюдалось. Мыши, получавшие СВЕ, вес не набирали, что коррелировало с дозой СВЕ. В P27, в конце части исследования при жизни мышей, разница в весе была статистически значимой между контрольными животными и животными, получавшими 25 или 37,5 мг/кг СВЕ; ни одна мышь, получавшая 50 мг/кг СВЕ, не выжила до P27 (фиг. 9B, фиг. 9C). В то время как мыши, которым вводили СВЕ, не демонстрировали общих двигательных нарушений в анализе открытого поля (перемещаясь на такое же расстояние и с той же скоростью, что и мыши, получавшие PBS; Фиг. 9F), мыши, получавшие СВЕ, демонстрировали дефицит двигательной координации и баланса, что измеряли с помощью теста на вращающемся барабане (фиг. 9D). Мышей, выживших до конца исследования, умерщвляли на следующий день после получения ими последней дозы СВЕ (P27, "День 1") или через три дня после отмены СВЕ (P29, "День 3"). Анализ липидов выполняли на коре головного мозга мышей, получавших 25 мг/кг СВЕ, для оценки накопления субстратов G-казы в когортах как в День 1, так и в День 3. Уровни GluSph и GalSph (измеренные в совокупности в этом примере) в значительной степени накапливались у мышей, получавших СВЕ, по сравнению с контрольными животными, получавшими PBS, что согласуется с недостаточностью G-казы (фиг. 9E).

Таким образом, ежедневная внутривентрикулярная доза 25 мг/кг СВЕ приводила к дефициту двигательного поведения и накоплению субстратов G-казы (совокупность уровней GluSph и GalSph), что согласуется с ингибированием активности G-казы. Таким образом, доза 25 мг/кг была выбрана для последующих исследований, поскольку она воспроизводит основные особенности заболевания человека, позволяя проводить более длительные исследования для оценки устойчивости вектора. Исследование PRV-2018-002: Эффективность PR001B в модели СВЕ

На основании исследования, описанного выше, была выбрана доза СВЕ 25 мг/кг, поскольку она вызывала поведенческие нарушения, не влияя на выживаемость. Для всех доклинических исследований на мышах в качестве пути введения (ROA) была выбрана интрацеребровентрикулярная (ICV) инъекция. Поскольку инъекция внутрь большой цистерны (ICM) (предполагаемый клинический путь введения) технически трудна для мышей, ICV-инъекция была сочтена наиболее пригодным альтернативным подходом для повторения ICM-доставки терапевтического агента в спинномозговую жидкость (CSF). Для достижения широкого распределения GBA1 в головном мозге и экспрессии трансгена во время введения СВЕ необходимо применять 4 мкл носителя (dPBS+0,001% Pluronic F68, "dPBS"), или $8,8 \times 10^9$ vg ($5,9 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга, исходя из массы головного мозга 150 мг) PR001B доставляли посредством ICV-инъекции в P3, и ежедневную IP-инъекцию PBS или введение СВЕ в дозе 25 мг/кг начинали в P8 (фиг. 10). Чтобы определить, будет ли применение СВЕ полностью маскировать эффект PR001B, половину животных умерщвляли в P36, через 1 день после их последней инъекции СВЕ, в то время другую половину подвергали отмене СВЕ и умерщвляли в P38, через 3 дня после их последней инъекции СВЕ. Для всех показателей, группы были объединены для анализа с поправкой на день сбора в качестве коварианта.

У мышей, получавших СВЕ, наблюдалось снижение прироста массы тела, которое ослаблялось при применении PR001B (фиг. 11A; фиг. 11B). Мыши, получавшие СВЕ, и которым вводили gAAV, продемонстрировали статистически значимо лучшие результаты на вращающемся барабане, чем мыши, которым вводили вспомогательное вещество (фиг. 11C). Мыши в группе, получавшей вариантный вектор, не отличались от мышей, получавших вспомогательное вещество, в контексте показателей, таких как общее расстояние, пройденное во время тестирования (фиг. 11D).

По завершении исследования половину выживших мышей умерщвляли на следующий день после последней дозы СВЕ (P36, "День 1") или по истечению трех дней после отмены СВЕ (P38, "День 3") для

биохимического анализа (фиг. 12В-фиг. 12D). Используя флуориметрический анализ ферментов, проведенный в трех биологических повторностях, активность G-казы оценивали в коре головного мозга. Активность G-казы была повышена у мышей, которым вводили PR001B гAAV, тогда как введение СВЕ снижало активность G-казы (фиг. 12В). Кроме того, мыши, которые получали как СВЕ, так и PR001B гAAV, имели уровни активности G-казы, которые были аналогичны группе, получавшей PBS, что указывает на то, что доставка гAAV способна преодолеть ингибирование активности G-казы, вызванное введением СВЕ. Липидный анализ проводили на моторной коре головного мозга мышей для изучения уровней субстратов GluCer и GluSph. Как липиды, накопленные в мозге мышей, получавших СВЕ, так и введение гAAV значительно снижали накопление GluCer и имели тенденцию к уменьшению накопления GluSph (фиг. 12С; фиг. 12D).

Уровни липидов отрицательно коррелировали как с активностью G-казы, так и с успешным выполнением теста на вращающемся барабане во всех группах лечения. Повышенная активность G-казы после введения гAAV ассоциировалась с уменьшением субстрата и усилением двигательной функции (фиг. 13). Как продемонстрировано на фиг. 14, предварительное биораспределение оценивали по присутствию генома вектора, измеренному с помощью qPCR (>100 геномов вектора на 1 мкг геномной ДНК, определенных как положительные). Мыши, которые получали PR001B гAAV, как с СВЕ, так и без него, были положительными относительно геномов вектора гAAV в коре головного мозга (фиг. 12А), что указывает на то, что ICV доставка приводит к доставке гAAV в кору. Кроме того, геномы вектора были обнаружены в печени, селезенке, сердце и легких с более низкими уровнями в почках и отсутствием в половых железах (фиг. 14). По всем показателям не было статистически значимой разницы между группами День 1 и День 3 (данные не продемонстрированы).

Таким образом, при дозе $8,8 \times 10^9$ vg ($5,9 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), введенной ICV, PR001B распределялся в головном мозге и периферических тканях, а ферментативно активная G-каза экспрессировалась в головном мозге. PR001B снижал биохимические дефициты (т.е. уровни гликолипидов) и улучшал результаты теста на вращающемся барабане. Поскольку отмена СВЕ не была необходимой для того, чтобы увидеть эффекты PR001B, мышей умерщвляли через 1 день после последней дозы СВЕ во всех будущих исследованиях.

Исследование PRV-2018-005: диапазон доз PR001A в модели СВЕ.

Схема, демонстрирующая иллюстративный дизайн исследования диапазона доз, представлена на фиг. 15 А.

В более крупном исследовании модели СВЕ дополнительно изучались эффективные дозы PR001 гAAV в модели СВЕ. Используя модель дозы СВЕ 25 мг/кг, вспомогательное вещество или PR001 гAAV доставляли посредством ICV в P3, а ежедневное IP введение PBS или СВЕ начинали в P8. Учитывая сходство между группами с отменой СВЕ и без отмены СВЕ, наблюдаемое в предыдущих исследованиях, всех мышей умерщвляли через день после последней дозы СВЕ (P38-40). Оценивали эффект трех различных доз гAAV, в результате чего были получены следующие пять групп по 10 мышей (5M/5F) в каждой: Вспомогательное вещество ICV+PBS IP Вспомогательное вещество ICV+25 мг/кг СВЕ IP $2,0 \times 10^9$ vg ($1,3 \times 10^9$ vg/г головного мозга) гAAV ICV+25 мг/кг СВЕ IP $6,2 \times 10^9$ vg ($4,2 \times 10^9$ vg/г головного мозга) гAAV ICV+25 мг/кг СВЕ IP $2,0 \times 10^{10}$ vg ($1,3 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) гAAV ICV+25 мг/кг СВЕ IP.

Животные, получавшие СВЕ, набирали вес с меньшей скоростью, чем контрольные животные, что является типичной характеристикой для этой животной модели. В самой высокой дозе, PR001A корректировал неспособность набрать вес, связанную с введением СВЕ. Кроме того, эта доза приводила к статистически значимому улучшению результатов теста на вращающемся барабане и сужающейся балке по сравнению с группой, получавшей СВЕ, которая не получала PR001A (фиг. 15В-Фиг. 15Е). Активность G-казы головного мозга положительно коррелировала с результатом теста на вращающемся барабане. Летальность наблюдалась в нескольких группах, включая группу, получавшую как вспомогательное вещество, так и группу, получавшую гAAV.

По завершении исследования, всех выживших мышей умерщвляли для характеристики биораспределения и биохимического анализа (фиг. 16А-фиг. 16D). Из исследованных тканей, головной, спинной мозг, печень, селезенка, сердце, почки и легкие были положительными относительно геномов вектора при применении средней и максимальной доз. Головной, спинной мозг, легкие и сердце также были положительными при применении низкой дозы (фиг. 16А). Гонады не были положительными ни при каких дозах. Эффективная активность G-казы оцененная путем измерения ферментативной активности во всех тканях с помощью флуориметрического анализа, снижалась до 60% после введения СВЕ (фиг. 16В). При максимальной дозе PR001A, активность G-казы значительно повышалась в головном, спинном мозге и сердце. Следует обратить внимание, что, поскольку введение ингибирует активность PR001A-кодируемой G-казы в той же степени, что и эндогенной G-казы, примерно на 50%, исследования модели СВЕ, вероятно, недооценивают эффективность PR001A, измеренную с помощью активности G-казы, примерно в 2 раза. У мышей, получавших СВЕ, наблюдалось накопление GluCer и GluSph в коре головного мозга. Высокая доза PR001A уменьшала их накопление (фиг. 16С; фиг. 16D).

Реактивный астроглиоз и активация микроглии являются заметными воспалительными аспектами патологии ЦНС, описанными у пациентов с нейропатическими GD и PD-GBA (Wong et al 2004; Ginns

et al 2014). В этом исследовании у мышей, получавших СВЕ, наблюдались глиальные рубцы, проявление реактивного астроглиоза в коре головного мозга, что согласуется с предыдущими исследованиями, демонстрирующими активацию ЦНС в контексте СВЕ (Sun et al 2011). Введение PR001A приводило к статистически значимому дозозависимому снижению фенотипа глиального рубцевания (фиг. 16E). Таким образом, применение PR001 подавляет невропатологию, ассоциированную с дефицитом G-казы в ЦНС. Полное описание гистопатологических результатов этого исследования обсуждается в разделе токсикологии. Иммуногистохимический анализ выполняли для характеристики экспрессии G-казы и ионизирующей кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1; маркер микроглиоза) в коре (фиг. 16F) (Wong et al 2004; Vitner et al 2016). Экспрессия G-азы значительно повышалась у всех мышей, получавших PR001A, по сравнению с животными, получавшими СВЕ+вспомогательное вещество, и коррелировала с введенной дозой. Интенсивность окрашивания Iba1 было значительно снижалась дозозависимым образом у мышей, получавших PR001A, по сравнению с мышами, получавшими СВЕ+вспомогательное вещество, у которых интенсивность окрашивания Iba1 было значительно повышалась по сравнению с мышами, получавшими PBS. Таким образом, результаты исследования PRV-2018-005 демонстрируют, что ICV-введение PR001A в трех дозах приводило к широкому биораспределению генома вектора, увеличению активности G-казы, улучшению двигательных функций и снижению накопления гликолипидов. Два разных показателя нейровоспаления (микроглиоз и астроглиоз) продемонстрировали дозозависимое статистически значимое снижение у мышей, получавших PR001A. Модель СВЕ по своей природе недооценивает эффективность PR001A, поскольку СВЕ также подавляет активность ферментов из-за введения PR001A. Взятые вместе, эти результаты демонстрируют, что ICV-введение PR001A в дозе $2,0 \times 10^{10}$ vg ($1,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) было эффективным в мышинной модели СВЕ. Тенденция к эффективности наблюдалась при более низких дозах PR001A в подмножестве критериев оценки.

Исследование PRV-2018-007: долгосрочные эффекты PR001A в модели СВЕ.

В этом исследовании оценивалась устойчивость биораспределения числа копий вектора PR001A и стойкость PR001A-опосредованной экспрессии G-казы в мышинной модели СВЕ. Однократную дозу вспомогательного вещества или PR001A доставляли посредством ICV в P3, и ежедневное IP-введение PBS или СВЕ начинали в P8 и продолжали до P183- P185 (фиг. 36). Всех мышей умерщвляли через 1 день после введения последней дозы СВЕ. Летальность не наблюдалась ни в одной группе.

Разовая ICV-доза PR001A у мышей, получавших СВЕ, приводила к наличию копий генома вектора через 6 месяцев после введения дозы (фиг. 37 A) на уровнях, сравнимых с уровнями, наблюдаемыми примерно через 1 месяц после ICV-введения дозы (см. исследование PRV-2018-005). Длительное введение СВЕ привело к снижению уровня активности G-казы; активность G-казы была почти нормализована у мышей, получавших PR001A, что указывает на то, что однократная доза PR001A приводит к устойчивой экспрессии G-казы (фиг. 37B). Шестимесячные мыши, получавшие СВЕ, продемонстрировали выраженное накопление гликолипидных субстратов GluCer и GluSph в коре головного мозга по сравнению с мышами, получавшими СВЕ в течение 1 месяца. Однократное введение PR001A в P3 привело к значительному снижению уровней GluCer и GluSph до уровней, близких к уровням дикого типа (фиг. 37C; фиг. 37D).

Исследование PRV-2018-008: дополнительный диапазон доз PR001A в модели СВЕ.

Это исследование было предназначено для оценки дополнительных доз PR001A для определения минимальной эффективной дозы и изучения более высоких доз на предмет переносимости. Однако из-за неожиданного отклонения дозировки, в этом исследовании были воспроизведены дозы из PRV-2018-005. По дизайну, аналогичному PRV-2018-005 (фиг. 15A), 4 мкл вспомогательного вещества или PR001A доставляли посредством ICV в P3, и ежедневное IP-введение PBS или СВЕ начинали в P8 и продолжали до P51- P53. В отличие от предыдущих исследований, введение СВЕ не приводило к значительному изменению массы тела. Хотя применение СВЕ привело к значительно худшим результатам теста на вращающемся барабане и сужающейся балке, введение PR001A существенно не изменило эти характеристики (фиг. 38A-фиг. 38E).

Из исследованных тканей, головной, спинной мозг, печень, сердце и легкие были положительными на PR001A при всех уровнях доз. Почки также были положительными при средней и максимальной дозах, в то время как селезенка была положительной только при максимальной дозе. Гонады также были исследованы, но не дали положительных результатов при любом уровне дозы (фиг. 39). Активность G-казы оценивали только в отдельных органах. В коре головного мозга низкая и средняя доза PR001A восстанавливала уровни активности G-казы до уровня, эквивалентного уровням PBS+вспомогательное вещество или выше, хотя это явление и не достигало статистической значимости. Высокая доза PR001A имела тенденцию к значительному увеличению активности G-казы по сравнению с уровнями у животных, получавших СВЕ+вспомогательное вещество (фиг. 40).

В соответствии с другими исследованиями в этой модели, мыши, получавшие СВЕ, демонстрировали накопление GluSph и GluCer в головном мозге, которое снижалось при введении PR001A (фиг. 41; фиг. 41B). В способ, зависимый от дозы, все дозы PR001A значительно снижали уровни GluSph, в то время как средняя и высокая дозы значительно снижали уровни GluCer.

Это исследование подтвердило результаты PRV-2018-005, демонстрирующие, что применение PR001A приводит к широкому биораспределению и значительному повышению активности G-казы, что значительно снижает накопление гликолипидного субстрата, вызванное введением СВЕ. Это исследование не воспроизводило поведенческие фенотипы, наблюдаемые при введении PRV-2018-005; однако известно, что эти фенотипы изменчивы и менее стабильные у мышей.

PRV-2018-025: дополнительный диапазон доз PR001A в модели СВЕ.

Учитывая отклонение исследования в PRV-2018-008, было проведено дополнительное исследование в модели СВЕ, чтобы расширить предыдущие исследования диапазона доз. ICV-введение PR001A и внутрибрюшинное введение PBS или СВЕ проводили по тому же протоколу, что и PRV-2018-005. Однако это исследование включало более низкую дозу PR001A для определения минимальной эффективной дозы и более высокую дозу для определения переносимости.

В этом исследовании, введение СВЕ не приводило к потере веса в динамике; однако статистически значимое снижение двигательной активности наблюдалось у животных, получавших СВЕ+вспомогательное вещество, как на вращающемся барабане, так и на суживающейся балке. Применение PR001A в дозе $5,2 \times 10^{10}$ vg значительно улучшило двигательные функции почти до того же уровня, что и у животных, получавших PBS+вспомогательное вещество. Улучшение также наблюдалось у животных, получавших $1,7 \times 10^{10}$ vg PR001A, хотя это явление не достигало статистической значимости (фиг. 42А-фиг. 42D). Кора головного мозга животных, получавших PR001A, была положительной относительно геномов вектора при всех дозах, а применение $5,2 \times 10^{10}$ vg PR001A приводило к значительному увеличению активности G-казы. Применение $1,7 \times 10^{10}$ vg PR001A восстанавливало активность до уровней, близких к уровням дикого типа (фиг. 43А-фиг. 43В), хотя это явление не достигло статистической значимости. В соответствии с другими исследованиями в этой модели, мыши, получавшие СВЕ, демонстрировали накопление GluSph и GluCer в головном мозге, которое достоверно снижалось при введении PR001A в дозах $1,7 \times 10^{10}$ vg или $5,2 \times 10^{10}$ vg (фиг. 44А-фиг. 44В).

Это исследование подтвердило и расширило результаты предыдущих исследований модели СВЕ. Хотя это исследование не полностью воспроизвело поведенческие фенотипы, наблюдаемые в PRV-2018-005, незначительные улучшения были замечены как в тесте на вращающемся барабане, так и на суживающейся балке с дозой $1,7 \times 10^{10}$ vg PR001A, а введение $5,2 \times 10^{10}$ vg PR001A значительно улучшало результаты обоих тестов. Кроме того, лечение любой дозой уменьшало накопление гликолипидного субстрата, что подтверждает результаты других исследований СВЕ.

Краткая характеристика исследований модели СВЕ.

Результаты исследований модели СВЕ демонстрируют, что PR001A может эффективно доставляться в ЦНС, а также в периферические ткани с помощью ICV-инъекции. В пределах ЦНС доставка PR001A посредством ICV приводила к последовательному увеличению активности G-казы, снижению содержания гликолипидных субстратов GluCer и GluSph, уменьшению глиальных рубцов и улучшению некоторых двигательных характеристик. Эти эффекты, если они оценивались, сохранялись через 6 месяцев после лечения.

Пример 8.1.2. Исследования на генетических моделях мышей 4L/PS-NA.

Обзор модели 4L/PS-NA.

Мыши 4L/PS-NA представляют собой хорошо известную генетическую модель GD и PD-GBA (Sun et al., *J Lipid Res.* 2005;46(10):2102-13; Mazzulli et al., *Cell.* 2011;146(1):37-52; Xu et al., *Mol Genet Metab.* 2011;102(4):436-47). Эти мыши являются гомозиготными по мутации V394L в GBA1 и дополнительно несут мутации в PSAP, который кодирует сапозин С, активатор G-казы; присутствие мутантного фермента G-казы и низкие уровни активатора G-казы сапозина С вместе приводят к серьезному снижению активности G-казы, накоплению гликолипидных субстратов, а также к дефициту двигательных функций. Эти мыши демонстрируют дефицит двигательной силы, координации и равновесия, о чем свидетельствуют их результаты теста ходьбы по балке, теста удерживания на вращающемся барабане и теста подвешивания на шнуре. Обычно продолжительность жизни этих мышей составляет менее 22 недель. "Контрольные" мыши в этом исследовании являются гомозиготными по мутации V394L в Gba1, но являются мышами дикого типа по эндогенному гену просапозина, и, таким образом, имеют более умеренное снижение активности G-казы. Следует обратить внимание, что поскольку применение PR001A не влияет на сапозин С, результаты, полученные на мышях 4L/PS-NA, вероятно, занижают прогнозируемый эффект у людей. На этих мышях было проведено два исследования PR001 А.

Исследование PRV-2018-006: PR001A в генетической модели 4L/PS-NA.

В исследовании PRV-2018-006 PR001A или вспомогательное вещество вводили посредством ICV 3-4-недельным мышам 4L/PS-NA, и животных умерщвляли через 15 недель после введения PR001A. Вводили дозу 3 мкл неразбавленного вектора (всего $1,5 \times 10^{10}$ vg; $3,7 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга) (фиг. 45).

У мышей 4L/PS-NA наблюдали прогрессирующий двигательный дефицит, а лечение PR001A привело к незначительному улучшению ходьбы по балке через 5 и 9 недель после лечения. Через 15 недель после лечения между группами статистически значимой разницы не было. Биораспределение геномов вектора PR001A у мышей 4L/PS-NA количественно определяли примерно через 15 недель после введе-

ния дозы. Все исследованные ткани, включая кору головного мозга, спинной мозг, печень, почки, сердце, легкие, селезенку и гонады, были положительными относительно геномов вектора. (фиг. 46). Анализ активности G-казы в лизатах тканей, оцененной с помощью флуорометрического анализа, выявил значительное увеличение эффективной активности G-казы в коре и печени (фиг. 47).

Наблюдалось статистически значимое накопление GluSph и GluCer в лизатах головного мозга мышей 4L/PS-NA по сравнению с лизатами контрольных животных. У мышей 4L/PS-NA применение PR001A приводило к статистически значимому снижению накопления GluSph и тенденции ($P=0,16$) к снижению GluCer (фиг. 48А; фиг. 48В).

Предыдущие исследования продемонстрировали повышенное накопление белка α -синуклеина в коре головного мозга в модели мышей 4L/PS-NA, что согласуется с предполагаемой ролью G-казы в патологии α -синуклеина (Sun et al., J Lipid Res. 2005;46(10):2102-13; Mazzulli et al., Cell. 2011;146(1):37-52; Xu et al., Mol Genet Metab. 2011;102(4):436-47). Биохимически исследовали уровни растворимого и нерастворимого α -синуклеина в коре головного мозга. У мышей 4L/PS-NA, получавших вспомогательное вещество, наблюдалось незначительное увеличение уровня нерастворимого α -синуклеина и соотношения нерастворимого и растворимого α -синуклеина в коре головного мозга; ICV-введение PR001A вызывало обратное развитие этих эффектов ($P=0,19$, $P=0,87$, соответственно) (фиг. 49А; Фиг. 49В). Эти данные согласуются с исследованиями *in vitro*, описанными в Примере 2.1, которые демонстрируют пониженное накопление α -синуклеина.

Двигательные характеристики оценивали с помощью теста ходьбы по балке через 4 недели после введения gAAV. Группа мутантных мышей, которым вводили PR001A gAAV, продемонстрировала тенденцию к меньшему суммарному количеству соскальзываний и меньшему количеству соскальзываний на скорость по сравнению с мутантными мышами, получавшими вспомогательное вещество, восстанавливая двигательную функцию до уровней, близких к дикому типу (фиг. 17). Исследование PRV-2018-011: диапазон доз PR001A в генетической модели 4L/PS-NA.

Во втором исследовании на мышах 4L/PS-NA изучали диапазон доз PR001A с дизайном, аналогичным тому, который применяли в исследовании PRV-2018-006 (фиг. 50).

В тесте на сужающейся балке мыши 4L/PS-NA продемонстрировали значительно худшие результаты, чем контрольные мыши. Мыши 4L/PS-NA, получавшие $2,9 \times 10^{11}$ vg, $9,3 \times 10^{10}$ vg или $2,9 \times 10^{10}$ vg PR001A, продемонстрировали значительное улучшение по сравнению с мышами 4L/PS-NA, получавшими вспомогательное вещество на Неделе 18 (фиг. 51). В более ранние моменты времени эффекта PR001A не наблюдали. Не было разницы в результатах теста на вращающемся барабане между мышами 4L/PS-NA и контрольными мышами, и применение PR001A, по-видимому, не оказывало влияния на этот результат. Все группы, получавшие PR001A, были положительными относительно геномов вектора в коре головного мозга. Эффективная активность G-казы, оцененная с помощью флуорометрического анализа, была измерена в коре головного мозга и, как было обнаружено, значительно повышалась у мышей, получавших $2,9 \times 10^{11}$ vg PR001A (фиг. 52А; фиг. 52В).

Биохимически исследовали гиппокампальные уровни растворимого и нерастворимого α -синуклеина в коре головного мозга. В этих уровнях между мышами 4L/PS-NA и контрольными животными различий не было; опубликованные в литературе данные продемонстрировали переменные фенотипы α -синуклеина. Наблюдалось статистически значимое накопление GluSph и GluCer в мозжечке мышей 4L/PS-NA, получавших вспомогательное вещество. Применение PR001A привело к дозозависимой тенденции к снижению уровней GluSph и статистически значимому дозозависимому снижению GluCer (фиг. 53А; фиг. 53В).

Краткая характеристика генетической модели мыши 4L/PS-NA

Хотя мыши 4L/PS-NA демонстрировали изменчивость в отношении измеренных фенотипов в 2 исследованиях, общие данные соответствовали результатам модели CBE и опубликованным данным: дефицит G-казы был ассоциирован с повышенным уровнем гликолипидных субстратов и двигательными поведенческими нарушениями. ICV-введение PR001A сильно ослабляло эти фенотипы. В исследовании PRV-2018-006 уровни нерастворимого α -синуклеина в коре головного мозга были незначительно повышены у мышей 4L/PS-NA по сравнению с контрольными мышами, как сообщалось в опубликованных исследованиях (Sun et al., J Lipid Res. 2005;46(10):2102-13; Mazzulli et al., Cell. 2011;146(1):37-52; Xu et al., Mol Genet Metab. 2011;102(4):436-47). ICV-введение PR001A обращало вспять такое накопление в соответствии с описанными в настоящем документе анализами *in vitro*. В совокупности эти исследования обосновывают необходимость клинической разработки PR001A.

Пример 8.1.3. Исследования на α -синуклеиновой модели *in vivo*.

Исследование PRV-2018-019 и PRV-2019-001: PR001A на α -синуклеиновых трансгенных мышах, получавших CBE.

Для дальнейшего изучения влияния PR001A на патологию α -синуклеина было проведено 2 исследования на мышах db1-PAC-Tg(SNCAA53T);Snca^{-/-}, которые являются гомозиготными по человеческому PD-ассоциированному мутантному трансгену α -синуклеина A53T на мышах с нокаутом гена Snca (Snca кодирует мышинный белок α -синуклеин). Сообщается, что эти мыши демонстрируют желудочно-

кишечные фенотипы и едва различимые двигательные аномалии в возрасте от 6 до 12 месяцев, но не имеют широко распространенной α -синуклеиновой патологии в головном мозге (Kuo et al., Hum Mol Genet. 2010;19(9):1633-50). Предыдущие исследования на моделях трансгенных мышей с человеческим α -синуклеином A53T продемонстрировали, что введение таким мышам СВЕ приводит к повышенным уровням α -синуклеина (Rockenstein et al., Hum Mol Genet. 2016; 25(13):2645-60; Papadopoulos et al., Hum Mol Genet. 2018;27(10): 1696-1710). На основании этих опубликованных результатов и для подтверждения эффектов дефицита G-казы в этой модели мы вводили этим мышам СВЕ. В возрасте от 9 до 10 недель мышам вводили 10 мкл вспомогательного вещества или $2,9 \times 10^{11}$ vg ($7,4 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга, исходя из массы мозга 400 мг) PR001A посредством ICV-инъекции. Через две недели после ICV-введения, PBS или 100 мг/кг СВЕ вводили IP ежедневно в течение 1 недели.

В коре головного мозга оценивали наличие геномов вектора и активность G-казы. Для PRV-2018-019 было подтверждено увеличение количества кортикальных гликолипидных субстратов при применении СВЕ, и оценивали уровни α -синуклеина в лизатах гиппокампа с помощью автоматизированной системы капиллярного иммуноблоттинга Simple Western™ на приборе Jess. Наблюдались множественные иммунореактивные полосы α -синуклеина, соответствующие присутствию мономеров и высокомолекулярных (HMW) частиц. Статистически значимое снижение отношения HMW-видов α -синуклеина к уровням мономерного α -синуклеина наблюдалось при применении PR001A для трансгенных α -синуклеиновых мышей, которым вводили СВЕ (фиг. 54А; фиг. 54В).

Краткая характеристика доклинических исследований эффективности.

Приведенные выше исследования демонстрируют, что однократная ICV-инъекция PR001A эффективно доставляет GBA1 в ЦНС и периферические ткани мышей. В двух моделях PD-GBA и nGD на животных, PR001A увеличивал активность G-казы в ЦНС. Повышенная активность G-казы снижает накопление гликолипидных субстратов в головном мозге; эти гликолипидные субстраты предлагаются в качестве биомаркерных показателей результатов предполагаемого клинического исследования. Важно отметить, что эти преимущества сохраняются в течение по меньшей мере 6 месяцев после однократного введения PR001A. Модель СВЕ представляет реактивный астроглиоз, а также микроглиоз, которые являются типовыми гистопатологическими находками у пациентов с PD-GBA, nGD, а также в моделях этих заболеваний на животных (Hamby and Sofroniew, Neurotherapeutics. 2010;7(4):494-506; Farfel-Becker et al., Dis. Model Mech. 2011;4(6):746-752; Farfel-Becker et al., Hum Mol Genet. 2011;20(7): 1375-86; Booth et al., Trends Neurosci. 2017;40(6):358-70; McMahon et al., Mol Genet Metab. 2018;123(2):S93). PR001A способен предотвратить или обратить вспять СВЕ-индуцированный реактивный глиоз и микроглиоз. Обе модели демонстрируют двигательную недостаточность, и применении PR001A улучшает течение некоторые из этих проявлений в обеих моделях. Наряду с этими двумя моделями для исследования патологии α -синуклеина использовали дополнительную мышиную модель. В то время как фенотипы α -синуклеина изменчивы в мышинных моделях, PR001A был способен подавлять или вызывать регресс фенотипов, когда они наблюдались; дополнительные исследования *in vitro* подтверждают эффективность PR001A в снижении уровня альфа-синуклеина. Вместе эти исследования подтверждают эффективность PR001A в моделях PD-GBA и nGD.

Пример 8.1.4. Токсикология.

Исследования на мышах с однократной дозой.

Исследования безопасности и токсикологии, проведенные с PR001A на моделях мышей, сведены в Таблицу 15. Два исследования эффективности на модели мыши (PRV-2018-005 и PRV-2018-006) также включали оценки отдельных критериев безопасности, таких как гистопатология, для оценки безопасности PR001A в модели заболевания.

Исследование PRV-2018-005: диапазон доз PR001A в модели СВЕ.

Гистопатологический анализ проводили путем окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) головного мозга, грудного отдела спинного мозга, сердца, печени, селезенки, легких и почек; результаты оценивал сертифицированный ветеринарный патоморфолог. У мышей, получавших СВЕ, изменения в ЦНС включали глиальные рубцы и нейрональный некроз в коре головного мозга, стволе головного мозга и грудном отделе спинного мозга. Интрацеребровентрикулярный PR001A в дозах до $1,3 \times 10^{11}$ vg/г хорошо переносился этими мышами, и эта самая высокая доза привела к заметному снижению частоты таких изменений в ЦНС; низкие и средние дозы PR001A вызывали дозозависимое уменьшение количества животных с глиальными рубцами в коре головного мозга, с неоднозначным влиянием на другие показатели ЦНС, такие как нейрональный некроз. Каких-либо нежелательных эффектов СВЕ или PR001A в периферических тканях не наблюдалось. Таким образом, в исследованиях на мышинной модели СВЕ не было обнаружено нежелательных гистопатологических данных или признаков токсичности в связи с применением PR001A.

Пример 9. Анализ *in vitro* векторов гAAV.

Пилотное исследование выполняли для оценки активности *in vitro* векторов гAAV, кодирующих просапозин (PSAP) и SCARB2, отдельно или в комбинации с GBA1 и/или одной или большим количеством ингибирующих РНК. Также тестировали одну конструкцию, кодирующую PSAP и програнулин

(PGRN). Протестированные векторы включают векторы, приведенные в табл. 3. "Opt" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, оптимизированной по кодону для экспрессии в клетках млекопитающих (например, клетках человека). Фиг. 18 демонстрирует репрезентативные данные, указывающие на то, что трансфекция клеток НЕК293 каждой из конструкций приводила к сверхэкспрессии соответствующего генного продукта по сравнению с ложно трансфицированными клетками.

Таблица 3

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

Пример 10. Размещение последовательности ITR "D" и клеточная трансдукция.

Исследовали влияние размещения последовательности ITR "D" на клеточную трансдукцию векторов гAAV. Клетки НЕК 293 трансдуцировали вирусами гAAV, кодирующими G-казу и имеющими 1) ITR дикого типа (например, последовательности "D" проксимальнее вставки трансгена и дистальнее конца ITR) или 2) ITR с последовательностью "D", расположенной "вне" вектора (например, последовательность "D", расположенная проксимальнее конца ITR и дистальнее вставки трансгена), как продемонстрировано на фиг. 19. Неожиданно было обнаружено, что гAAV, имеющие последовательность "D", расположенную во "внешнем" положении, сохраняют способность эффективно упаковываться и трансдуцировать клетки (фиг. 20).

Пример 11. Исследования токсичности *in vivo*.

Пятьдесят (50) мышей получали гAAV, кодирующие GBA1, посредством интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции 4 мкл в день 3 послеродового периода. Все мыши получали ежедневные внутривентрикулярные (IP) инъекции кондуритола В-эпоксида (СВЕ) или PBS, в зависимости от группы лечения - со дня 8 послеродового периода до конца исследования. Животных умерщвляли через 24 часа после введения последней IP дозы. После эвтаназии ткани-мишени собирали, каплю фиксировали в охлажденном 4% параформальдегиде и хранили при 4°C, а затем отправляли на гистопатологическую обработку и оценку.

Ткани сорока двух (42) животных, умерщвленных через 38-40 дней, обрезали, обрабатывали и заключали в парафиновые блоки. Затем делали срезы размером ~5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и прикрепляли к предметным стеклам для дальнейшей оценки.

Гистопатологических изменений или признаков токсичности в связи с применением гAAV не было.

У мышей, получавших кондуритол В-эпоксид (СВЕ), в центральной нервной системе (ЦНС) были обнаружены глиальные рубцы и нейрональный некроз в коре головного мозга, а также нейрональный некроз в стволе головного мозга и грудном отделе спинного мозга. Применение высоких доз гAAV приводило к заметному снижению частоты этих изменений в ЦНС, в то время как низкие и средние дозы вируса вызывали дозозависимое снижение частоты формирования глиальных рубцов в коре головного мозга с неоднозначным влиянием на другие изменения в ЦНС (фиг. 28).

Иммуногистохимический анализ проводили для оценки экспрессии G-казы и Iba1 в коре головного мозга (фиг. 29A-29B). Экспрессия G-казы была значительно повышена у всех животных, получавших гAAV-GBA1, по сравнению с животными, получавшими СВЕ/вспомогательное вещество. Повышение экспрессии G-казы коррелировало с введенной дозой, при этом самая высокая экспрессия G-казы наблюдалась у животных, получавших высокие дозы, за которыми следовали животные, получавшие средние и низкие дозы. Уровень Iba1, маркера микроглиоза, был значительно повышен у животных, получавших СВЕ/вспомогательное вещество. Все дозы гAAV-GBA1 понижали интенсивность окрашивания Iba1, тем самым уменьшая микроглиоз в модели СВЕ. Микроглиоз является хорошо охарактеризованным критерием оценки при нейропатической GD и в моделях этого заболевания.

Таблица 4

Примеры нейродегенеративных заболеваний

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

Таблица 5

Примеры синуклеинопатий

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

Таблица 6

Примеры таупатий

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

Примеры лизосомальных болезней накопления

Заболевание	Ассоциированные гены
Болезнь Ниманна-Пика	<i>NPC1, NPC2, SMPD1</i>
Болезнь Фабри	<i>GLA</i>
Болезнь Краббе	<i>GALC</i>
Болезнь Гоше	<i>GBA</i>
Болезнь Тея - Сакса	<i>HEXA</i>
Метахроматическая лейкодистрофия	<i>ARSA, PSAP</i>
Болезнь Фарбера	<i>ASAHI</i>
Галактосиалидоз	<i>CTSA</i>
Болезнь Шиндлера	<i>NAGA</i>
Ганглиозидоз GM1	<i>GLB1</i>
Ганглиозидоз GM2	<i>GM2A</i>
Болезнь Сандхоффа	<i>HEXB</i>
Дефицит лизосомной кислой липазы	<i>LIPA</i>
Множественная сульфатазная недостаточность	<i>SUMF1</i>
Мукополисахаридоз I типа	<i>IDUA</i>
Мукополисахаридоз II типа	<i>IDS</i>
Мукополисахаридоз III типа	<i>GNS, HGSNAT, NAGLU, SGSH</i>
Мукополисахаридоз IV типа	<i>GALNS, GLB1</i>
Мукополисахаридоз VI типа	<i>ARSB</i>
Мукополисахаридоз VII типа	<i>GUSB</i>
Мукополисахаридоз IX типа	<i>HYAL1</i>
Муколипидоз II типа	<i>GNPTAB</i>
Муколипидоз III типа альфа/бета	<i>GNPTAB</i>
Муколипидоз III типа гамма	<i>GNPTG</i>
Муколипидоз IV типа	<i>MCOLN1</i>
Нейрональный церонидный липофусциноз	<i>PPT1, TPP1, CLN3, CLN5, CLN6, MFSD8, CLN8, CTSD, DNAJC5, CTSF, ATP13A2, GRN, KCTD7</i>
Альфа-маннозидоз	<i>MAN2B1</i>
Бета-маннозидоз	<i>MANBA</i>
Аспартилглюкозаминурия	<i>AGA</i>
Фукозидоз	<i>FUCA1</i>

Пример 12. Исследования на приматах, не относящихся к человеку, с гAAV, кодирующим G-казу.

Безопасность PR001A (AAV9.CBA.GBA1.A), содержащего кодон-оптимизированную кодирующую последовательность GBA1 человека (SEQ ID NO: 15), оценивали *in vivo* на приматах, не относящихся к человеку (NHP). Дополнительные сведения о компонентах PR001A приведены выше. Головной мозг NHP наиболее похож на мозг человека, а анатомические особенности спинного мозга NHP и объема и потока CSF позволяют выполнять ИСМ инъекции (инъекции внутрь большой цистерны). Из-за анатомического сходства с людьми ожидалось, что исследования на NHP предоставят надежные данные о биораспределении, который будет основой для определения клинической дозы PR001A.

Безопасность и биораспределение PR001A оценивали в трех токсикологических исследованиях на яванских макаках (табл. 8): двух исследованиях, не соответствующих требованиям GLP (надлежащая лабораторная практика) (PRV-2018-015 и PRV-2019-005), и более крупном исследовании 21CFR58, соответствующем требованиям GLP. (PRV-2018-016).

Таблица 8

Обзор доклинических исследований безопасности на NHP с применением PR001A

Номер исследования	Регуляторный надзор	Вид (возраст)	RO A	Доза Группы (vg/г головного мозга)	Всего PR001 A Доза (vg)	Некропсия Время моменты	Критерии оценки
PRV-2018-015	He-GLP	Яванский макак (2-3 года)	ICM ICM + IPa	0 $2,0 \times 10^{11}$ $2,1 \times 10^{11}$	0 $1,47 \times 10^{13}$ $1,53 \times 10^{13}$	D18	Безопасность при жизни; Биораспределение; Гистопатология
PRV-2018-016	GLP	Яванский макак (2-4 года)	ICM	0 $6,2 \times 10^{10}$ $2,3 \times 10^{11}$	0 $4,6 \times 10^{12}$ $1,7 \times 10^{13}$	D7, D30, D183	Безопасность при жизни; Биораспределение; Гистопатология; CBC; Шеддинг вектора
PRV-2019-005	He-GLP	Яванский макак (2-3 года)	ICM	0 $7,0 \times 10^{11}$	0 $5,2 \times 10^{13}$	D30, D90	Безопасность при жизни; Биораспределение; Гистопатология

Сокращения: CBC - общий анализ крови;
D - день; GLP - Надлежащая лабораторная практика;
ICM - внутрь большой цистерны;
IPa - интрапаренхимальный;
NHP - примат, не относящийся к человеку;
POA - способ введения; vg - геном вектора

Пилотное не-GLP исследование (PRV-2018-015) было проведено на NHP для подтверждения того, что конечный продукт PR001A доставляется в мозг NHP после ICM-введения. В исследовании GLP токсикологии и биораспределения на NHP (PRV-2018-016) оценивали безопасность и биораспределение PR001A.

Дозы, протестированные на NHP, включают максимально возможную дозу, определяемую введенным объемом и титром исследуемого продукта. Кроме того, в исследовании GLP также оценивалась более низкая доза. Моменты времени исследования GLP были выбраны для оценки безопасности после лечения, но до пика экспрессии (День 7), начала пика экспрессии (День 30) и после пика долговременной экспрессии (День 183).

Исследование PRV-2018-015: He-GLP NHP исследование PR001A.

Пилотное не-GLP исследование переносимости и биораспределения PR001A проводили на самцах яванских макаков. Целью этого исследования было верифицировать биораспределение PR001A в различных областях мозга и основных периферических органах после ICM-введения. Выбор момента времени для умерщвления выбирали, на основании прогнозирования и таким образом, чтобы учесть значимые измерения потенциальной ранней токсичности для информирования запланированного GLP NHP токсикологического исследования, особенно с ранними наблюдениями в течение жизни, измеренными посредством набора функциональных тестов (FOB). Исследования интратекальной доставки AAV продемонстрировали, что экспрессия трансгена достигает пика через 2-3 недели после инъекции. (Hinderer et al., Mol Ther. 2014;22(12):2018-27; Hinderer et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2014;1:14051; Hinderer et al., Mol Ther. 2015;23(8):1298-307; Hinderer et al., Mol Genet Metab. 2016;119(1-2): 124-30). Таким образом, оценки на День 18 должны выявить немедленную токсичность, вызванную процедурой инъекции или врожденной воспалительной реакцией на исследуемый препарат, а также предоставить информацию о биораспределении и экспрессии трансгена в момент времени, соответствующий раннему пику экспрессии. Дизайн исследования включал группу лечения рапамицином (0,3 мг/кг перорально, от Дня -3 до Дня

18) в комбинации с PR001A для определения того, будет ли иммуносупрессия полезной для снижения потенциальной токсичности. Чтобы повысить экспрессию трансгена в головном мозге, одна группа в исследовании включала интрапаренхимальное (IPa) введение PR001A непосредственно в средний мозг, нацеленное на билатеральную компактную часть черной субстанции, в комбинации с ICM-доставкой. Объем дозы ICM составлял 0,5 мл, максимальный объем, который когда-либо раньше вводился, и при этом доза IPa была билатеральной 10 мкл, соответствующей дозам $1,47 \times 10^{13}$ vg только при ICM-введении и $1,53 \times 10^{13}$ vg при введении как ICM, так и IPa. При предполагаемой массе мозга 74 г, это соответствует ICM дозе $2,0 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга и дозе $2,1 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга для группы, получившей ICM-введение в комбинации с IPa. Сводные данные дизайна этого исследования представлены в табл. 9.

Таблица 9

Обзор не-GLP исследования PRV-2018-015 у NHP

Исследование биораспределения и безопасности после введения PR001A для NHP					
Цель	Оценка переносимости и биораспределения PR001A у NHP				
Соответствие регуляторным требованиям	He-GLP				
Исследуемый препарат	PR001A				
Общее количество животных	8 самцов яванских макак				
Вес (возраст)	3-4 кг (2-3 года)				
Количество животных/группа	2/группа				
Дизайн исследования	Назначения группам:				
	Группа	Доза (vg/г головного мозга)	ROA	Иммуносупп.	Количество животных
	1	0	ICM	Нет	2
	2	$2,0 \times 10^{11}$	ICM	Нет	2
	3	$2,0 \times 10^{11}$	ICM	Да	2
4	$2,1 \times 10^{11}$	ICM + IPa	Нет	2	
Способ и частота введения	Для ICM-введения применяли шприц; однократную инъекцию 0,5 мл IPa выполняли с помощью шприца Гамильтона; двусторонняя инъекция по 10 мкл в каждое полушарие				
Составы	Раствор для введения предоставляется в концентрации $2,9 \times 10^{13}$ vg/мл; вспомогательное вещество, применяемое в контрольной группе, представляет собой состав, аналогичный тому, который предназначен для клинического применения (20 мМ Трис, pH 8,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ MgCl ₂ и 0,001% [мас./об.] полоксамера 188)				
FOB	Еженедельно				
Вес тела	Еженедельно				
Некропсия	День 18				
N&E и qPCR	У всех животных во всех группах исследовали следующие ткани:				
	печень	лобная кора	паравентрикулярные ядра		
	легкое	теменной кора	мост		
	почка	затылочная кора	энторинальная кора		
	гонады	островковая кора	медуллярное вещество		
	сердце	поясная извилина			
	вещество				

	селезенка	гиппокамп	мозжечок	ганглии
	задних корешков	скорлупа	средний мозг	
			шейный	отдел
	спинного мозга			
	Для Н&Е-окрашивания среднего мозга предусмотрено по меньшей мере 12 срезов, которые включают 6 срезов вокруг места инфузии в группе Ра; группы только с ICM-введением (1-3) включают те же анатомические уровни			

Сокращения: FOB - набор функциональных тестов;

GLP - Надлежащая лабораторная практика;

Н&Е - гематоксилин и эозин;

ICM - внутрь большой цистерны;

Иммуносупресс. - иммуносупрессивный;

Ра - интрапаренхимальный;

MgCl₂ - хлорид магния; NaCl - хлорид натрия;

NHP - примат, не относящийся к человеку;

qPCR - количественная полимеразная цепная реакция;

ROA - способ введения;

vg - геном(ы) вектора

Анализ Н&Е был проведен двумя независимыми сертифицированными ветеринарными патоморфологами, и оба пришли к выводу, что токсичность, связанная с PR001A, не обнаружена. Наблюдаемые изменения спинного мозга, вероятно, были результатом повреждения во время инъекции ICM и не считались связанными с PR001A. Все гистопатологические изменения в тканях не нервной системы считались спонтанными или случайными изменениями, обычно наблюдаемыми у контрольных обезьян. В целом, не было явных нежелательных эффектов PR001A в головном или спинном мозге. Патоморфолог, осуществляющий анализ, отметил, что неспецифические изменения (преимущественно вариабельные инфильтраты мононуклеарных клеток) в мозговых оболочках, паренхиме головного или спинного мозга и/или в месте инъекции (в этих тканях), вероятно, были связаны с исследуемым препаратом, и не расценил эти изменения как неблагоприятные. При отмеченной степени тяжести аналогичные инфильтраты можно было бы разумно ожидать у любой обезьяны, подвергавшейся экспериментальной процедуре, которая разрушает мозговые оболочки и/или гематоэнцефалический барьер. Кроме того, некоторые инфильтраты (особенно внутри сосудистого сплетения и иногда в паренхиме) обычно наблюдаются у контрольных обезьян (Butt et al., Toxicol Pathol. 2015;43:513-8). Все другие наблюдаемые гистопатологические изменения считались случайными и/или имели сходную частоту и тяжесть у животных, получавших вспомогательное вещество и PR001A, и, следовательно, были расценены как не связанные с введением PR001A. Второй независимый сертифицированный ветеринарный патоморфолог, изучавший те же образцы тканей, отметил, что все изменения неотличимы от случайных изменений или повреждений, полученных во время процедуры инъекции, поскольку эти изменения были неспецифическими и по всем группам, включая контрольную группу, получавшую только вспомогательное вещество. Кроме того, другой сертифицированный ветеринарный патоморфолог изучил не-GLP ткани и пришел к выводу, что эффекты, связанные с PR001A, отсутствуют.

В целом, не было изменений в оценках FOB, приросте массы тела или потреблении пищи в ходе исследования, независимо от группы и по моментам времени. Морфология микроглии в среднем мозге, по-видимому, не различалась в разных группах лечения (что определено с помощью окрашивания Iba1).

Экспрессия и морфология положительных по тирозингидроксилазе нейронов среднего мозга, по-видимому, не различались в разных группах лечения. Ко Дню 18 титры AAV9-nAb были увеличены у всех животных, получавших PR001A, в то время как контрольные животные, получавшие вспомогательное вещество, продемонстрировали лишь умеренные изменения по сравнению с исходным уровнем. Одна из обезьян в группе, получавшей рапамицин перорально, имела более низкий титр nAb AAV9 (1:64) на День 18 по сравнению с другими животными, получавшими PR001A (>1:256); разница в титрах не повлияла на биораспределение, но размер выборки был слишком мал, чтобы сделать окончательный вывод. Биораспределение оценивали во всех тестовых образцах, собранных с помощью количественной полимеразной цепной реакции (qPCR); ткани считались положительными по меньшей мере с 100 vg/мкг ДНК (эти критерии также использовались для оценки положительных тканей в исследованиях эффективности на мышах). Все протестированные ткани были положительными во всех группах, получавших PR001A, что указывает на широкое распространение препарата в ЦНС и на периферии. Кроме того, животные, которым вводили PR001A посредством ICM в комбинации с билатеральным Ра-введением в средний мозг, имели повышенную локализованную экспрессию. Применение рапамицина, по-видимому, не оказывало никакого эффекта на безопасность или биораспределение (избранные репрезентативные

области приведены на фиг. 30). Следует отметить, что некоторые ткани контрольных животных (мост, спинной мозг, паравентрикулярные ганглии, ганглии задних корешков и легкие) также были положительными, что определено с помощью qPCR. Было отмечено несколько проблем, связанных с процедурами некропсии, которые указали на повышенный риск перекрестной контаминации животных в разных группах лечения и между разными органами в организме каждого животного. В процедуру некропсии были внесены изменения, чтобы свести к минимуму контаминацию для будущих исследований. Однако не было обнаружено неблагоприятных токсических эффектов ни у одного из животных, положительных при qPCR. Анализ экспрессии трансгена (активность G-казы) продемонстрировал отсутствие значительного увеличения активности G-казы у животных, получавших PR001A, по сравнению с контролем; более подробно активность G-казы изучена в GLP NHP исследовании токсичности PRV-2018-016.

Взяты вместе, результаты не-GLP NHP исследования PRV-2018-015 продемонстрировал отсутствие проблем с безопасностью или токсичностью при проведении каких-либо оценок при жизни или после смерти. Все животные выжили до запланированной даты некропсии, и патологоанатомический анализ не выявил опасений по поводу неблагоприятной токсичности. Исследование также продемонстрировало равномерное биораспределение PR001A в головном мозге.

Исследование PRV-2018-016: GLP NHP исследование PR001A.

Дизайн исследования.

Целью этого GLP исследования была оценка токсичности и биораспределения PR001A при однократном введении посредством инъекции ICM обезьянам яванского макака с 7-30-дневным или 183-дневным периодом наблюдения после введения. Исследование было разработано для оценки 2 уровней доз: самая высокая доза - это максимально возможная доза, достижимая при объеме 1,2 мл (самый высокий объем, который имел место при введении) неразбавленного тестируемого продукта, и более низкая доза на $1/2$ логарифмической единицы ниже, чем высокая доза. Дозы соответствовали низкой дозе $4,6 \times 10^{12}$ vg и высокой дозе $1,7 \times 10^{13}$ vg; с оценкой веса мозга в 74 г у яванского макака, это соответствует примерно $6,2 \times 10^{10}$ vg /г головного мозга и $2,3 \times 10^{11}$ vg /г головного мозга. Исследование также включало контрольную группу, в которой животные получали только 1,2 мл вспомогательного вещества (20 mM Трис pH 8,0, 200 mM NaCl и 1 mM MgCl₂ и 0,001% [мас./об.] Полоксамер 188). В этом исследовании использовались как самцы, так и самки яванского макака. Группа День 7 включала 1 самца, получавшего самую высокую дозу, и была спроектирована как сентинельная для исследования ранней токсичности; а оставшиеся 2 момента времени (День 30 и День 183) включали 2 самца и 1 самку с каждой дозой. Помимо образцов из нескольких областей головного мозга, для анализа qPCR собирали образцы периферической ткани. Все образцы, положительные при qPCR, анализировали на предмет экспрессии трансгена. Сводные данные дизайна этого исследования представлены в табл. 10.

Обзор GLP исследования PRV-2018-016 у NHP

Исследование токсичности и биораспределения однократной дозы при внутрицистернальном введении на яванских макаках с 7-дневным, 30-дневным или 183-дневным периодом наблюдения					
Цель	Оценка переносимости и биораспределения PR001A у NHP				
Соответствие регуляторным требованиям	GLP				
Исследуемый препарат	PR001A				
Общее количество животных	19 обезьян яванских макак				
Вес (возраст)	2-5 кг (25-50 месяцев)				
Дизайн исследования	Назначения группам:				
	Группа	Доза (vg/г головного мозга)	Количество животных		
			Некропсия (День 7)	Некропсия (День 30)	Некропсия (День 183)
	1	0	0	2M/1F	2M/1F
2	$6,2 \times 10^{10}$	0	2M/1F	2M/1F	
3	$2,3 \times 10^{11}$	в/м	2M/1F	2M/1F	
Способ и частота введения	ИСМ-введение с помощью шприца; 1-3 куб. см. и иглы для спинномозговой пункции (Pencan 25 G x 2,5 см BВгаun); однократный медленный болюс вводят с максимальной скоростью 0,5 куб. см/мин.				
Составы	Вводимый раствор предоставляется с концентрацией $1,42 \times 10^{13}$ vg/мл.				
Клинические признаки	Ежедневно (включая потребление пищи); тщательные наблюдения еженедельно				
Вес тела	Еженедельно				
Неврологическое, офтальмологическое обследование и электрокардиограмма	Один раз перед введением дозы и в течение Недель 2 и 26.				
Клиническая патология	Все группы гематологии, клинической химии, параметров свертывания				
Гематология	количество эритроцитов		средний корпускул. объем		

	гемоглобин гематокрит средний корпускулярный гемоглобулин средний корпускул. концентрация гемоглобина крови	количество тромбоцитов количество лейкоцитов гемоглобинмазок крови абс. кол-во лимфоцитов кол-во лейкоцитов дифференциальное кол-во клеток
Клиническая биохимия	глюкоза азот мочевины креатинин общий белок альбумин глобулин соотношение альбумин/глобулин холестерин общий билирубин креатинкиназа	аланинаминотрансфераза щелочная фосфатаза гамма-глутамилтрансфераза аспартатаминотрансфераза кальций неорганический фосфор натрий калий хлорид триглицериды
Коагуляция	протромбиновое время фибриноген активированное частичное тромбопластиновое время	
Шеддинг вектора (моча/кал)	При умерщвлении	
Некропсия	День 7, День 30, День 183	
Сохранение тканей для гистопатологического анализа	Следующие ткани от каждого животного будут собраны в 10% формалине с нейтральным буфером (если не указано иное) или зарегистрированы как отсутствующие, если применимо:	
Гистопатология	Все группы – все ткани	
Биораспределение	Следующие ткани будут проанализированы на биораспределение методом qPCR: Лобная кора Печень Гиппокамп DRG (шейный отдел) Вентральный средний мозг DRG (грудной отдел) Перивентрикулярное серое вещество DRG (поясничный отдел) Путамен Спинной мозг (грудной отдел) Яички Спинной мозг (поясничный отдел) Яичник Спинной мозг (шейный отдел) Почка Селезенка Желудок (пилорический отдел) Сердце (верхушка) Кровь CSF	

Экспрессия Gказы	Все образцы, положительные при qPCR, будут оцениваться на предмет экспрессии програнулина.		
Сохранение тканей	Надпочечник ^a	Место инъекции	Прямая кишка
	Аорта	(покрывающая кожа)	Слюнная желез
	Кость, бедренная кость с костным мозгом	Тощая кишка	Седалищный нерв
	пузырьки ^a	Почка ^a	Семенные
	с костным мозгом	Печень ^a	Спинной мозг
	Головной мозг ^a	Легкое с крупными бронхами	(шейный, грудной, поясничный)
	слепая кишка	Лимфатический узел	Селезенка ^a
	Шейка матки	(нижнечелюстной)	Желудок
	Толстая кишка	Лимфатический узел	Яички ^a
	Двенадцатип. кишка	(брыжесчны)	Тимус ^a
	Придатокяичка ^a	Молочная железа	Щитовидная железа
	Пищевод		с
	Глаз ^b	Мышца, бицепс	паразитовидными железами ^a
	Желчный пузырь	бедр	Язык
	GALT (Пейерова бляшка)	Зрительный нерв	Трахея
	Сердце ^a	Яичник ^a	Мочевой пузырь
	Подвздошная кишка	Маточная труба	Матка ^a
		Поджелудочная железа	Влагалище
		Гипофиз	
		Предстательная железа ^a	
	^a Органы (при их наличии) будут взвешены или отмечены как отсутствующие;		
	^b Собраны в модифицированном фиксаторе Дэвидсона и хранятся в 10% нейтральном забуференном формалине.		

Сокращения: CSF - спинномозговая жидкость;

DRG - ганглии задних корешков;

F - самка;

GALT - лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником;

GLP - Надлежащая лабораторная практика;

ICM - внутри большой цистерны;

M - самец;

MgCl₂ - хлорид магния;

NaCl - хлорид натрия;

NHP - примат, не относящийся к человеку;

qPCR - количественная полимеразная цепная реакция;

vg - геном(ы) вектора

20 mM Трис pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ и 0,001% (мас./об.) полоксамера 188

Яванские макаки NHP оценивались в ходе нескольких наблюдений и измерений в течение жизни, включая смертность/заболеваемость (ежедневно), клинические наблюдения (ежедневно), массу тела (исходный уровень и еженедельно после этого), визуальный осмотр потребления пищи (ежедневно), неврологические наблюдения (исходный уровень и на Неделях 2 и 26), непрямую офтальмоскопию (исходный уровень и на Неделях 2 и 26) и электрокардиографию (исходный уровень и на Неделях 2 и 26).

Анализ nAb к капсиду AAV9 проводили на исходном уровне и при умерщвлении в Дни 7, 30 или 183.

Клинические анализы, включающие гематологию, коагуляцию, клиническую биохимию и общий анализ мочи, выполняли дважды на исходном уровне (анализы крови; один раз - анализа мочи) и один раз на Неделях 1 и 13 этапа введения дозы.

Животных умерщвляли и собирали ткани в Дни 7, 30 или 183. Ткани собирали у всех животных, взвешивали (если применимо) и разделяли на репликаты. Один репликат сохраняли в 10% формалине с нейтральным буфером (за исключением случаев, когда для оптимальной фиксации требуются специаль-

ные фиксаторы) для гистопатологической оценки (все животные). Дополнительные репликаты собирали для qPCR и анализа экспрессии трансгена.

Безопасность и токсикология.

Все животные дожили до запланированной даты некропии без неожиданной смерти. Ни в одной из групп не было опасений или проблем с оценками при жизни; макроскопическое исследование при некропии не выявило аномалий, связанных с PR001A, ни в одной из групп.

Никаких различий в массе органов, связанных с PR001A, или макроскопических или микроскопических изменений не было обнаружено ни в одной из групп при промежуточных умерщвлениях в День 7 или 30 или при терминальном умерщвлении в День 183. Кровоизлияние, характеризующееся очагами периваскулярного кровоизлияния, главным образом в области ствола головного мозга, присутствовало во всех группах, включая контрольную, и, следовательно, считалось связанным с процедурой (сбор CSF перед некропсией) и не связанным с PR001A. Все другие микроскопические изменения, включая минимальные мононуклеарные инфильтраты в головном или спинном мозге, считались спонтанными и/или случайными, потому что они имели место с низкой частотой, случайным образом распределялись по группам (включая параллельный контроль) и/или их тяжесть была такой, как ожидалось для обезьян этого возраста; следовательно, они считались не связанными с PR001A.

Никаких изменений, связанных с PR001 A, в результатах клинических лабораторных диагностических тестов не наблюдалось; повышенный уровень фибриногена отмечался у животного, демонстрирующего наивысший титр анти-AAV9, соответствующий иммунному ответу против вектора. Положительные титры антител анти-AAV9 наблюдались ко Дню 7 у всех животных, которым вводили PR001A. Не было отмечено никаких клинических изменений, связанных с PR001A, изменений массы тела, офтальмологических аномалий или патологических результатов физикального или неврологического обследования. Никаких связанных с PR001A различий в среднем интервале PR, продолжительности QRS, интервале QT, скорректированном интервале QT (QTc) или частоте сердечных сокращений не наблюдалось у самцов или особей смешанных полов, которым вводили любую дозу PR001A. Также не наблюдалось аритмий или аномальных форм волны, связанных с PR001A.

Уровни доз 0, $6,2 \times 10^{10}$ или $2,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга PR001A хорошо переносились при введении путем однократной инъекции в большую цистерну самцам и самкам обезьян. Никаких изменений при жизни, аномальных результатов клинических лабораторных тестов или патологоанатомических данных, которые считались бы связанными с продуктом гена при введении PR001A, не наблюдалось.

Биораспределение и иммунный ответ.

Анализ биораспределения копий генома вектора выполняли с помощью анализа на основе qPCR (наличие вектора); экспрессию трансгена (GBA1) измеряли в образцах, которые были положительными на наличие генома вектора. В Дни 30 и 183 все исследованные ткани (включая ЦНС и периферические) были положительными по результатам анализа qPCR после введения высокой дозы ($2,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга) (выбранные репрезентативные области со Дня 183 приведены на фиг. 30). В День 30 день ткани, взятые из яичек и яичников, были положительными на трансдукцию во всех NHP, получавших высокую дозу PR001A ($2,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга). Кроме того, 1 самец NHP, получавший низкую дозу PR001A ($6,2 \times 10^{10}$ vg/г головного мозга), был положительным на трансдукцию в яичках в День 30. В День 183 1 самец и 1 самка были положительными на трансдукцию PR001A в гонадах после введения им высокой дозы, а 2 самца, получавших низкую дозу, были положительными в яичках.

Для подтверждения того, что G-каза человека продуцировался в организме пролеченных NHP, уровни белка оценивали с помощью системы иммуноблоттинга Simple Western™ на приборе Jess. Результаты анализа образцов коры головного мозга, гиппокампа и среднего мозга, полученных от NHP, которым вводили PR001 A, продемонстрировали повышенные уровни экспрессии G-казы при анализе в совокупности по сравнению с образцами от нормальных NHP, которые получали только вспомогательное вещество; группы как с низкой, так и с высокой дозой были объединены для статистического сравнения с контрольной группой (фиг. 31A и Фиг. 31B). Эти результаты указывают на то, что эффективная и широко распространенная трансдукция PR001A в NHP после ICM введения приводит к повышенным уровням экспрессии G-казы. В заключение следует отметить, результаты биораспределения демонстрируют, что введение PR001A в организм NHP посредством ICM приводит к устойчивой и широко распространенной трансдукции трансгена GBA1 человека в головном мозге и периферических органах. Обобщая данные по биораспределению в организме NHP, введение PR001A с помощью ICM приводит к широкому биораспределению по всему мозгу, сравнимому с уровнями, которые, как было продемонстрировано, являются эффективными на моделях мышей; эта трансдукция приводит к повышению уровня белка G-казы в головном мозге. Исследование PRV-2019-005: Не-GLP NHP исследование PR001A

Дизайн исследования.

Для оценки токсичности и биораспределения PR001A при однократном введении посредством ICM-инъекции с 30- и 90-дневным периодом наблюдения после введения было проведено не-GLP исследование на 12 самцах яванского макака. Исследование было разработано для оценки уровня однократной дозы: $5,2 \times 10^{13}$ vg или $7,0 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга, исходя из предположения, что средний вес мозга у

яванских макак составляет 74 г. Вводимая доза представляет собой максимально возможную дозу, достижимую при объеме 1,2 мл (самый высокий объем, который имел место при введении) неразбавленного продукта PR001A. Исследование также включало контрольную группу, в которой животные получали только 1,2 мл вспомогательного вещества (20 мМ Трис pH 8,0, 200 мМ NaCl и 1 мМ MgCl₂-и 0,001% [мас./об.] плуроник F68). Образцы из нескольких областей мозга и периферических органов собирали для анализа qPCR для измерения биораспределения, а для оценки безопасности выполняли клинические лабораторные тесты и гистопатологическое исследование. Сводные данные дизайна этого исследования представлены в табл. 11.

Таблица 11

Обзор не-GLP исследования PRV-2019-005 у NHP

Не-GLP исследование токсикологии и биораспределения, после введения PR001A в большую цистерну у приматов, не относящихся к человеку				
Цель	Оценка переносимости и биораспределения PR001A у NHP			
Соответствие регуляторным требованиям	Не-GLP			
Исследуемый препарат	PR001A			
Общее количество животных	12 обезьян яванских макак			
Вес (возраст)	2-4 кг (2-3 года)			
Дизайн исследования	Назначения группам:			
	Группа	Доза (vg/г головного мозга)	Количество животных	
			День 30	День 90
	1	0	3	3
2	7,0 x 10 ¹¹	3	3	
Способ и частота введения	внутри большой цистерны; один медленный болюс вводят более 3 минут			
Составы	Вводимый раствор предоставляется с концентрацией 4,3 x 10 ¹³ vg/мл.			
Клинические признаки	Ежедневно (включая потребление пищи)			
Вес тела	Ежедневно			
FOB	День -14, 7, 30, 60, 90			
Клинические лабораторные тесты (химия и гематология)	День -14, 7, 30, 60, 90			
Гематология	количество эритроцитов	средний корпускул. объем		
	гемоглобин	количество тромбоцитов		
	гематокрит	количество лейкоцитов		
	средний корпускулярный кол-во	гемоглобинмазок крови		
	средний корпуск.	ретикулоцитов		
	крови	дифференциальное кол-во клеток		
	концентрация гемоглобин			
Клиническая биохимия	глюкоза	щелочная аланинаминотрансфераза		
	азот мочевины	фосфатаза		
	креатинин	гамма-глутамилтрансфераза		
	общий белок	аспартатаминотрансфераза		
	альбумин	кальций		
	глобулин	неорганический фосфор		
	соотношение альбумин/глобулин натрий			
	холестерин	калий		
	общий билирубин	хлорид		

	триглицериды
Некропсия	День 30 и День 90
Сохранение тканей	У всех животных во всех группах исследовали следующие ткани: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>лобная кора</p> <p>гиппокамп</p> <p>вентральный средний мозг</p> <p>перивентрикулярное ядро</p> <p>путамен желудка</p> <p>ганглии задних корешков (шейный отдел)</p> <p>ганглии задних корешков (грудной отдел)</p> <p>ганглии задних корешков (поясничный отдел)</p> <p>CSF (поясничный отдел)</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>печень</p> <p>почка</p> <p>сердце (верхушка)</p> <p>селезенка</p> <p>(пилорический отдел)</p> <p>яички</p> <p>спинной мозг (шейный отдел)</p> <p>спинной мозг (грудной отдел)</p> <p>спинной мозг</p> </div> </div>
Гистопатология	Образцы из приведенного выше перечня тканей будут сохранены и залиты парафиновым воском для гистологического исследования H&E.
Биораспределение	Ткани из приведенного выше перечня будут собраны и сохранены. Образцы от всех животных будут проанализированы на биораспределение с помощью количественной ПЦР (qPCR).

Сокращения: CSF - спинномозговая жидкость;
 FOB - набор функциональных тестов;
 GLP - Надлежащая лабораторная практика;
 H&E - гематоксилин и эозин;
 NHP - примат, не относящийся к человеку;
 qPCR - количественная полимеразная цепная реакция;
 vg - геном(ы) вектора

В рамках этого исследования ткани фиксировали в 10% формалине, заливали парафином и обрабатывали для получения препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. Цифровые препараты были подготовлены и проанализированы независимым сертифицированным ветеринарным патоморфологом. Как через 30, так и через 90 дней после введения не было обнаружено никаких изменений, связанных с PR001A, поскольку полученные результаты обследования животных, получавших PR001A, либо соответствовали тем, которые обычно наблюдались у яванского макака (Chamanza et al., *Toxicol Pathol.* 2010;38(4):642-57), и/или наблюдались как у контрольных животных, получавших вспомогательное вещество, так и у животных, получавших PR001 A, и, следовательно, считались случайными.

Не отмечалось какого-либо эффекта PR001A, введенного в большую цистерну, на прибавку в весе или потребление пищи, поскольку не было статистической разницы между экспериментальной и контрольной группами в ходе исследования. Кроме того, не было изменений в оценках FOB независимо от группы и по моментам времени, что указывает на отсутствие проблем или опасений в ходе прижизненной фазы исследования. Уровни nAb против AAV9 в плазме измеряли с помощью анализа *in vitro*. Образцы получали от животных, участвовавших в исследовании, на исходном уровне (до ICM-введения) и во время умерщвления (в День 30 или в День 90). Применение PR001A приводило к повышению титров AAV9 nAb между исходным уровнем и временем некропсии как в День 30, так и в День 90, в то время как титры животных, получавших носитель, в целом оставались стабильными или снижались.

Биораспределение и экспрессия PR001A.

Биораспределение трансгена PR001A оценивали во всех тестовых образцах, собранных с помощью qPCR; ткани считались положительными при содержании ДНК не менее 50 мкг/мкг, что является нижним пределом количественного определения для анализа. Все протестированные ткани были положительными во всех группах, получавших PR001A, что указывает на широкое распространение препарата в ЦНС и на периферии. Данные из выбранных репрезентативных областей для когорт как в День 30, так и в День 90 приведены на фиг. 32.

Взятые вместе, результаты не-GLP NHP исследования PRV-2019-005 продемонстрировал отсутствие проблем с безопасностью или токсичностью при проведении каких-либо оценок при жизни или после смерти. Все животные выжили до запланированной даты некропсии, и посмертный патологоанато-

мический анализ не выявил опасений по поводу неблагоприятной токсичности.

Исследования безопасности и токсикологии, проведенные с PR001A в организме NHP, сведены в табл. 16.

Пример 13. Исследования фазы 1/2 на людях.

Болезнь Паркинсона с мутацией GBA1.

Субъекты-люди будут включены в рандомизированное двойное слепое исследование PR001A гAAV, контролируемое фиктивной процедурой. Критерии включения субъекта включают: одиночные или дуаллельные мутации GBA1, болезнь Паркинсона от умеренной до тяжелой степени, а также стабильное применение фоновых лекарственных средств от болезни Паркинсона до введения исследуемого препарата. Субъекты будут разделены на две группы: (1) PR001 в низкой дозе (1×10^{14} vg) по сравнению с плацебо (n=8, 6:2); и (2) PR001 в высокой дозе (2×10^{14} vg) по сравнению с Плацебо (n=8, 6:2). Каждый субъект получит исследуемый препарат посредством однократной инъекции ICM (внутри большой цистерны). Исследование будет включать 3-месячный мониторинг биомаркеров, 12-месячный клинический мониторинг, а также 5-летнее последующее наблюдение за безопасностью и клиническое наблюдение. В ходе исследования будут проанализированы: (1) безопасность и переносимость; (2) ключевые биомаркеры, включая: G-казу, GluCer и GluSph (CSF и кровь); (3) дополнительные биомаркеры, включая: α -синуклеин, NfL (легкие белки нейрофиламентов), DAT (переносчик дофамина), SPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография); и MPT (магнитно-резонансная томография); и (4) эффективность: MDS-UPDRS (унифицированная шкала оценки болезни Паркинсона Международного общества изучения двигательных расстройств); познание; а также ADL (повседневная деятельность).

Болезнь Гоше 2 типа.

Субъекты-люди (n=15) будут включены в открытое исследование PR001A гAAV. Критерии включения субъектов включают: младенцев 0-24 месяцев; дуаллельные мутации GBA1; неврологические признаки и симптомы, соответствующие болезни Гоше 2 типа; и постоянное стандартное медикаментозное лечение. Каждый субъект получит исследуемый препарат посредством однократной инъекции ICM (внутри большой цистерны). Исследование будет включать 3-месячный мониторинг биомаркеров, 12-месячный клинический мониторинг, а также 5-летнее последующее наблюдение за безопасностью и клиническое наблюдение. В ходе исследования будут проанализированы: (1) безопасность и переносимость; (2) ключевые биомаркеры, включая: G-казу, GluCer и GluSph (CSF и кровь); (3) время до наступления клинического явления (например, трахеостомия, установка ПЭГ (чрескожная эндоскопическая гастростомия), смерть); и (4) эффективность: поведение, познание, общая моторика, функция, качество жизни (качество жизни).

Пример 14. Исследования внутривенного введения гAAV, кодирующего G-казу.

Исследование диапазона внутривенных доз PR001 проводили на модели мышей D409V Hom. Гомозиготные мыши Gba1^{D409V/D409Y} (D409V Hom) (The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) демонстрируют фенотипы, связанные с болезнью Гоше, включая снижение активности G-казу (см., например, Sargent et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(29):12101-6). Дизайн исследования приведен на фиг. 59. Группы и дозы приведены в табл. 12.

Таблица 12
Группы и дозы для исследования внутривенного введения PR001 мышам D409V Hom

Группа	Геномы вектора/кг
WT [†] + Вспомог. вещество	н.д.
D409V + Вспомог. вещество	н.д.
D409V + PR001 Доза 1	$1,1 \times 10^{10}$
D409V + PR001 Доза 2	$1,1 \times 10^{11}$
D409V + PR001 Доза 3	$1,1 \times 10^{12}$
D409V + PR001 Доза 4	$1,1 \times 10^{13}$
D409V + PR001 Доза 5	$1,1 \times 10^{14}$

[†]Животные дикого типа, приобретенные в The Jackson Laboratory (Бар-Харбор, штат Мэн), не с одного помета

Внутривенное введение PR001 уменьшало воспаление в печени (фиг. 60A). Мыши D409V Hom демонстрировали накопление гликолипидов в печени, которое подавлялось дозозависимым образом при введении PR001 (фиг. 60B; Фиг. 60C). Мыши D409V Hom демонстрировали накопление GluSph в головном мозге, которое снижалось при введении PR001 (фиг. 61B). Внутривенное введение PR001 уменьшало

воспаление в легком (фиг. 62).

Исследование диапазона внутривенных доз PR001 также проводили на модели мышей 4L/PS-NA. Дизайн исследования приведен на фиг. 63. Группы и дозы приведены в табл. 13.

Таблица 13

Группы и дозы для исследования внутривенного введения PR001 мышам 4L/PS-NA

Группа	Геномы вектора/кг
Контроль + Вспомог. вещество	н.д.
4L/PS-NA + Вспомог. вещество	н.д.
4L/PS-NA + PR001 Доза 1	$9,5 \times 10^{12}$
4L/PS-NA + PR001 Доза 2	$3,0 \times 10^{13}$
4L/PS-NA + PR001 Доза 3	$9,5 \times 10^{13}$
4L/PS-NA + PR001 Доза 4	$3,0 \times 10^{14}$

Мыши 4L/PS-NA продемонстрировали накопление гликолипидов в печени, которое снижалось при введении PR001 (фиг. 64A; фиг. 64B). Мыши 4L/PS-NA продемонстрировали накопление гликолипидов в головном мозге, которое снижалось при введении PR001 (фиг. 65A; фиг. 65B).

Пример 15. Исследования гAAV, кодирующих ингибирующую РНК, нацеленную на α -синуклеин.

Клетки HeLa трансдуцировали PR004 или PR014 при нескольких показателях множественности заражения (MOI). Как PR004, так и PR014 снижали уровни белка α -синуклеина дозозависимым образом (фиг. 66A). PR004 увеличивал активность G-казы дозозависимым образом (фиг. 66B).

Эффективность PR004 оценивали на культурах нейронов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациента с болезнью Паркинсона (iPSC). Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные от пациента с болезнью Паркинсона с трипликацией SNCA, дифференцировались в нейроны (фиг. 67A). Нейроны, трансдуцированные PR004, имели повышенную активность G-казы (фиг. 67B) и пониженный уровень белка α -синуклеина (фиг. 67C).

Каких-либо нецелевых эффектов вектора PR004 гAAV не наблюдалось. Нецелевые эффекты shРНК, нацеленной на SNCA из вектора PR004, оценивали в клетках HEK293 с помощью qRT-PCR. Оценивали экспрессию 15 генов, наиболее сходных по последовательности с целевой областью SNCA (фиг. 68A). Также оценивали экспрессию бета- и гамма-синуклеинов представителей семейства SNCA (SNCB и SNCG, соответственно) (фиг. 68B). Уровень m РНК этих генов не зависел от PR004.

Эффективность PR004 оценивали на мышинной модели болезни Паркинсона AAV2-55VG4-A53T AAV (фиг. 69; Фиг. 70). AAV2, кодирующий SNCA человека с мутацией A53T, вводили непосредственно в черную субстанцию взрослых мышей дикого типа. Начиная с 4 недель после инъекции, животные демонстрировали аномалии походки, изменения в метаболизме дофамина, потерю дофаминергических нейронов, нейровоспаление и экспрессию фосфорилированного α -синуклеина. Автоматизированный кинематический анализ походки (MotoRater) выполняли через 4 недели (фиг. 71 A) и 9 недель (фиг. 71B) после интрацеребровентрикулярной инъекции PR004. Тенденция лечебного эффекта PR004 наблюдалась в оба момента времени.

Настоящее изобретение включает в себя посредством ссылки содержание следующих документов во всей их полноте: Публикация международной заявки PCT № WO 2019/070894; Публикация международной заявки PCT № WO 2019/070891; Предварительные заявки на патенты США: заявка с серийным номером 62/567311, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная "Генная терапия лизосомальных нарушений"; заявка с серийным номером 62/567319, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная "Генная терапия лизосомальных нарушений"; заявка с серийным номером 62/567301, поданная 3 октября 2018 г. и озаглавленная "Генная терапия лизосомальных нарушений"; заявка с серийным номером 62/567310, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная "Генная терапия лизосомальных нарушений"; заявка с серийным номером 62/567303, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная "Генная терапия лизосомальных нарушений"; и заявка с серийным номером 62/567305, поданная 3 октября 2017 г. и озаглавленная "Генная терапия лизосомальных нарушений". Описав таким образом несколько аспектов по меньшей мере одного варианта осуществления этого изобретения, следует принять во внимание, что различные изменения, модификации и оптимизации будут легко осуществлены специалистами в данной области техники. Предполагается, что такие изменения, модификации и оптимизации являются частью этого описания и находятся в пределах сущности и объема изобретения. Соответственно, приведенное выше описание и графические материалы приведены только в качестве примера.

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

Термины в единственном числе, используемые в данном документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающие "по меньшей мере один". Фраза "и/или", используемая в данном документе в описании и формуле изобретения, должна пониматься как означающая "один или оба" для сочетающихся элементов, то есть элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других - разобщены. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных фразой "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с теми элементами, которые конкретно определены, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с не ограниченным языковым термином, например, "содержащий", может относиться в одном варианте осуществления к А без В (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления - к В без А (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления - как к А, так и к В (необязательно, включая другие элементы); и т.д.

Используемый в данном документе в описании и формуле изобретения термин "или" следует понимать как имеющий то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении элементов в перечне термины "или" или "и/или" должны интерпретироваться как включающие, то есть включение по меньшей мере одного, но также и более одного, из числа или перечня элементов, и, необязательно, дополнительные элементы, не указанные в перечне. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как "только один из" или "ровно один из" или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из" будут относиться к включению ровно одного элемента из числа или перечня элементов. В общем, термин "или", используемый в данном документе, должен интерпретироваться только как указывающий на исключительные альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), когда ему предшествуют термины исключительности, такие как "любой", "один из", "только один из" или "ровно один из". Используемую в данном документе в описании и формуле изобретения фразу "по меньшей мере один" в отношении перечня из одного или большего количества элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или большего количества элементов в перечне элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что элементы могут необязательно присутствовать помимо элементов, специально идентифицированных в перечне элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно идентифицированными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А или В" или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться, в одном варианте осуществления, по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, без В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления - по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В, без А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления - по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного А, и по меньшей мере одному, необязательно включающему более одного В (и необязательно включающему другие элементы); и т.д.

Использование порядковых терминов, таких как "первый", "второй", "третий" и т.д., в формуле изобретения для модификации элемента формулы изобретения само по себе не означает какого-либо приоритета, предпочтения или доминирующего порядка одного элемента формулы над другим или временного порядка, в котором выполняются действия способа, и при этом эти термины используются просто

как метки, чтобы отличить один элемент формулы изобретения, имеющий определенное название, от другого элемента, имеющего такое же название (но для использования порядкового термина), чтобы дифференцировать элементы формулы изобретения.

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

Каждый из патентов США, публикаций патентных заявок США, патентных заявок США, иностранных патентов, иностранных патентных заявок и непатентных публикаций, упомянутых в этом изобретении, полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Последовательности.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая один или большее количество генных продуктов (например, первый, второй и/или третий генный продукт), содержит или состоит из (или кодирует пептид, имеющий) последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48. В некоторых вариантах осуществления продукт гена кодируется частью (например, фрагментом) любой из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48.

Пронумерованные варианты осуществления

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

1. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую белок G-казу, фланкированный двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), при этом (i) по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область "D" относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29); и/или (ii) белок G-каза кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

2. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что белок G-каза содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, или ее часть.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- (ii) белок SCARB2 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.
14. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 13, отличающаяся тем, что белок SCARB2 содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18 или ее часть.
15. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 13 или 14, отличающаяся тем, что белок SCARB2 кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, необязательно последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 19.
16. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 13-15, отличающаяся тем, что модифицированная область "D" представляет собой последовательность "D", расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.
17. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 13-16, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность "D", представляет собой 3' ITR.
18. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 13-17, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.
19. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую первый генный продукт и второй генный продукт, при этом каждый генный продукт независимо выбирает из генных продуктов или их частей, представленных в табл. 1.
20. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 19, отличающаяся тем, что первый генный продукт представляет собой белок G-казу или его часть.
21. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 19 или по варианту осуществления 20, отличающаяся тем, что второй генный продукт представляет собой LIMP2 или его часть, или просапозин или его часть.
22. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 19-21, дополнительно кодирующая интерферирующую нуклеиновую кислоту (например, shPHK, miPHK, dsPHK и т.д.), необязательно при этом интерферирующая нуклеиновая кислота ингибирует экспрессию α -Syn.
23. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 19-22, дополнительно содержащая один или большее количество промоторов, необязательно при этом каждый из одного или большего количества промоторов независимо представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA), промотор CAG, промотор CD68 или промоутер JeT.
24. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 19-23, дополнительно содержащая внутренний участок посадки рибосомы (IRES), необязательно при этом указанный IRES расположен между первым генным продуктом и вторым генным продуктом.
25. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 19-23, дополнительно содержащая последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид, необязательно при этом указанный саморасщепляющийся пептид представляет собой T2A.
26. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 19-24, отличающаяся тем, что экспрессирующая конструкция содержит две последовательности инвертированного концевого повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), фланкирующие первый генный продукт и второй генный продукт, необязательно при этом одна из последовательностей ITR не имеет функционального сайта терминального разрешения.
27. Выделенные нуклеиновые кислоты по варианту осуществления 26, отличающиеся тем, что по меньшей мере один из ITR содержит модифицированную область "D" относительно ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 29).
28. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 27, отличающаяся тем, что модифицированная область "D" представляет собой последовательность "D", расположенную вне ITR относительно экспрессирующей конструкции.
29. Выделенная нуклеиновая кислота по варианту осуществления 27 или 28, отличающаяся тем, что ITR, содержащий модифицированную последовательность "D", представляет собой 3' ITR.
30. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 27-29, дополнительно содержащая последовательность TRY, необязательно при этом последовательность TRY указана в SEQ ID NO: 28.
31. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 1-30, имеющая последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-12, 14, 16 и 18.
32. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-31.
33. Вектор по варианту осуществления 32, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой плазмиду.
34. Вектор по варианту осуществления 32, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вирусный вектор, необязательно при этом вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор AAV (гAAV) или вектор бакуловируса.
35. Композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-31 или вектор по любому из вариантов осуществления 32-34.

36. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-31 или вектор по любому из вариантов осуществления 32-34.

37. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий:

(i) капсидный белок; а также

(ii) выделенную нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-31 или вектор по любому из вариантов осуществления 32-34.

38. rAAV по варианту осуществления 37, отличающийся тем, что капсидный белок способен преодолевать гематоэнцефалический барьер, при этом указанный капсидный белок необязательно представляет собой капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAVgh. 10.

39. rAAV по варианту осуществления 37 или по варианту осуществления 38, отличающийся тем, что указанный rAAV трансдуцирует нейрональные клетки и ненейрональные клетки центральной нервной системы (ЦНС).

40. Способ лечения субъекта с имеющейся или подозреваемой болезнью Паркинсона или, при этом указанный способ включает введение субъекту выделенной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-31, вектора по любому из вариантов осуществления 32-34, композиции по варианту осуществления 35 или rAAV по любому из вариантов осуществления 37-39.

41. Способ по варианту осуществления 40, отличающийся тем, что введение включает прямую инъекцию в ЦНС субъекта, необязательно при этом прямая инъекция представляет собой внутримозговую инъекцию, интрапаренхимальную инъекцию, интратекальную инъекцию, инъекцию внутрь большой цистерны или любую их комбинацию.

42. Способ по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что указанная прямая инъекция в ЦНС субъекта включает конвекционную усовершенствованную доставку (CED).

43. Способ по любому из вариантов осуществления 40-42, отличающийся тем, что введение включает периферическую инъекцию, при этом периферическая инъекция необязательно является внутривенной инъекцией.

44. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше 2 типа или болезнью Гоше 3 типа, включающий введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок глюкоцереброзидазу (G-казу), при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(ii) капсидный белок AAV9.

45. Способ по варианту осуществления 44, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{10} vg/г головного мозга до около 5×10^{11} vg/г головного мозга.

46. Способ по варианту осуществления 44, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту в дозе около $1,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга.

47. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Паркинсона с мутацией глюкоцереброзидазы-1 (GBA1), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(ii) капсидный белок AAV9.

47. Способ по варианту осуществления 46, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{13} vg до около 5×10^{14} vg.

48. Способ по варианту осуществления 46, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту дозе около 1×10^{14} vg или около 2×10^{14} vg.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 44-48, отличающийся тем, что rAAV вводят посредством субокципитальной инъекции в большую цистерну.

50. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше 1 типа, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(ii) капсидный белок AAV9.

51. Способ по варианту осуществления 50, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{13} vg до около 5×10^{14} vg.

52. Способ по варианту осуществления 50 или 51, отличающийся тем, что rAAV вводят внутривенно. 53. Способ лечения субъекта, страдающего синуклеинопатией или паркинсонизмом, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию,

содержащую трансген, содержащий

(a) последовательность, кодирующую белок G-казу, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(b) последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; и

(ii) капсидный белок AAV9.

54. Способ лечения субъекта, страдающего синуклеинопатией или паркинсонизмом, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую трансген, содержащий последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; и

(ii) капсидный белок AAV9.

55. Способ по варианту осуществления 53 или 54, отличающийся тем, что синуклеинопатия или паркинсонизм представляет собой множественную системную атрофию, болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с мутацией GBA1, болезнь с тельцами Леви, деменцию с тельцами Леви, деменцию с тельцами Леви с мутацией GBA1, прогрессирующий надъядерный паралич или кортикобазальный синдром.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 44-55, отличающийся тем, что промотор представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA).

57. Способ по любому из вариантов осуществления 44-56, отличающийся тем, что вектор rAAV дополнительно содержит энхансер цитомегаловируса (CMV).

58. Способ по любому из вариантов осуществления 44-57, отличающийся тем, что вектор rAAV дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE).

59. Способ по любому из вариантов осуществления 44-58, отличающийся тем, что вектор rAAV дополнительно содержит сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота.

60. Способ по любому из вариантов осуществления 44-59, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса, фланкирующие экспрессионную конструкцию.

61. Способ по варианту осуществления 60, отличающийся тем, что каждая ITR-последовательность представляет собой ITR-последовательность AAV2 дикого типа.

62. Способ по любому из вариантов осуществления 44-61, отличающийся тем, что вектор rAAV дополнительно содержит TRY-область между 5' ITR и экспрессионной конструкцией, при этом TRY-область содержит SEQ ID NO: 28.

63. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше 2 типа или болезнью Гоше 3 типа, включающий введение субъекту rAAV, содержащего:

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

(a) AAV2 ITR;

(b) энхансер CMV;

(c) промотор CBA;

(d) вставку трансгена, кодирующую белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15;

(e) WPRE;

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

(g) AAV2 ITR; и

(ii) капсидный белок AAV9;

при этом rAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{10} vg/г головного мозга до около 5×10^{11} vg/г головного мозга.

64. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Паркинсона с мутацией GBA1, включающий введение субъекту rAAV, содержащего: (i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' до 3':

(a) AAV2 ITR;

(b) энхансер CMV;

(c) промотор CBA;

(d) вставку трансгена, кодирующую белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15;

(e) WPRE;

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

(g) AAV2 ITR; и

(ii) капсидный белок AAV9;

при этом rAAV вводят субъекту в дозе от около 5×10^{13} vg до около 5×10^{14} vg.

65. Способ по варианту осуществления 63 или 64, отличающийся тем, что rAAV вводят посредством субокупиальной инъекции в большую цистерну.

66. Способ по любому из вариантов осуществления 44-52 и 63-65, отличающийся тем, что гAAV вводят в составе, содержащем около 20 мМ Трис, pH 8,0, около 1 мМ MgCl₂, около 200 мМ NaCl и около 0,001% мас./об. полоксамера 188.

67. Фармацевтическая композиция, содержащая

(i) гAAV, содержащий:

(a) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(b) капсидный белок AAV9; и

(ii) около 20 мМ Трис, pH 8,0,

(iii) около 1 мМ MgCl₂,

(iv) около 200 мМ NaCl, и

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

68. гAAV, содержащий:

(i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(ii) капсидный белок AAV9, для применения в способе лечения болезни Гоше 1 типа, болезни Гоше 2 типа, болезни Гоше 3 типа или болезни Паркинсона с мутацией GBA1 у субъекта.

69. гAAV, содержащий:

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

(a) последовательность, кодирующую белок G-казу, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(b) последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; и

(ii) капсидный белок AAV9, для применения в способе лечения синуклеинопатии или паркинсонизма у субъекта.

70. гAAV, содержащий:

(i) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, содержащей последовательность, кодирующую ингибирующую нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20; и

(ii) капсидный белок AAV9, для применения в способе лечения синуклеинопатии или паркинсонизма у субъекта.

Краткая характеристика доклинических исследований
фармакологии (эффективности) in vivo

Номер исследования	Цель	Статус	Результаты
PRV-2017-001	Валидация мышинной модели CBE для изучения дефицита Gказы	Завершено	25 мг/кг CBE воспроизводит основные характеристики дефицита Gказы Накопление гликолипидов (совокупность GluSph и галактозилсфингозина [GalSph]) относительно контроля Дефицит двигательной активности в тесте на вращающемся барабане
PRV-2018-002	Продemonстрировать эффективность максимально возможной дозы PR001B ^a у мышей CBE	Завершено	Широкое биораспределение генома вектора PR001B Повышение активности Gказы коррелировало со снижением накопления гликолипидного субстрата. Улучшение поведенческих характеристик при тестировании на вращающемся барабане Нежелательных эффектов, связанных с PR001B, не наблюдалось.
PRV-2018-005	Определите эффективные дозы ICV PR001A в мышинной модели CBE.	Завершено	Широкое биораспределение генома вектора PR001A Повышение активности Gказы и снижение накопления патологического гликолипидного субстрата Уменьшение астроглиоза и микроглиоза Устранение дефицита двигательного поведения Нежелательных эффектов, связанных с PR001A, не наблюдалось.

PRV-2018-007	Долгосрочная (6 месяцев) персистенция ICV PR001A в мышинной модели CBE	Завершено	Сохранение генома вектора стойкое повышение активности Gказы и снижение уровня гликолипидов через 6 месяцев после лечения Нежелательных эффектов, связанных с PR001A, не наблюдалось.
PRV-2018-008	Дополнительный диапазон доз ICV PR001A в мышинной модели CBE	Завершено	Широкое биораспределение генома вектора PR001A Повышение активности кортикальной Gказы и снижение накопления патологического гликолипидного субстрата Нежелательных эффектов, связанных с PR001A, не наблюдалось.
PRV-2018-025	Дополнительный диапазон доз ICV PR001A в мышинной модели CBE	Продолжается	Биораспределение генома вектора PR001A в коре Повышение активности кортикальной Gказы и снижение накопления патологического гликолипидного субстрата Устранение дефицита двигательного поведения
PRV-2018-006	Продемонстрировать эффективность ICV PR001A в мышинной модели 4L/PS-NA	Завершено	Широкое биораспределение генома вектора PR001A Повышение активности Gказы в ЦНС и периферии, ассоциированное с уменьшением накопления гликолипидного субстрата Тенденция к улучшению двигательных функций Снижение накопления нерастворимого α -синуклена Нежелательных эффектов, связанных с PR001A, не наблюдалось.
PRV-2018-011	Диапазон доз ICV PR001A в генетической мышинной модели 4L/PS-NA	Завершено	Широкое биораспределение генома вектора PR001A Повышение активности Gказы и снижение накопления патологического гликолипидного субстрата

			Устранение дефицита двигательного поведения Нежелательных эффектов, связанных с PR001A, не наблюдалось.
PRV-2018-019	Влияние ICV PR001A на α -синуклеин у трансгенных мышей, получавших СВЕ.	Продолжается	Биораспределение генома вектора PR001A в коре и снижение уровня гликолипидов Уменьшение накопления нерастворимого α -синуклеина и соотношения нерастворимого и растворимого накопления нерастворимого α -синуклеина Нежелательных эффектов, связанных с PR001A, не наблюдалось.
PRV-2019-001	Влияние ICV PR001A на α -синуклеин у трансгенных мышей, получавших СВЕ.	Продолжается	Биораспределение генома вектора PR001A в коре и повышение активности Gказа в коре Нежелательных эффектов, связанных с PR001A, не наблюдалось.

Сокращения: СВЕ - кондуриitol- β -эпоксид;

ЦНС - центральная нервная система;

G-каза - глюкоцереброзидаза;

GluSph - глюкозилсфингозин;

ICV - интрацеребровентрикулярный;

vg - геном вектора

PR001B представляет собой версию PR001A с измененным доменом D;

PR001A и PR001B в остальном идентичны

Таблица 15

Краткая характеристика оценок безопасности в исследованиях эффективности PR001A на мышах

Цель исследования	Номер исследования	Путь введения	Вид	Доза (vg/г головного мозга)	Общая доза PR001A (vg)	Объем инъекции (мкл)	Момент времени некропсия ^a
Эффективность с выбранными критериями оценки безопасности	PRV-2018-005	ICV	Мыши C57BL/6J, получавшие СВЕ	1,3 x 10 ¹⁰	2,0 x 10 ⁹	4	Дни 35-37
				4,2 x 10 ¹⁰	6,2 x 10 ⁹		
				1,3 x 10 ¹¹	2,0 x 10 ¹⁰		
Эффективность с выбранными критериями оценки безопасности	PRV-2018-006	ICV	Мыши 4L/PS-NA	3,7 x 10 ¹⁰	1,5 x 10 ¹⁰	3	Неделя 15

Сокращения: СВЕ - кондуриitol- β -эпоксид;

ICV - интрацеребровентрикулярный;

vg - геном вектора

^a После применения PR001A

Краткая характеристика оценок безопасности в исследованиях безопасности PR001A у NHP

Цель исследования	Номер исследования	Путь введения	Вид	Доза (vg/г головного мозга)	Общая доза PR001A (vg)	Объем инъекции (мл)	Момент времени некропсия ^a
Пилотное не-GLP исследование токсикологии	PRV-2018-015	ICM + ICM + IPa (Средний мозг)	Яванский макак	2,0 x 10 ¹¹ 2,1 x 10 ¹¹	1,47 x 10 ¹³ 1,53 x 10 ¹³	500 520	День 18
GLP исследование токсикологии	PRV-2018-016	ICM	Яванский макак	6,2 x 10 ¹⁰ 2,3 x 10 ¹¹	4,6 x 10 ¹² 1,7 x 10 ¹³	1200	Дни 7, 30, 183
Не-GLP исследование токсикологии	PRV-2019-005	ICM	Яванский макак	7,0 x 10 ¹¹	5,2 x 10 ¹³	1200	День 30,90

Сокращения: GLP - Надлежащая лабораторная практика;
 ICM - внутрь большой цистерны;
 IPa -интрапаренхимальный;
 NHP - примат, не относящийся к человеку;
 vg - геном вектора

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше 2 типа или болезнью Гоше 3 типа, включающий введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок глюкоцереброзидазу (G-казу), при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(ii) капсидный белок AAV9.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту в дозе от 5×10^{10} vg/г головного мозга до 5×10^{11} vg/г головного мозга.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту в дозе $1,3 \times 10^{11}$ vg/г головного мозга.

4. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Паркинсона с мутацией глюкоцереброзидазы-1 (GBA1), включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(ii) капсидный белок AAV9.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту в дозе от 5×10^{13} vg до 5×10^{14} vg.

6. Способ по п.4, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту дозе 1×10^{14} vg или 2×10^{14} vg.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что rAAV вводят посредством субокципитальной инъекции в большую цистерну.

8. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше 1 типа, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащего:

(i) вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(ii) капсидный белок AAV9.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что rAAV вводят субъекту в дозе от 5×10^{13} vg до 5×10^{14} vg.

10. Способ по п.8 или 9, отличающийся тем, что rAAV вводят внутривенно.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором промотор представляет собой промотор бета-актина курицы (CBA).

12. Способ по любому из пп.1-11, в котором вектор гAAV дополнительно содержит энхансер цитомегаловируса (CMV).

13. Способ по любому из пп.1-12, в котором вектор гAAV дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE).

14. Способ по любому из пп.1-13, в котором вектор гAAV дополнительно содержит сигнальный хвост полиА гормона роста крупного рогатого скота.

15. Способ по любому из пп.1-14, в котором нуклеиновая кислота содержит две последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса, фланкирующие экспрессионную конструкцию, причем первая ITR - последовательность представляет собой 5' ITR, а вторая ITR-последовательность представляет собой 3' ITR.

16. Способ по п.15, в котором каждая из указанных двух ITR-последовательностей представляет собой ITR-последовательность AAV2 дикого типа.

17. Способ по п.15 или 16, в котором вектор гAAV дополнительно содержит TRY-область между 5' ITR и экспрессионной конструкцией, при этом TRY-область содержит SEQ ID NO: 28.

18. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше 2 типа или болезнью Гоше 3 типа, включающий введение субъекту гAAV, содержащего:

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

(a) AAV2 ITR;

(b) энхансер CMV;

(c) промотор CBA;

(d) вставку трансгена, кодирующую белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15;

(e) WPRE;

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

(g) AAV2 ITR; и

(ii) капсидный белок AAV9;

при этом гAAV вводят субъекту в дозе от 5×10^{10} vg/г головного мозга до 5×10^{11} vg/г головного мозга.

19. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Паркинсона с мутацией GBA1, включающий введение субъекту гAAV, содержащего:

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

(a) AAV2 ITR;

(b) энхансер CMV;

(c) промотор CBA;

(d) вставку трансгена, кодирующую белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15;

(e) WPRE;

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

(g) AAV2 ITR; и

(ii) капсидный белок AAV9;

при этом гAAV вводят субъекту в дозе от 5×10^{13} vg до 5×10^{14} vg.

20. Способ по п.18 или 19, отличающийся тем, что гAAV вводят посредством субокципитальной инъекции в большую цистерну.

21. Способ по любому из пп.1-10 и 18-20, отличающийся тем, что гAAV вводят в составе, содержащем 20 mM Трис, pH 8,0, 1 mM MgCl₂, 200 mM NaCl и 0,001% мас./об. полоксамера 188.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(i) гAAV, содержащий:

(a) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

(b) капсидный белок AAV9; и

(ii) 20 mM Трис, pH 8,0,

(iii) около 1 mM MgCl₂,

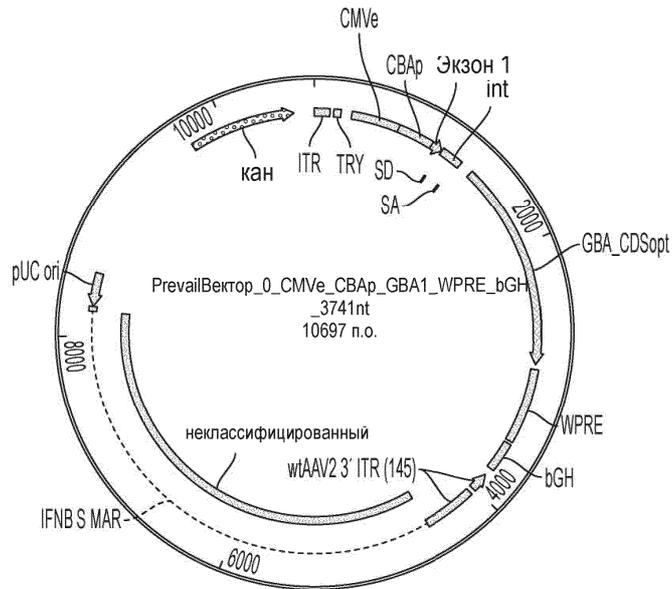
(iv) 200 mM NaCl,

(v) 0,001% мас./об. полоксамера 188.

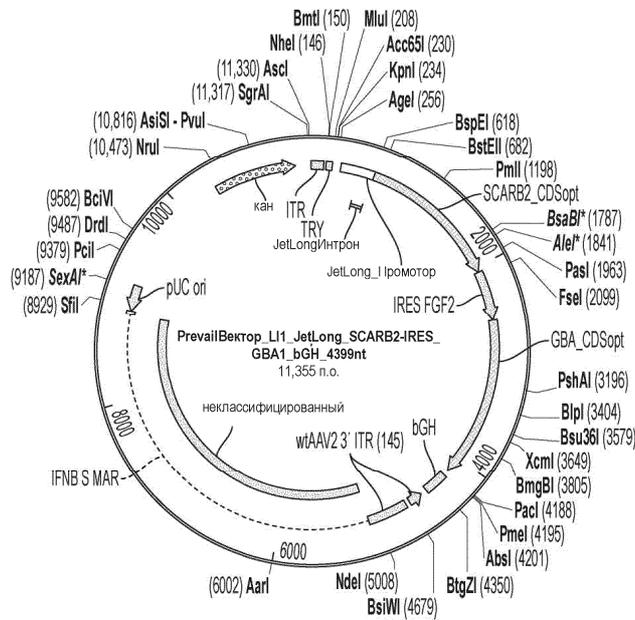
23. Применение гAAV, содержащего:

(a) вектор гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую экспрессионную конструкцию, содержащую промотор, функционально связанный со вставкой трансгена, кодирующей белок G-казу, при этом вставка трансгена содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15; и

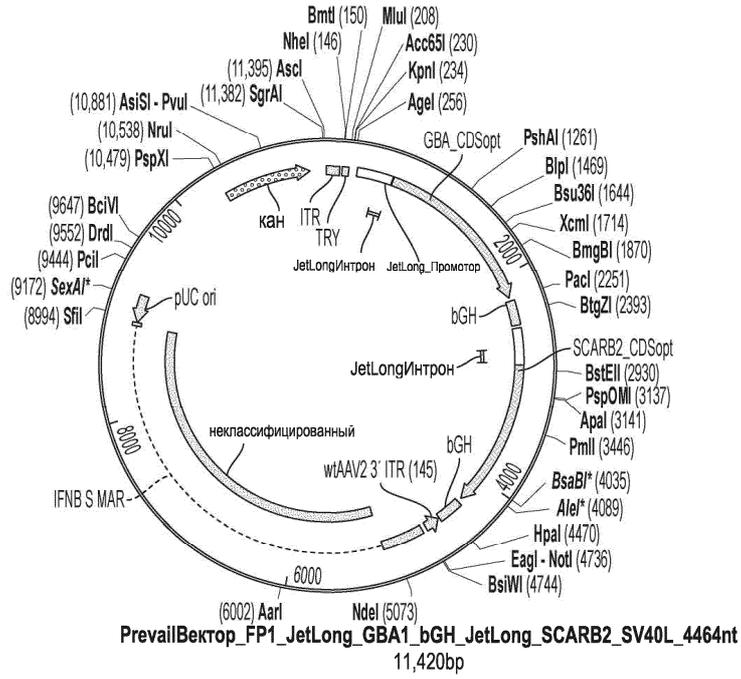
(b) капсидный белок AAV9, для лечения болезни Гоше 1 типа, болезни Гоше 2 типа, болезни Гоше 3 типа или болезни Паркинсона с мутацией GBA1 у субъекта.



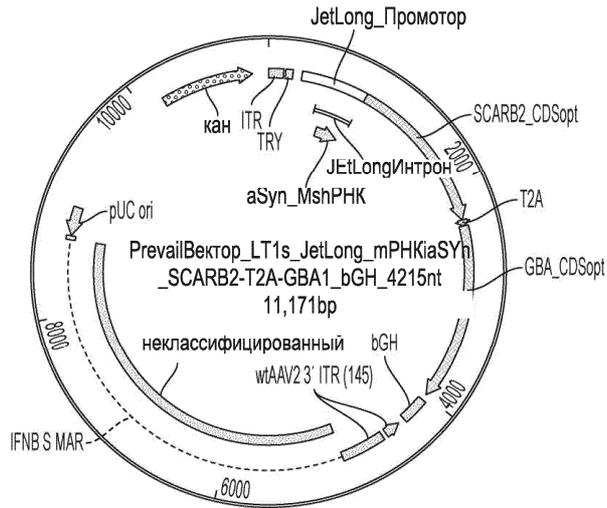
Фиг. 1



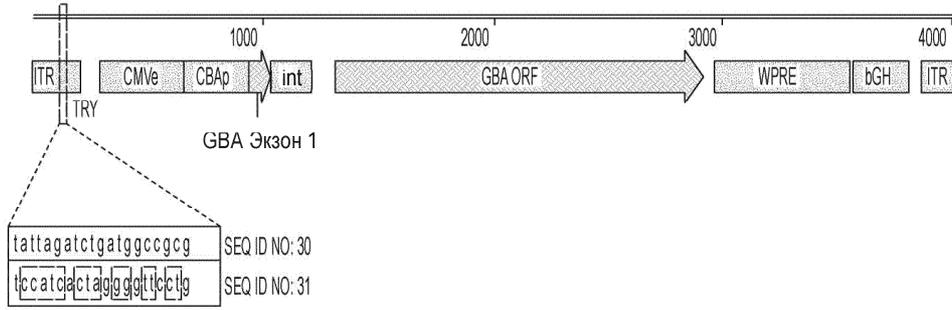
Фиг. 2



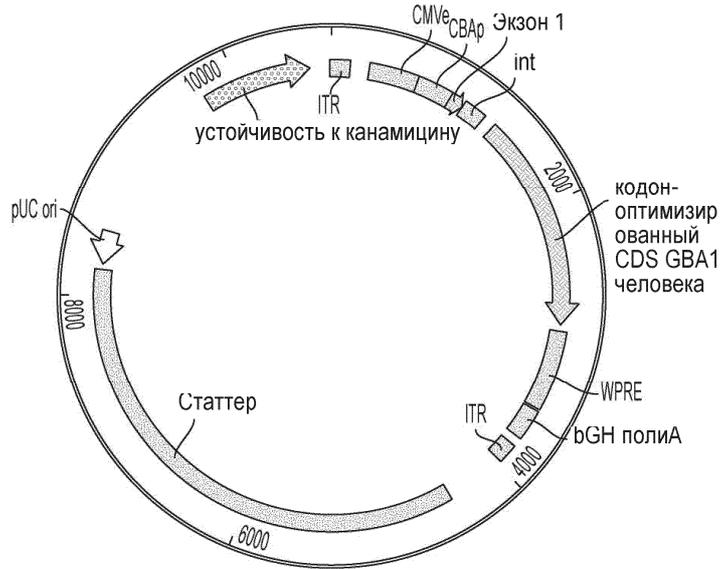
Фиг. 3



Фиг. 4



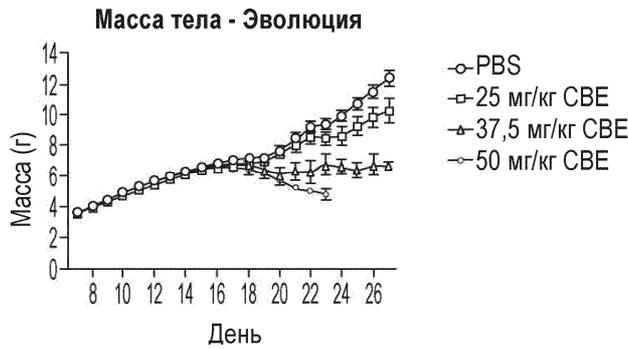
Фиг. 7



Фиг. 8

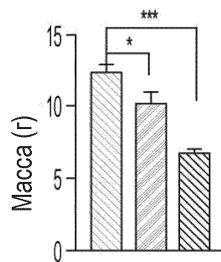


Фиг. 9А



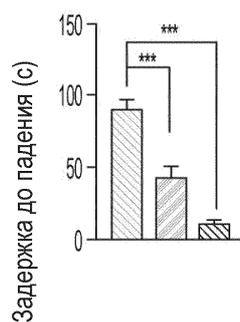
Фиг. 9В

Масса тела - P27



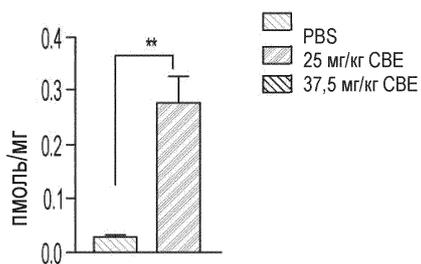
Фиг. 9С

Вращающийся барабан - P24



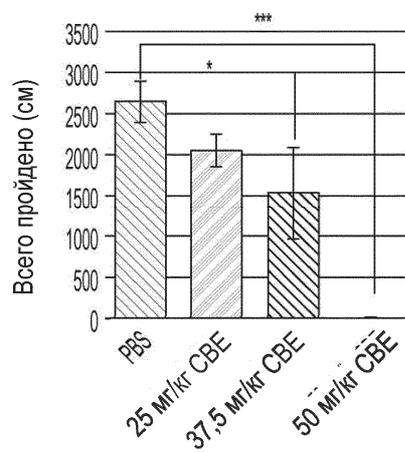
Фиг. 9D

GluSph/GalSph - Кора

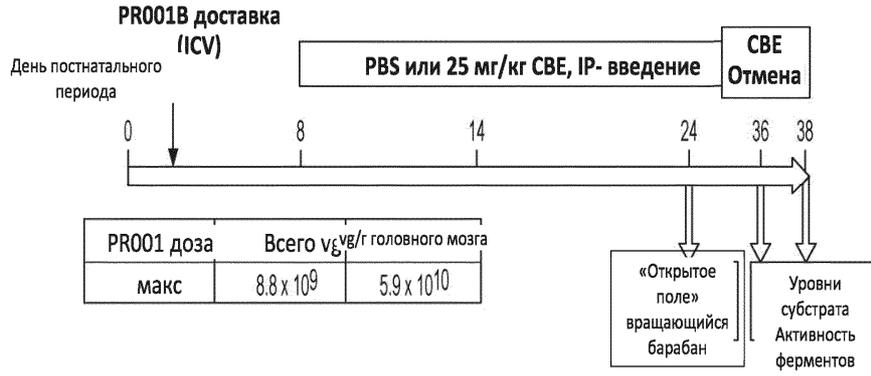


Фиг. 9Е

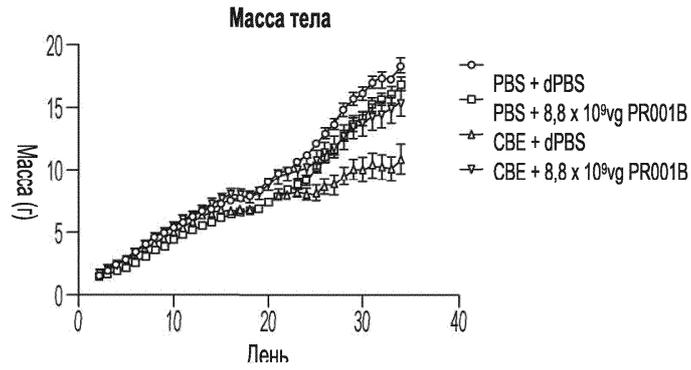
Расстояние в «открытом поле»



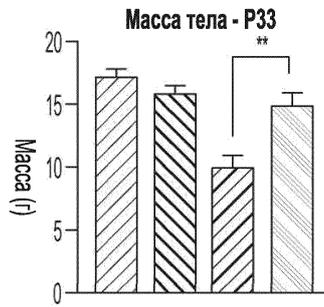
Фиг. 9F



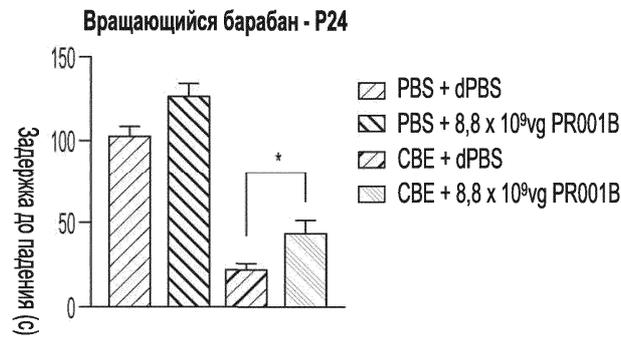
Фиг. 10



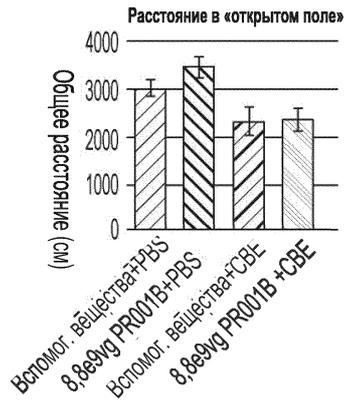
Фиг. 11А



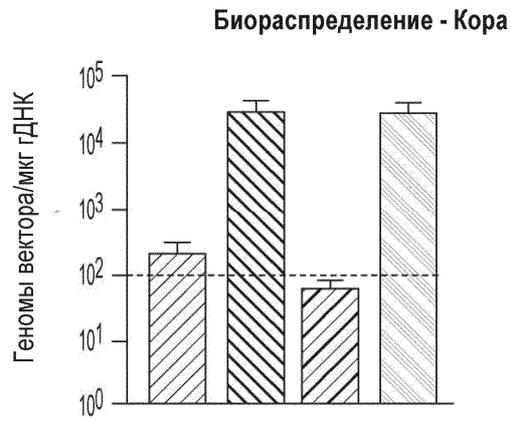
Фиг. 11В



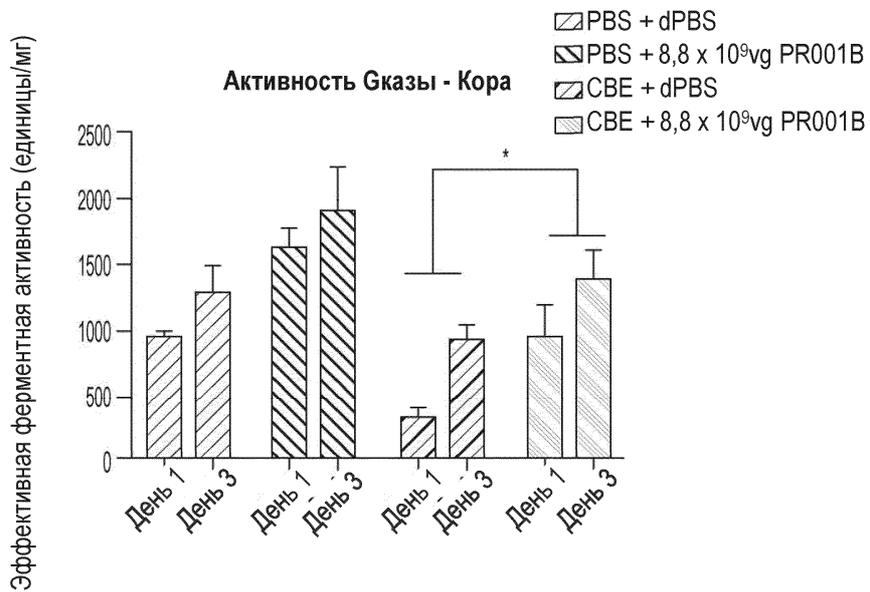
Фиг. 11С



Фиг. 11D

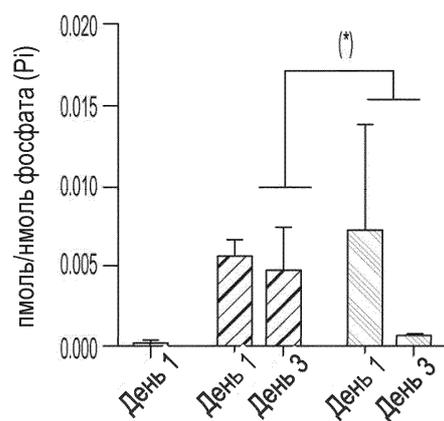


Фиг. 12A



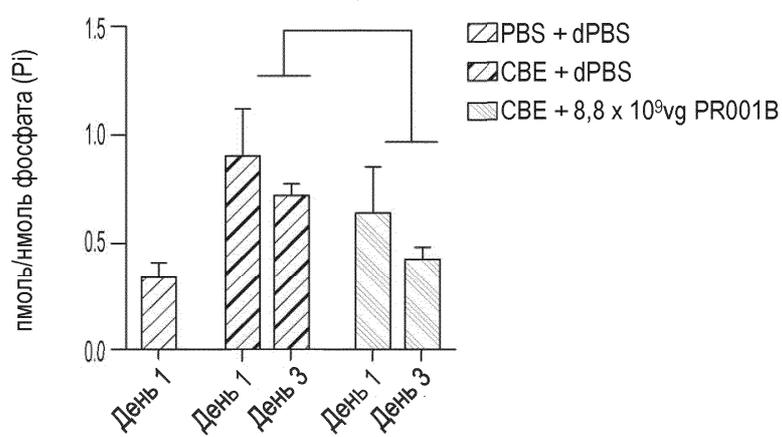
Фиг. 12B

GluSprh - моторная кора

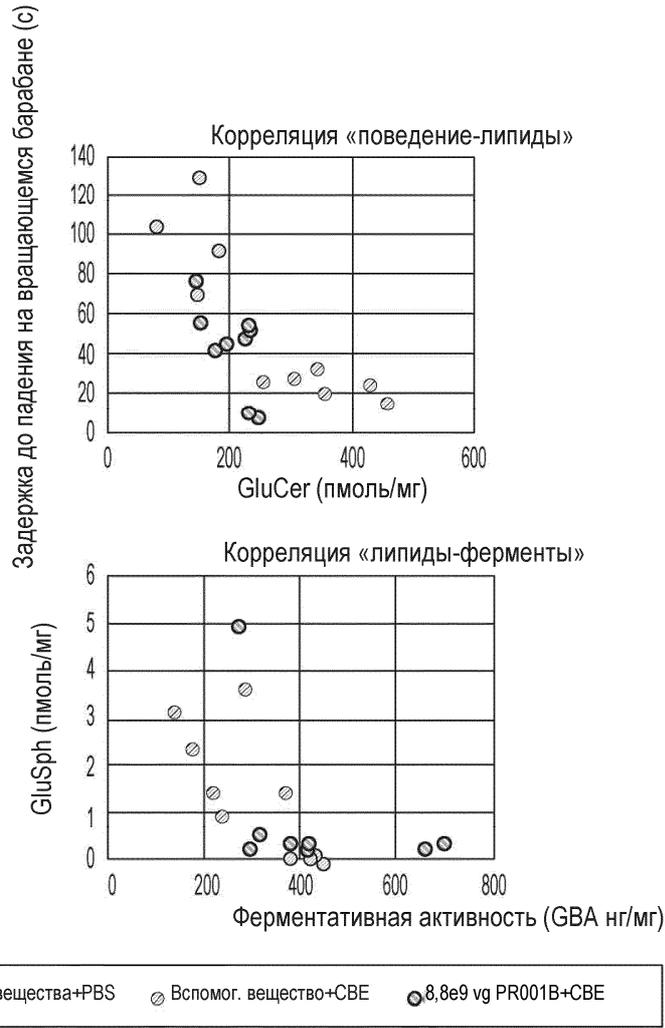


Фиг. 12С

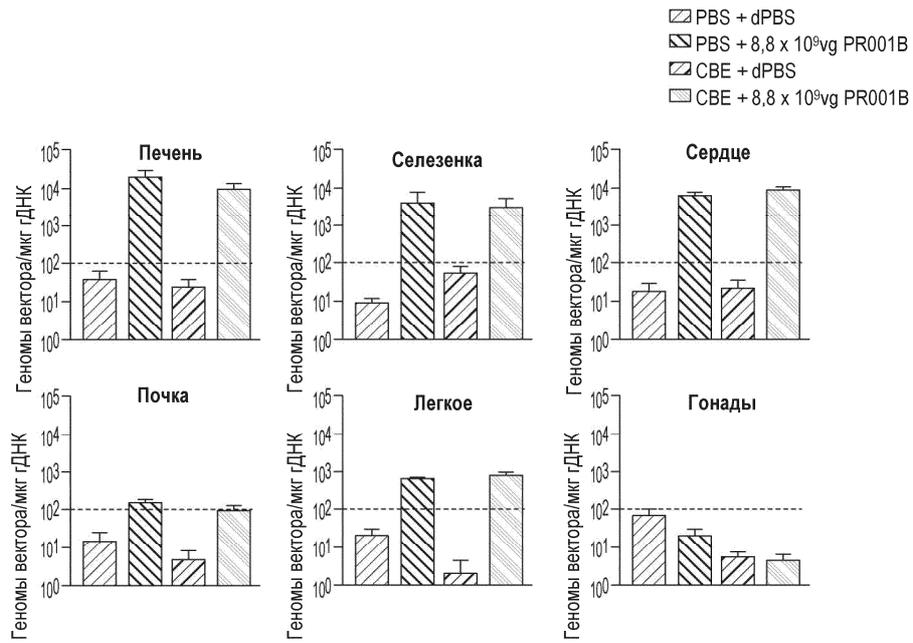
GluSer - моторная кора



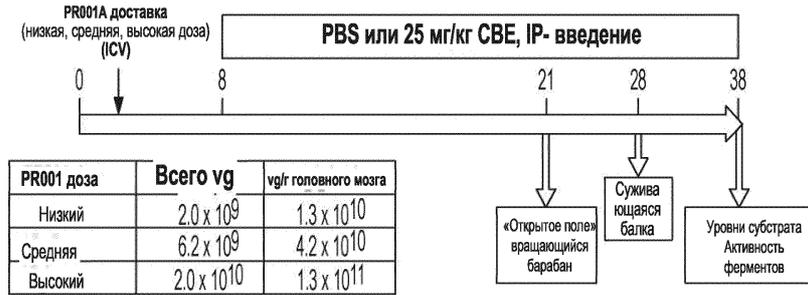
Фиг. 12D



Фиг. 13

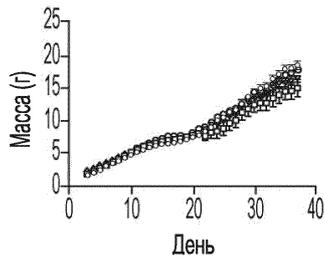


Фиг. 14



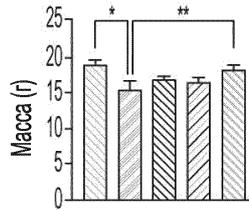
Фиг. 15А

Масса тела - Эволюция



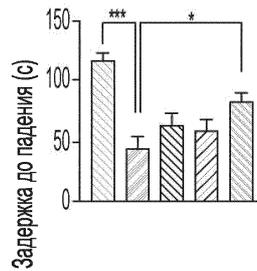
Фиг. 15В

Масса тела - P37

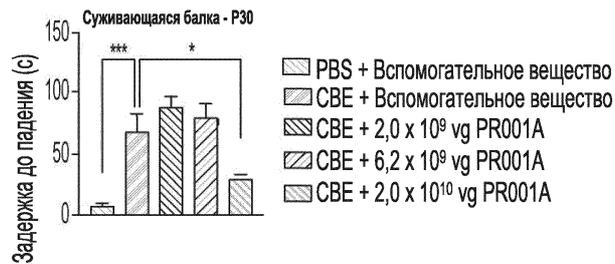


Фиг. 15С

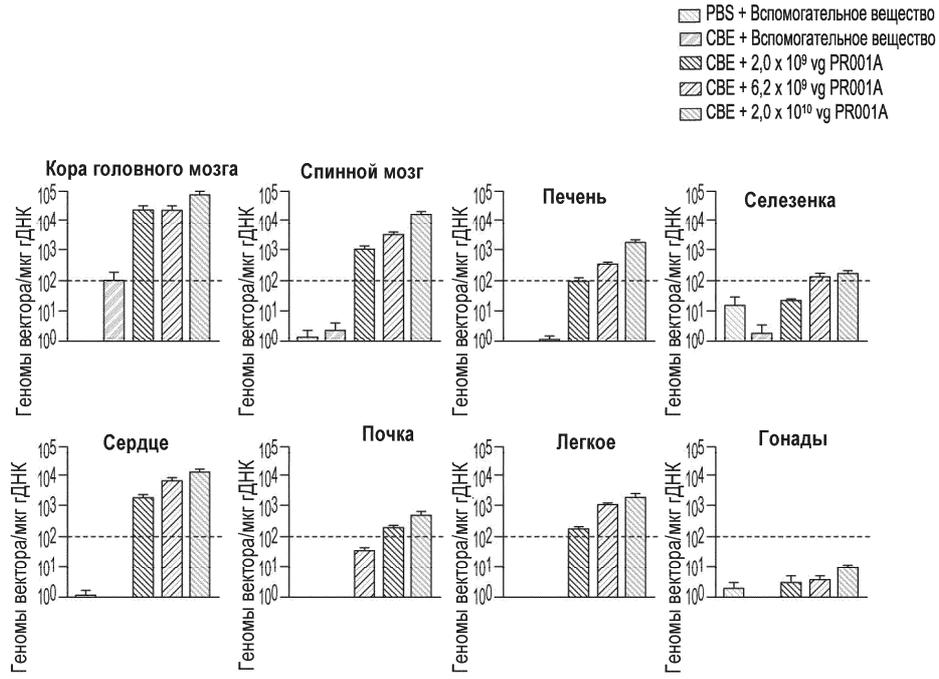
Вращающийся барабан - P24



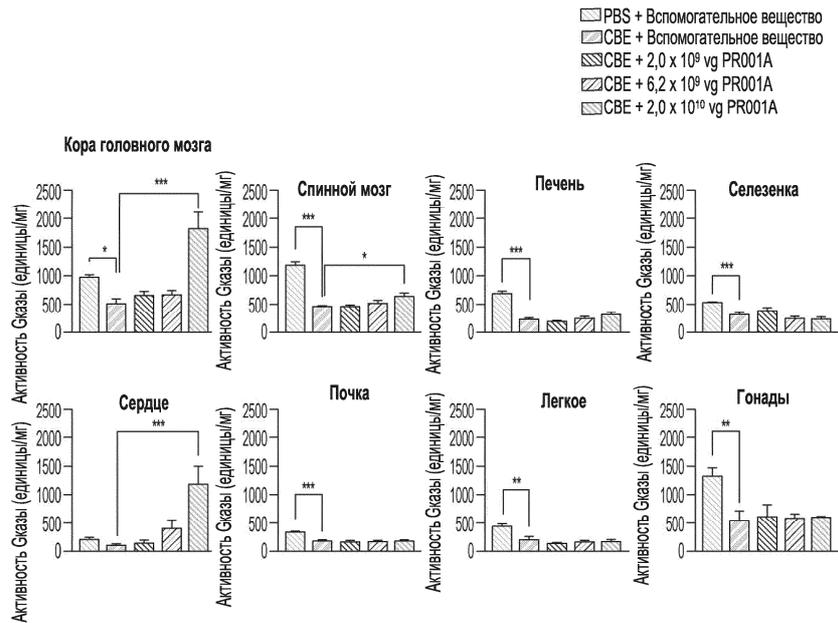
Фиг. 15D



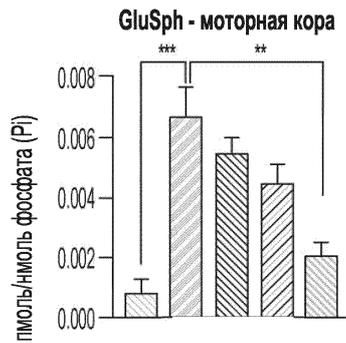
Фиг. 15Е



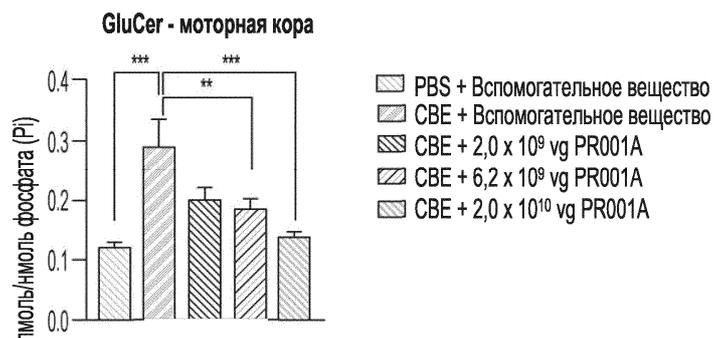
Фиг. 16А



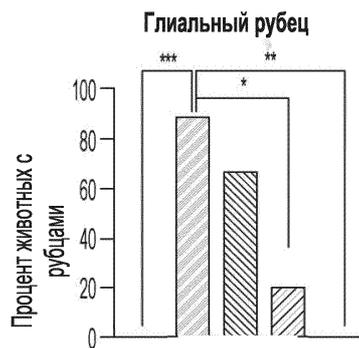
Фиг. 16В



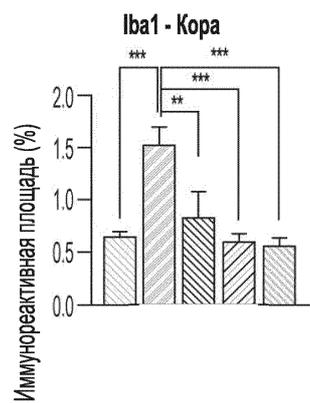
Фиг. 16С



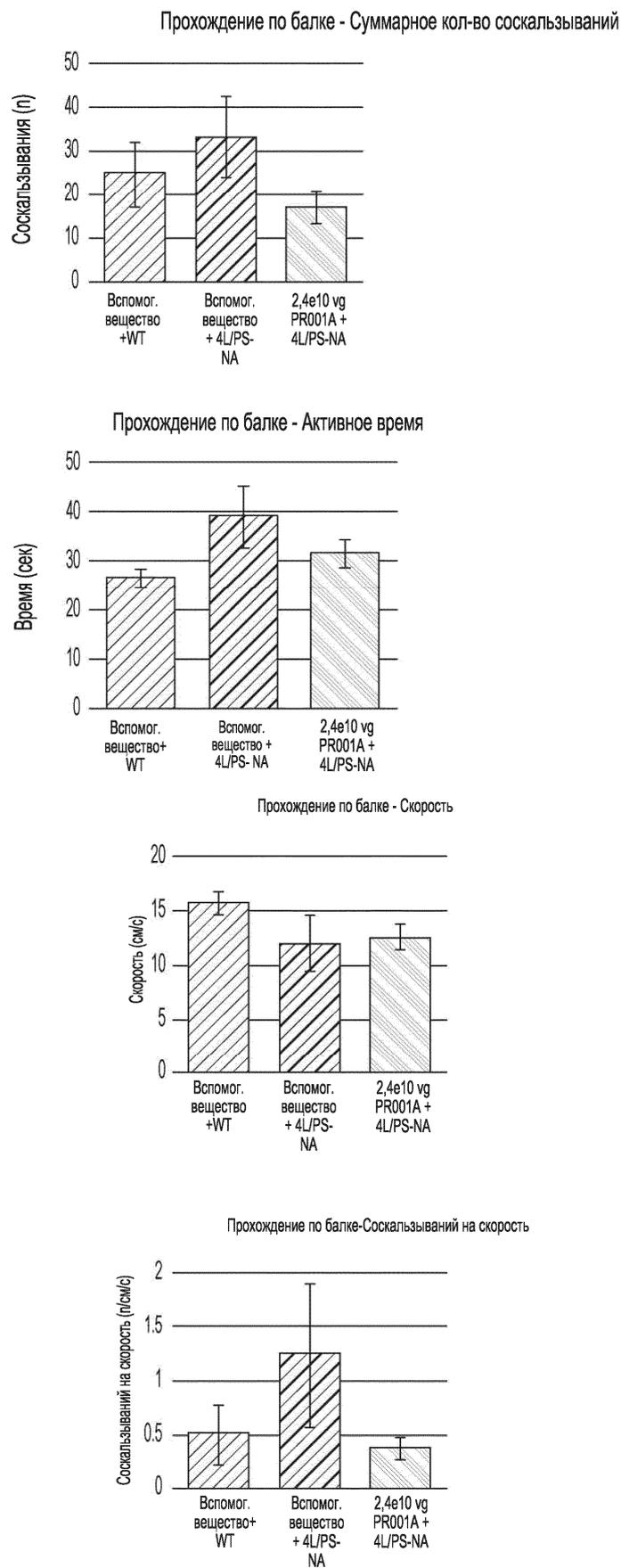
Фиг. 16D



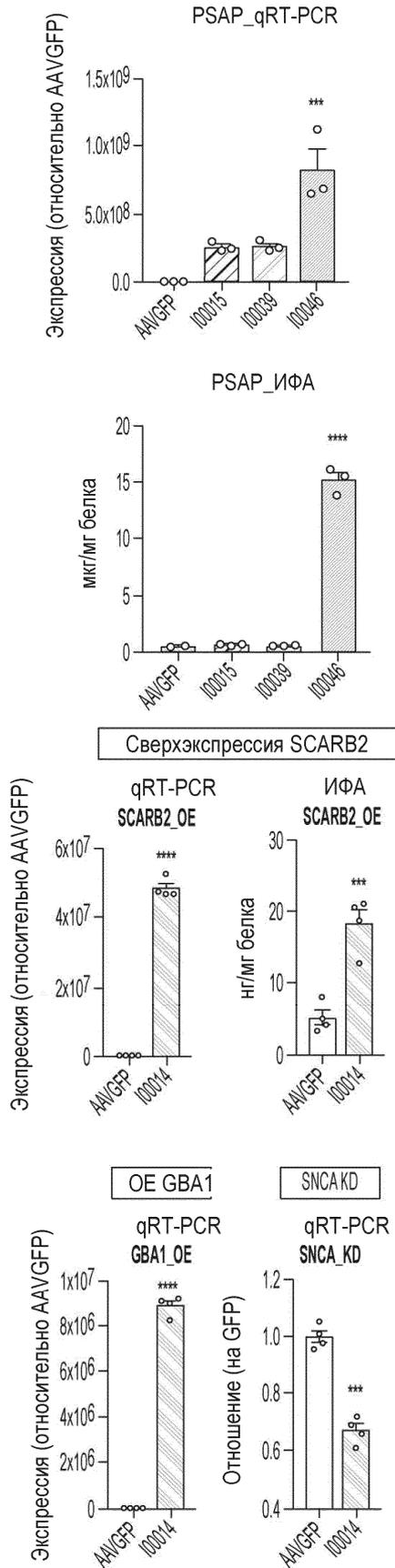
Фиг. 16E



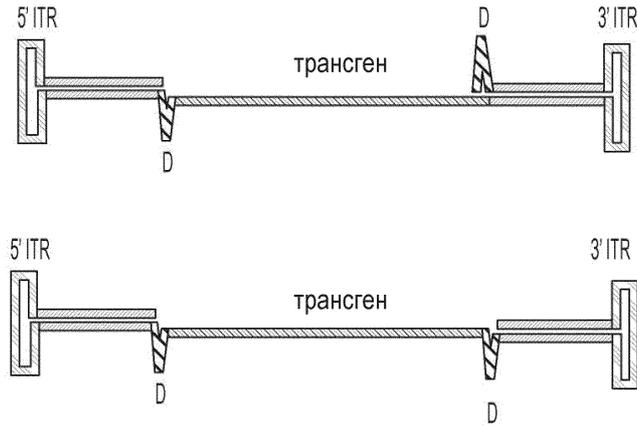
Фиг. 16F



Фиг. 17



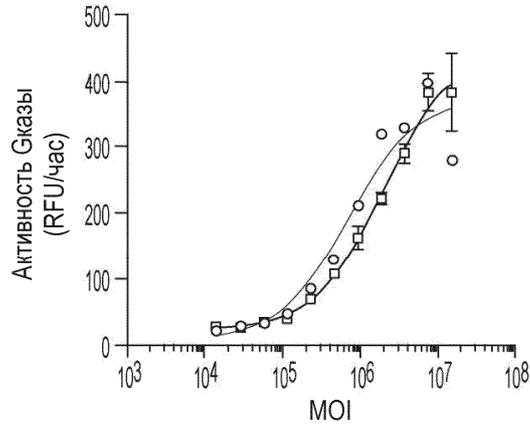
Фиг. 18



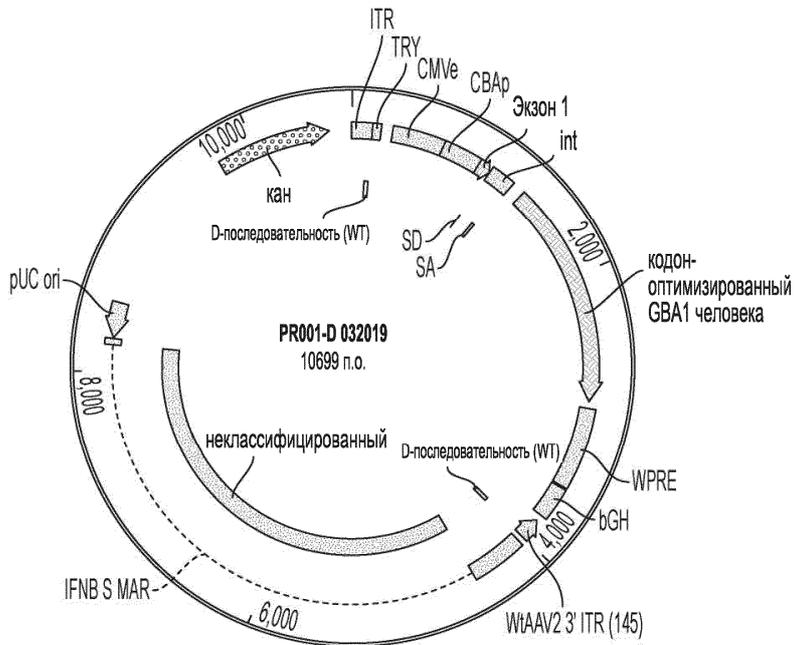
Фиг. 19

□ P-ITR J00053
○ V-ITR J00052

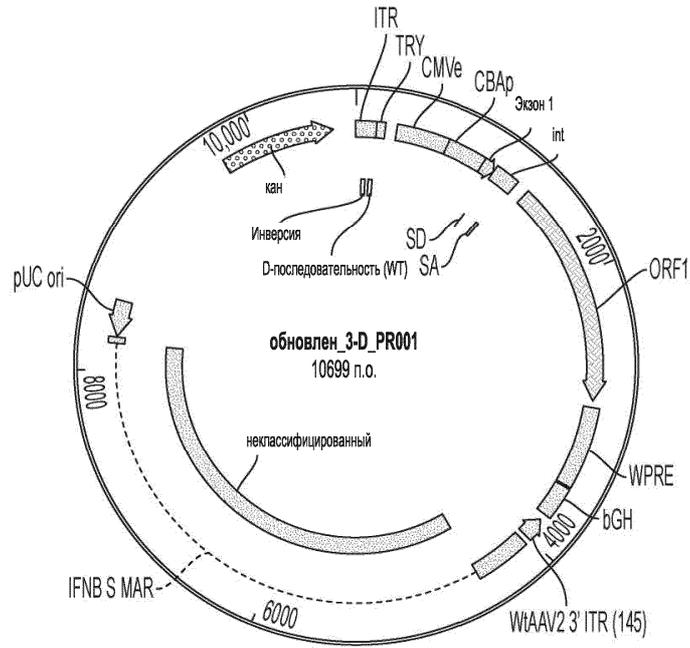
3' D ITR «внешнее» размещение
3' D ITR дикого типа, «внутреннее» размещение



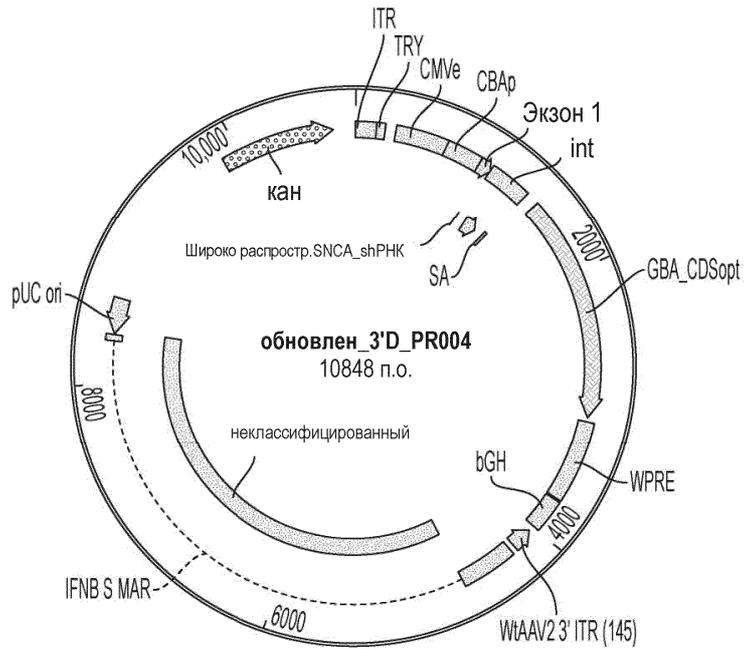
Фиг. 20



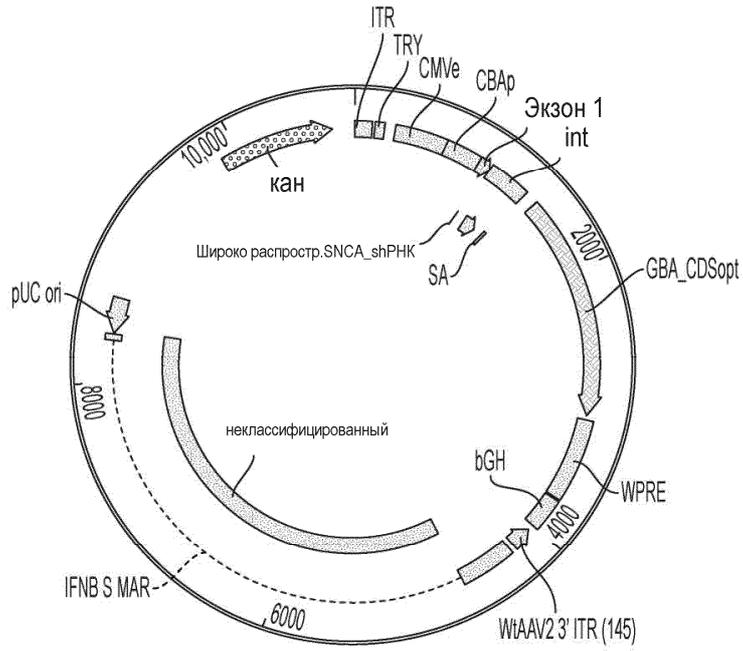
Фиг. 21



Фиг. 22

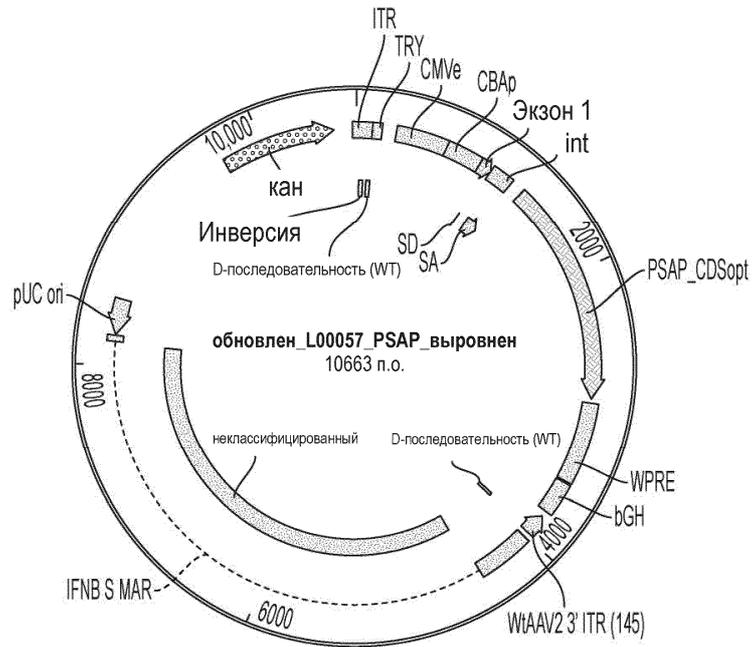


Фиг. 23

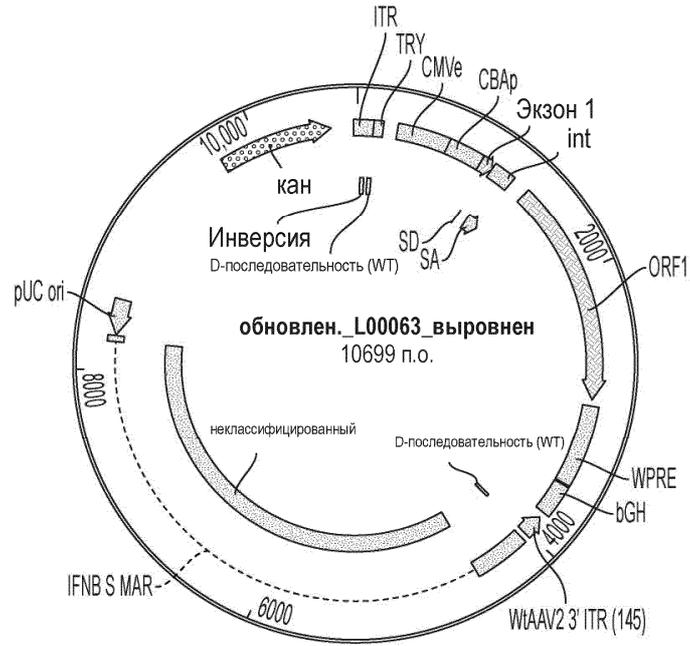


обновлен_Интронный_SNCA_Широко распротр_sh_GBA1_выровнен
10484 н.о.

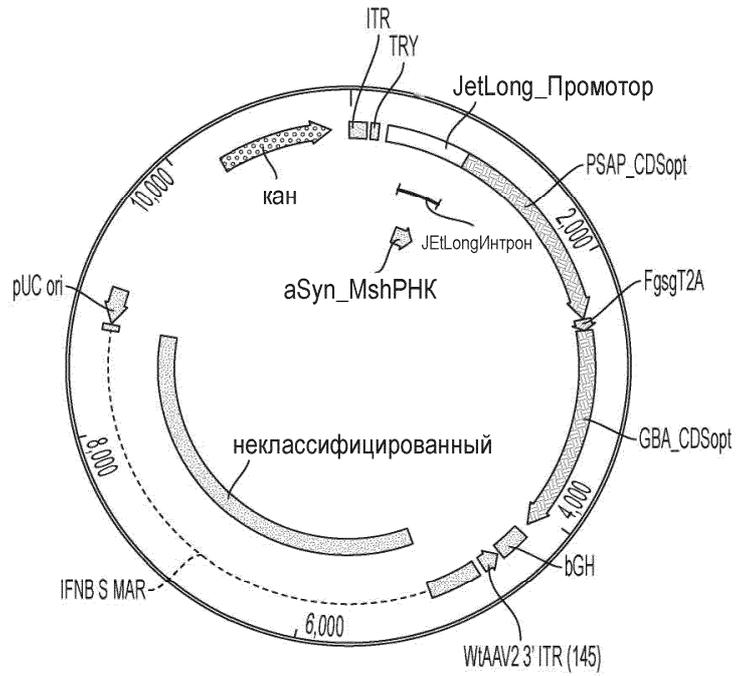
Фиг. 24



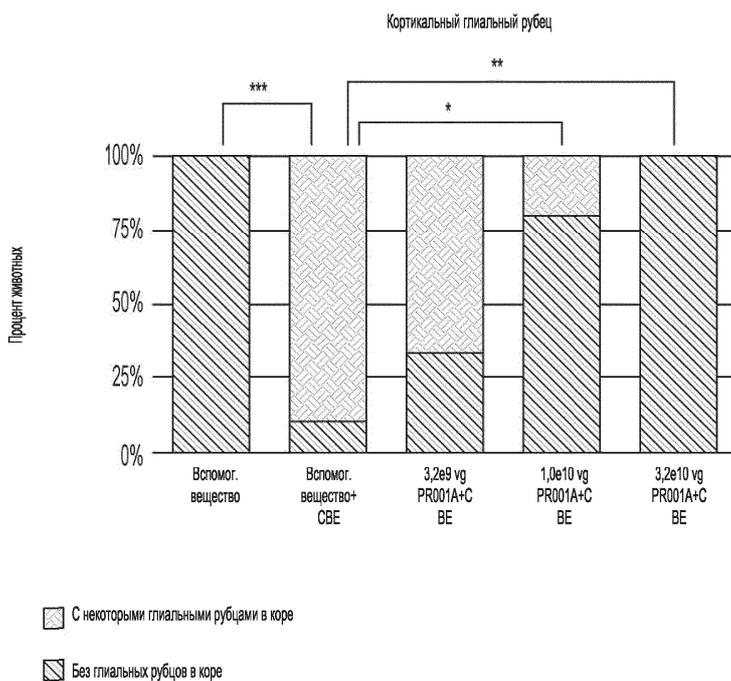
Фиг. 25



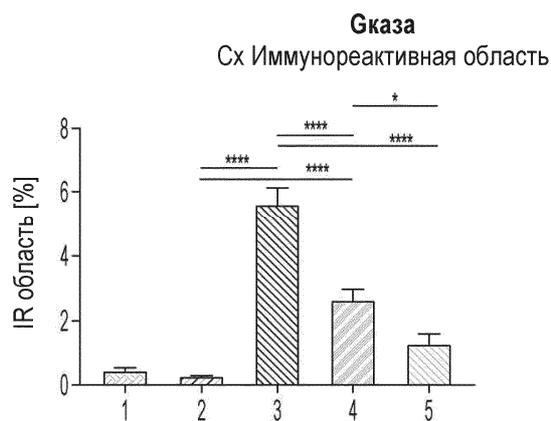
Фиг. 26



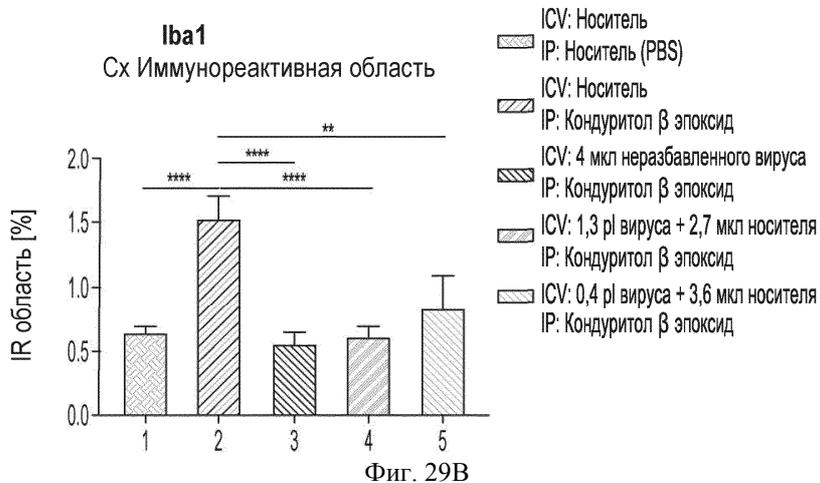
Фиг. 27



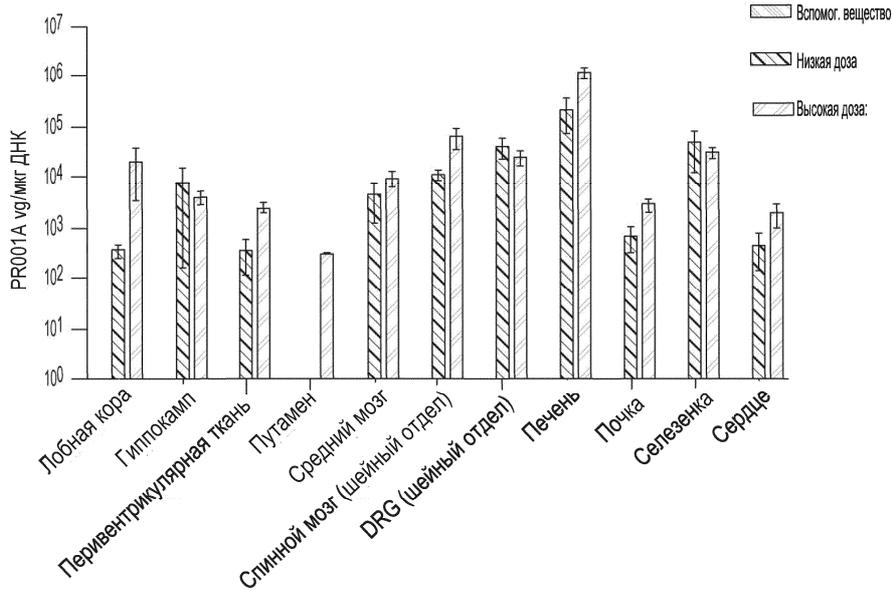
Фиг. 28



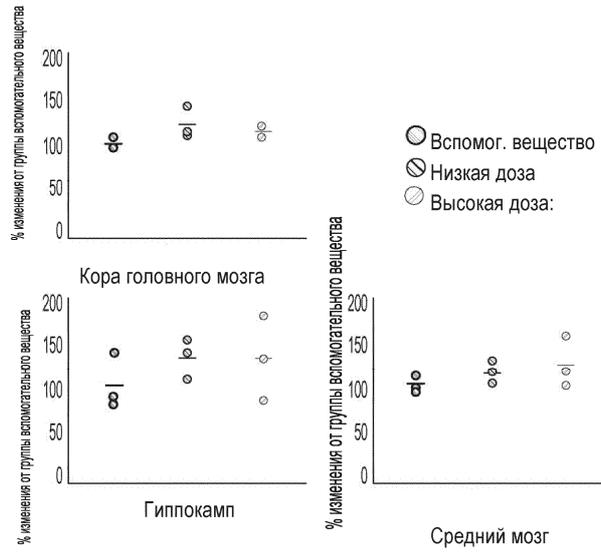
Фиг. 29А



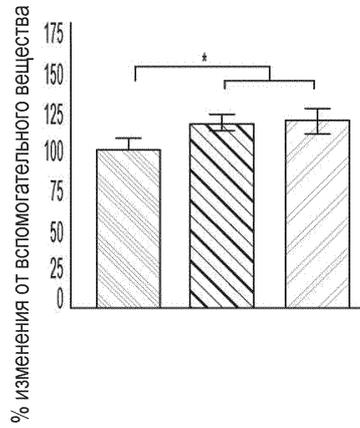
Фиг. 29В



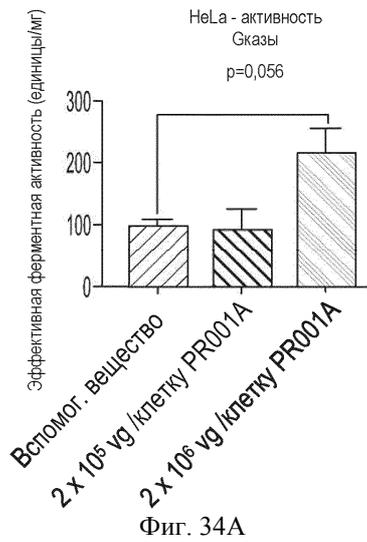
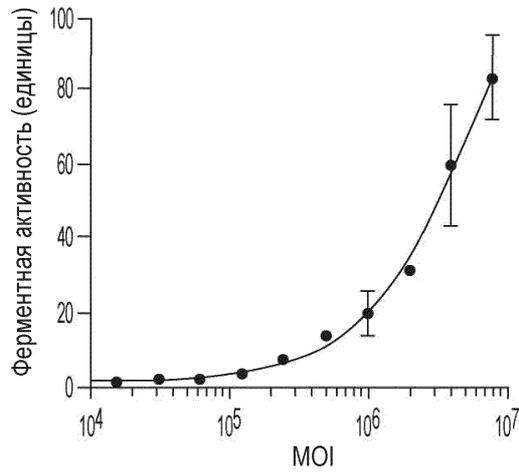
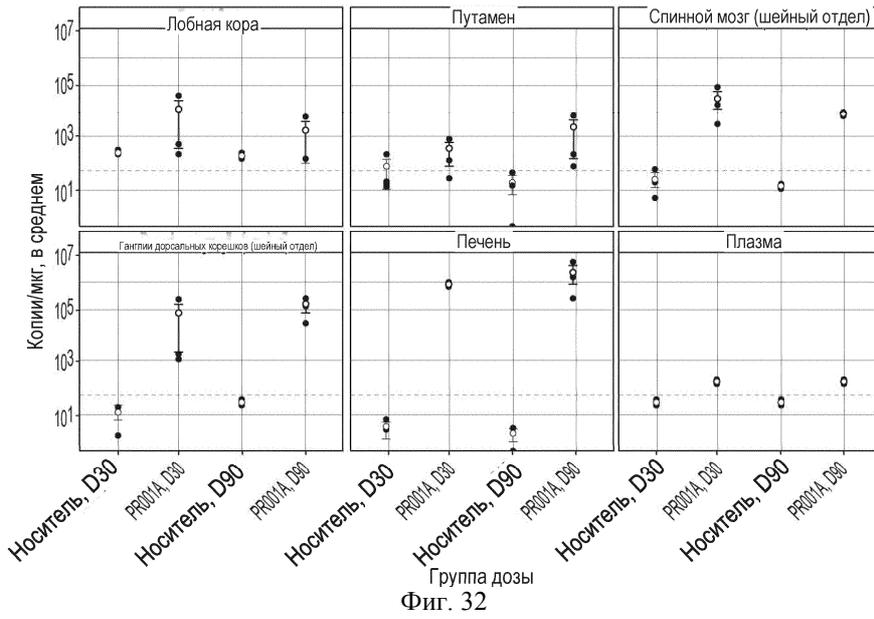
Фиг. 30

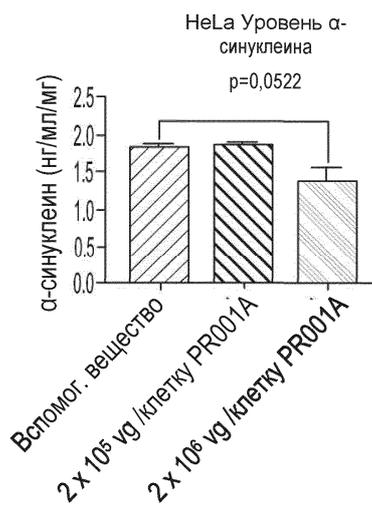


Фиг. 31А

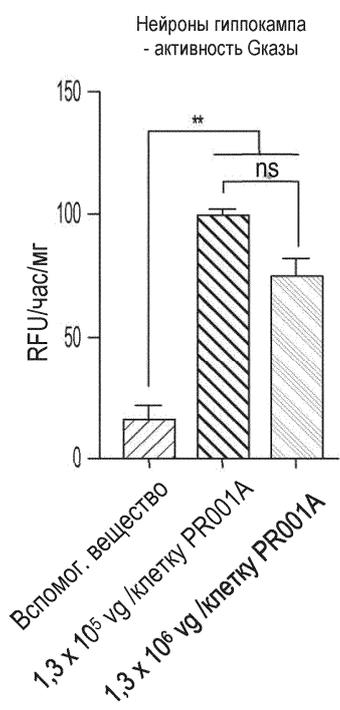


Фиг. 31В

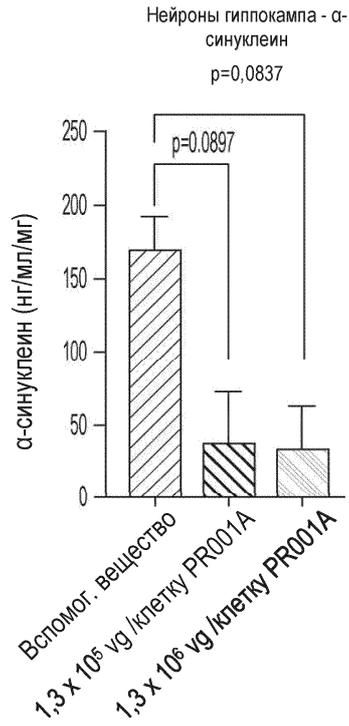




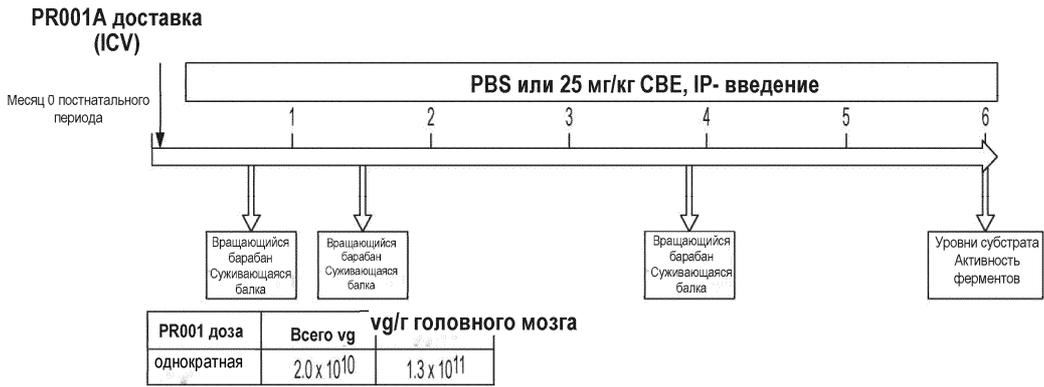
Фиг. 34В



Фиг. 35А

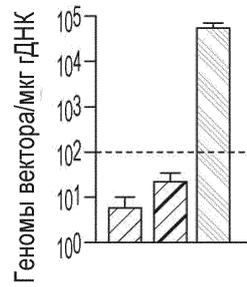


Фиг. 35B

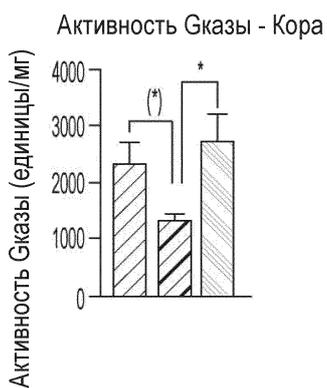


Фиг. 36

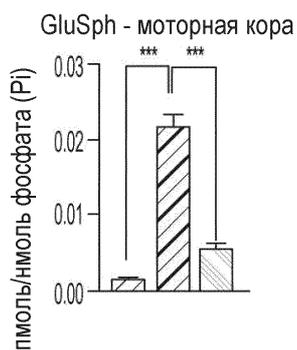
Биораспределение - Кора



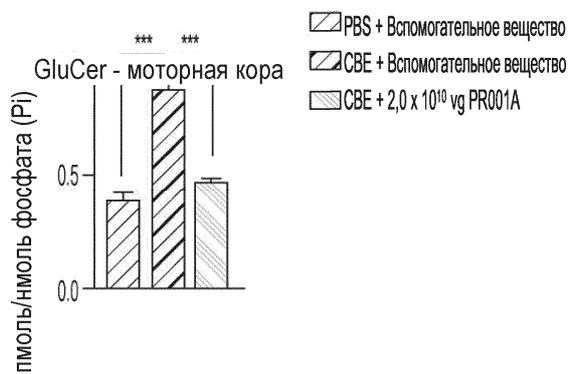
Фиг. 37A



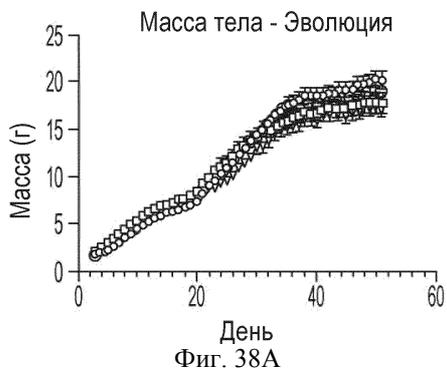
Фиг. 37В



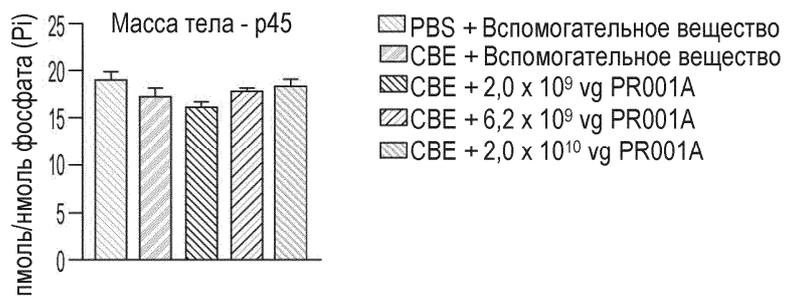
Фиг. 37С



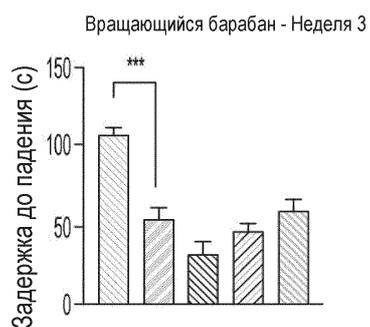
Фиг. 37D



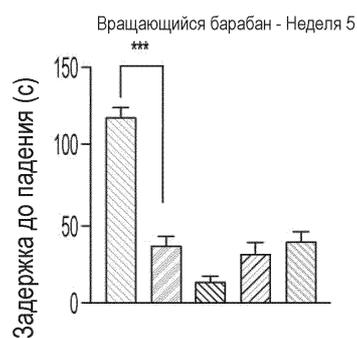
Фиг. 38А



Фиг. 38B



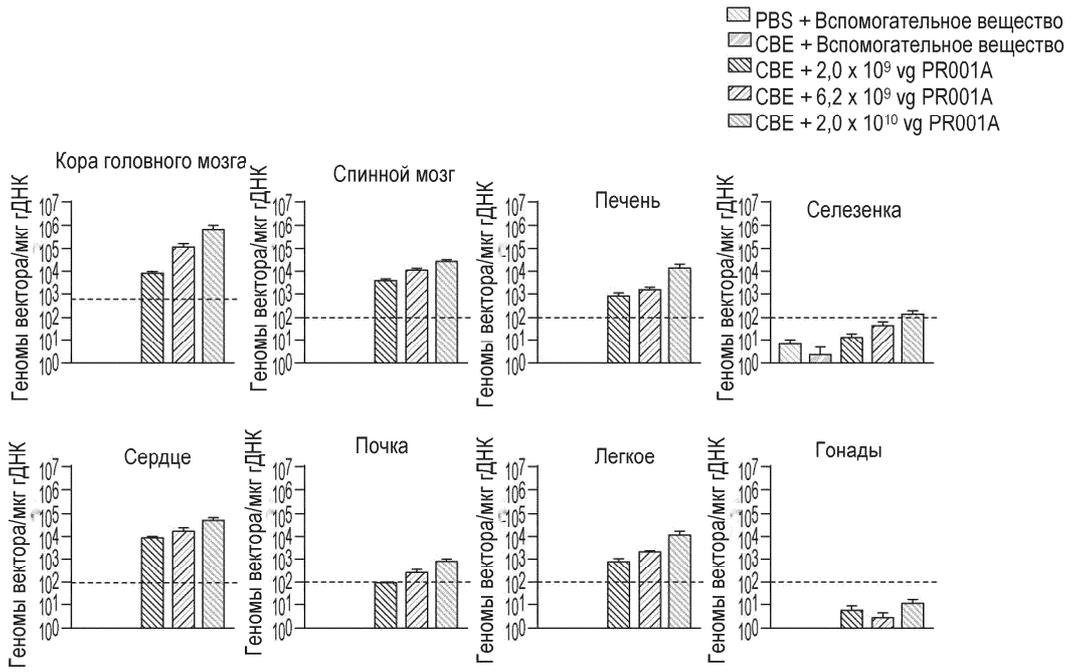
Фиг. 38C



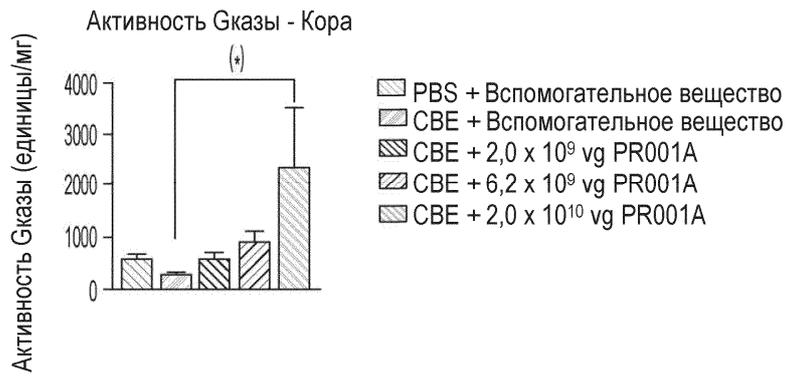
Фиг. 38D



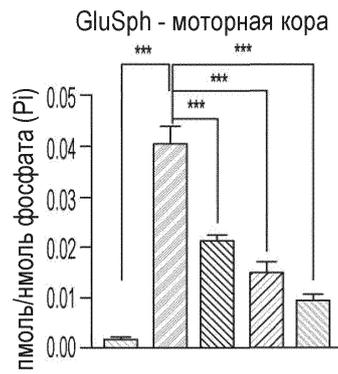
Фиг. 38E



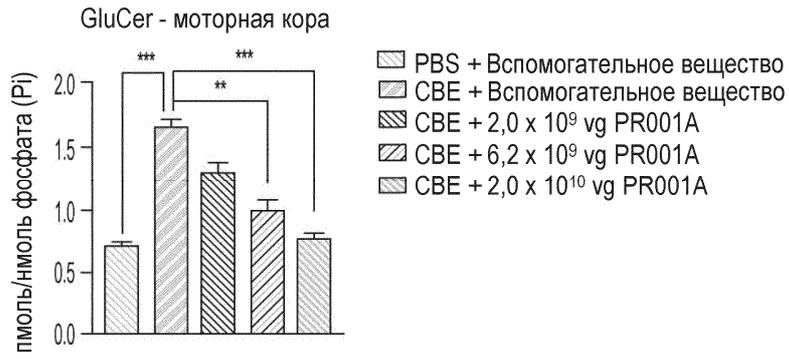
Фиг. 39



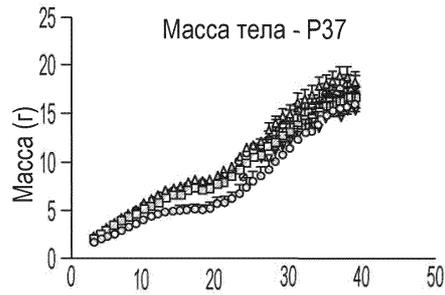
Фиг. 40



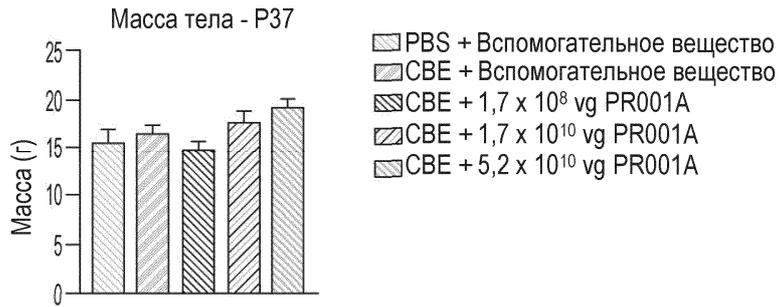
Фиг. 41А



Фиг. 41В



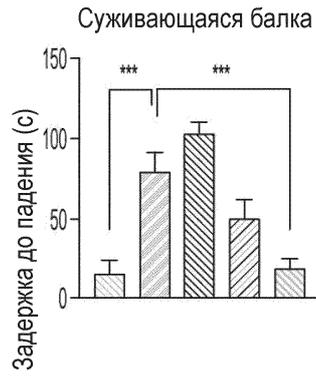
Фиг. 42А



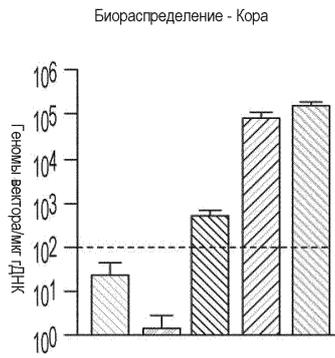
Фиг. 42В



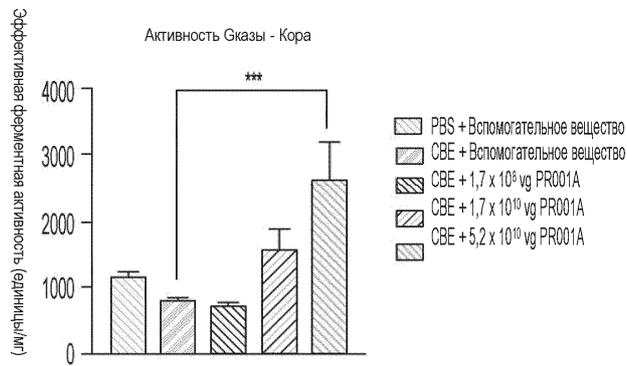
Фиг. 42С



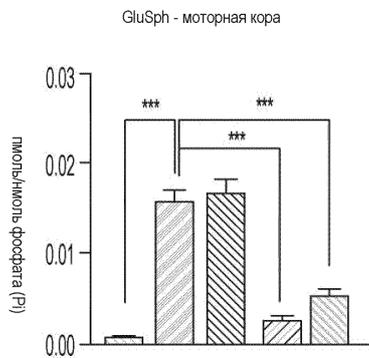
Фиг. 42D



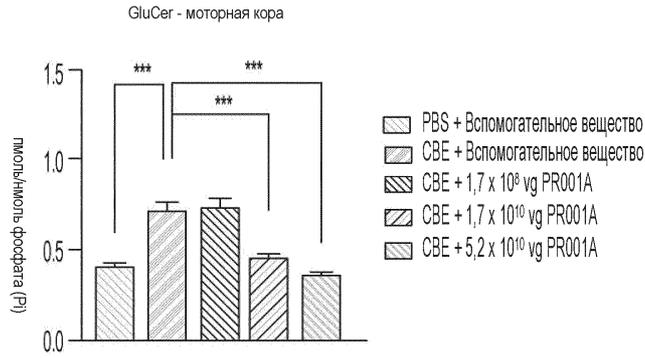
Фиг. 43А



Фиг. 43В



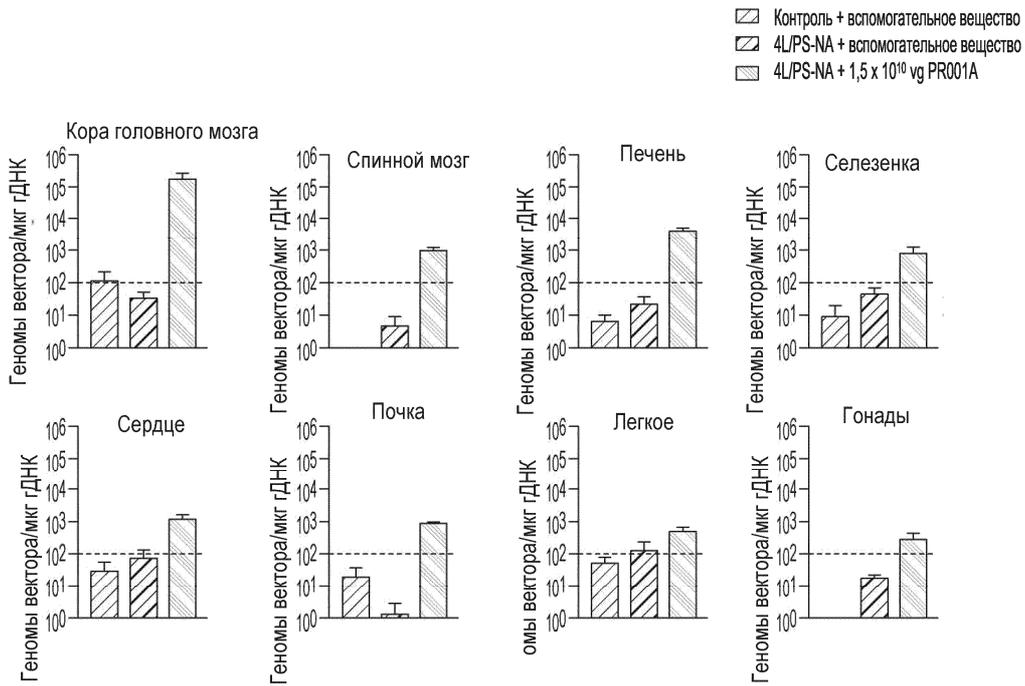
Фиг. 44А



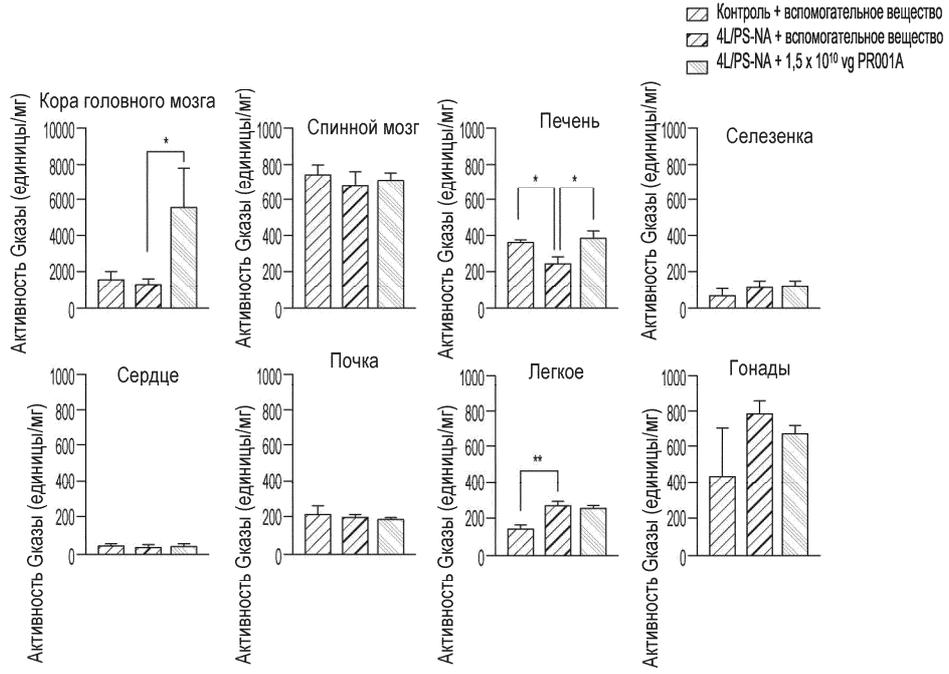
Фиг. 44В



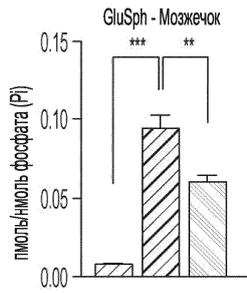
Фиг. 45



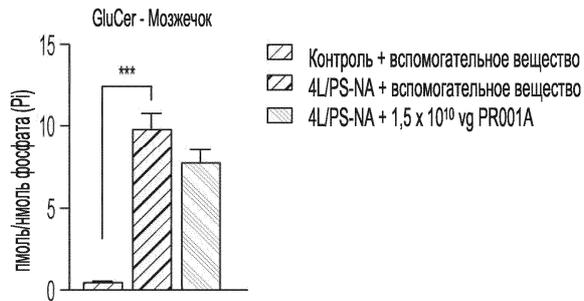
Фиг. 46



Фиг. 47

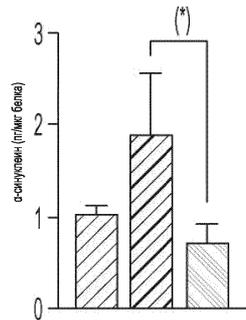


Фиг. 48А

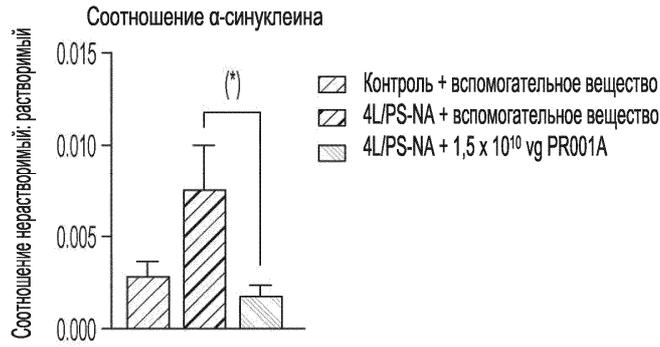


Фиг. 48В

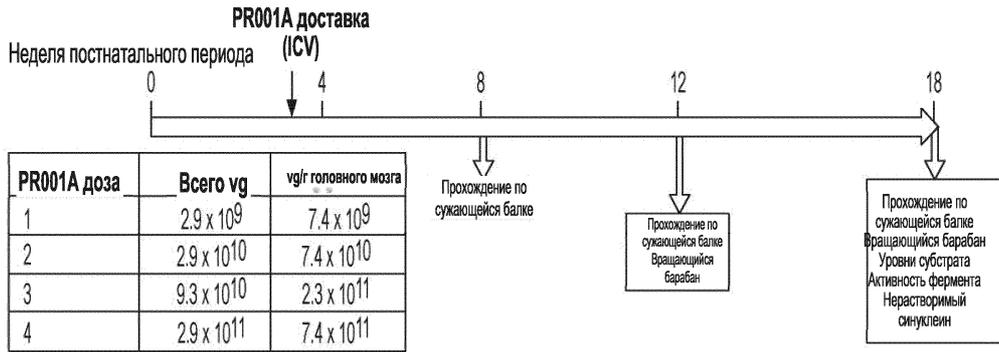
Нерастворимый α-синуклеин



Фиг. 49А

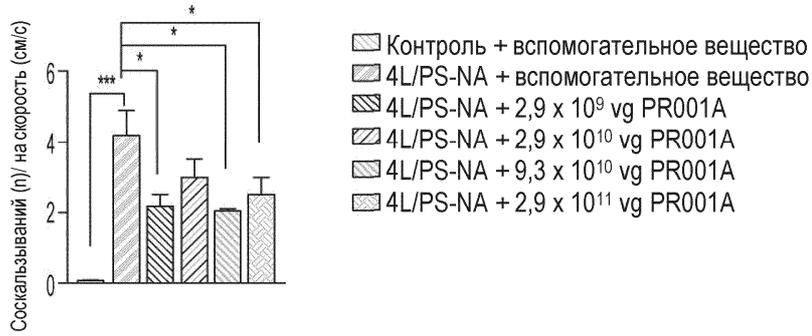


Фиг. 49В

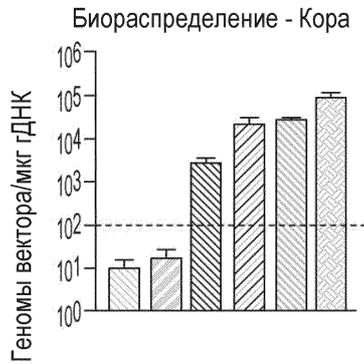


Фиг. 50

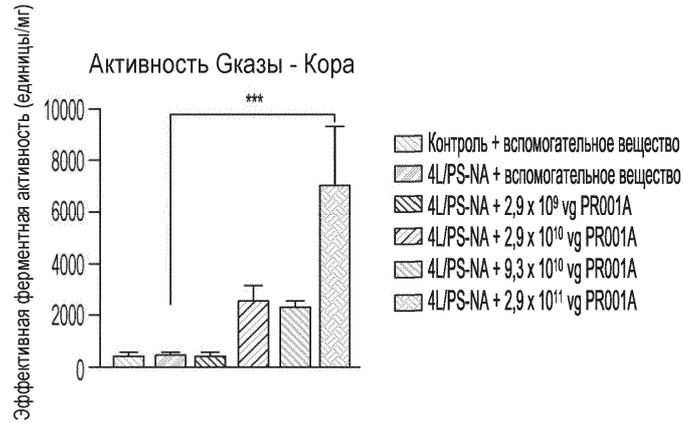
Прохождение по сужающейся балке - Неделя 18



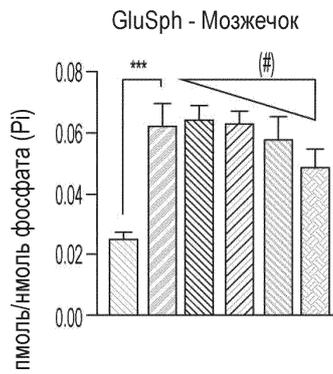
Фиг. 51



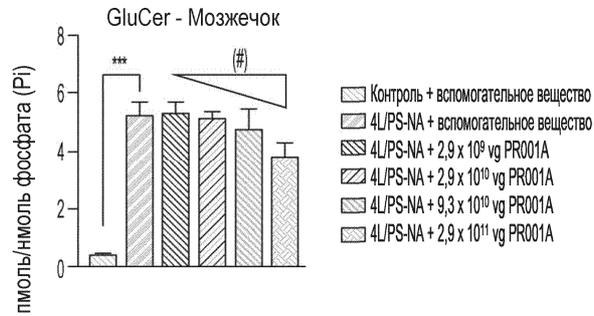
Фиг. 52А



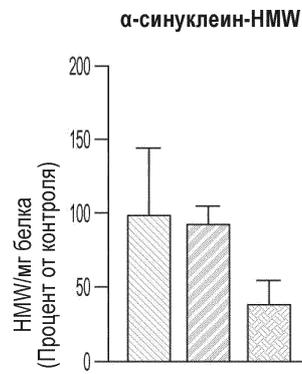
Фиг. 52В



Фиг. 53А

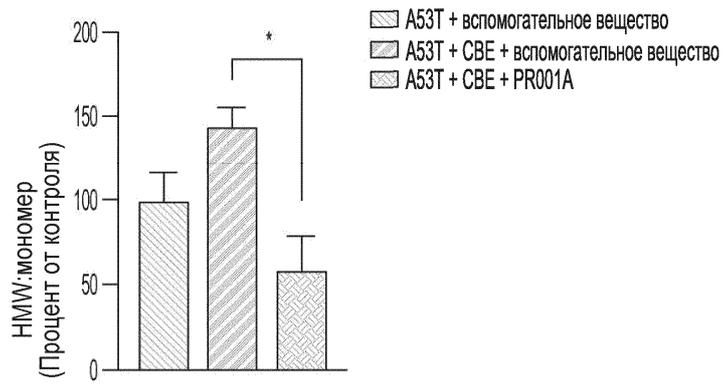


Фиг. 53В

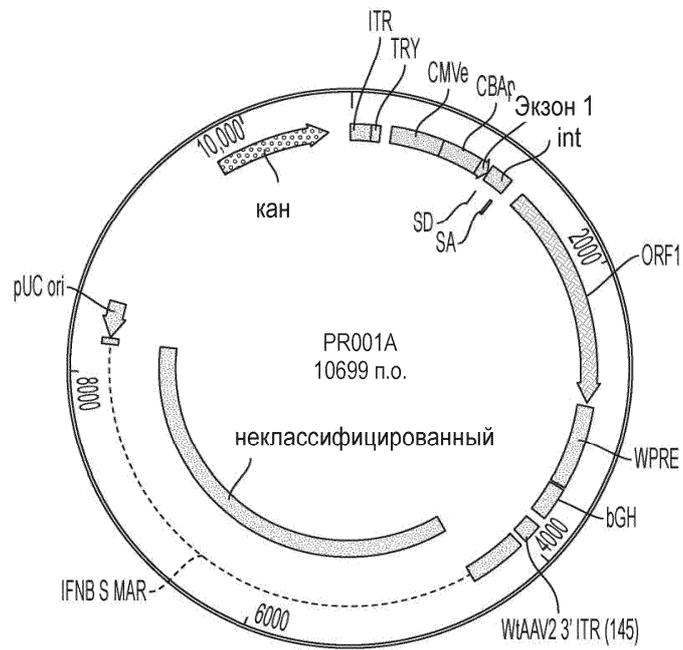


Фиг. 54А

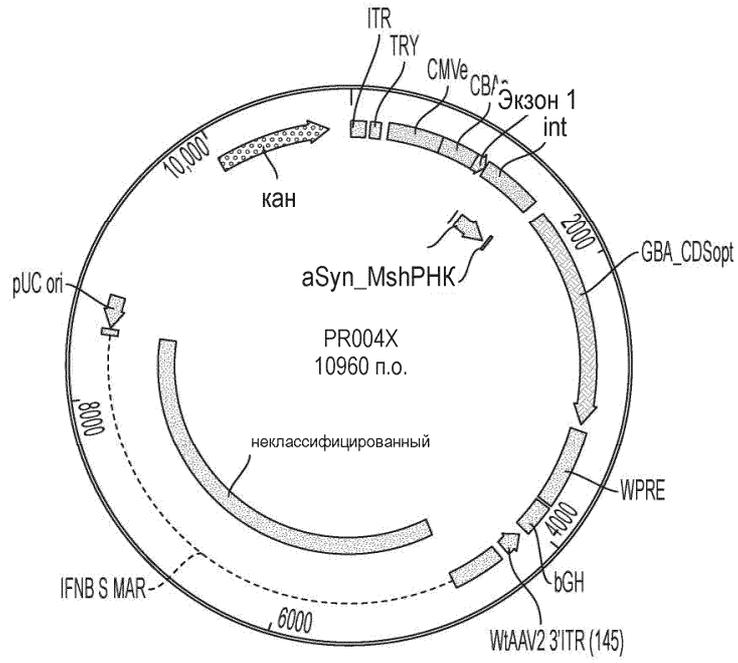
Соотношение α -синуклеина



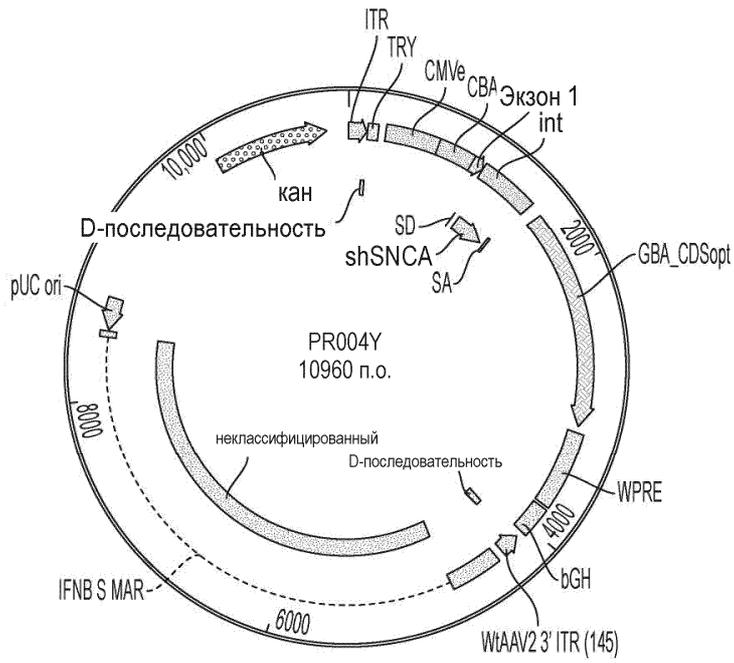
Фиг. 54В



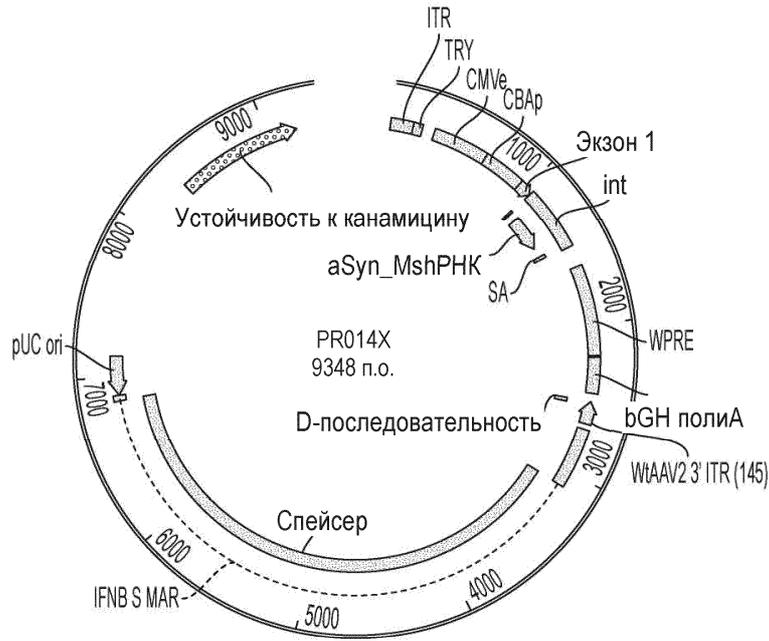
Фиг. 55



Фиг. 56



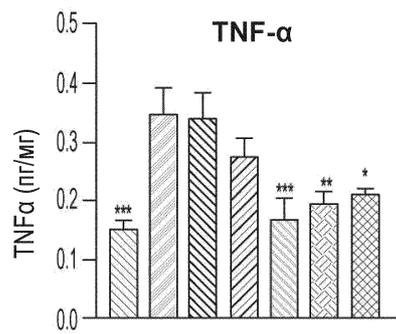
Фиг. 57



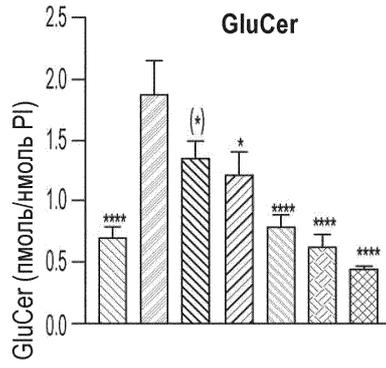
Фиг. 58



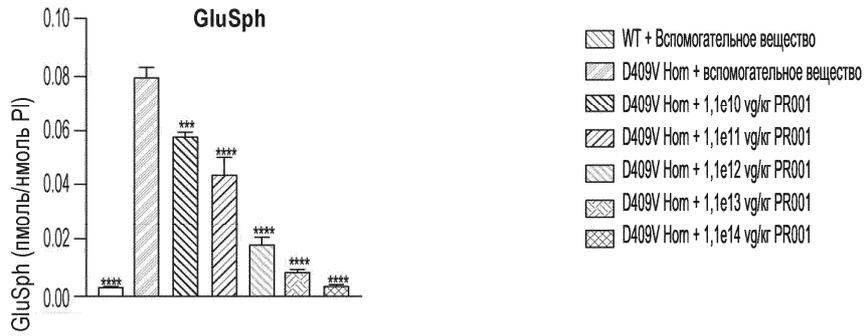
Фиг. 59



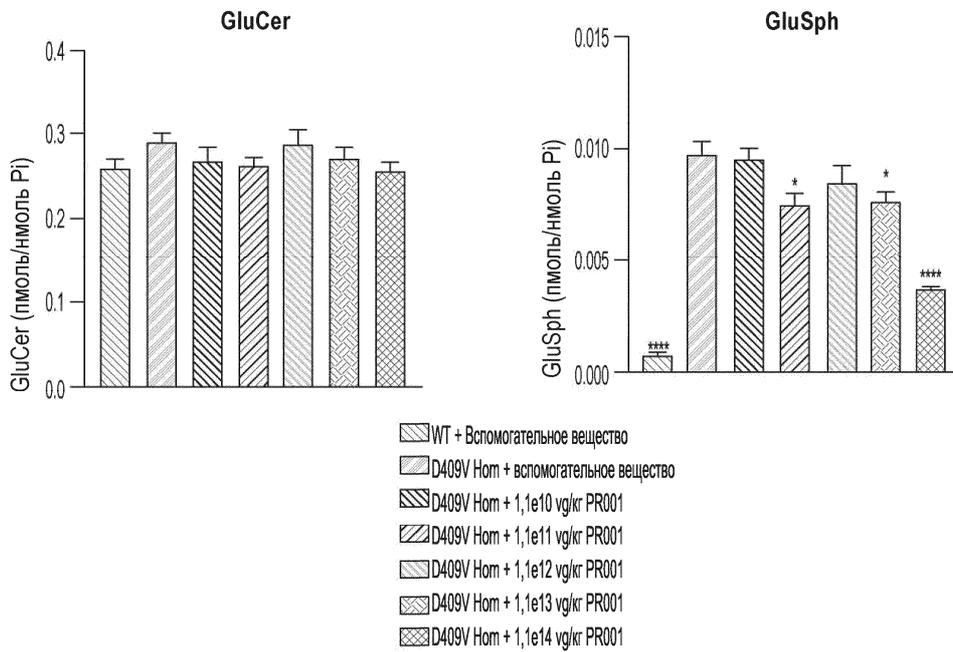
Фиг. 60А



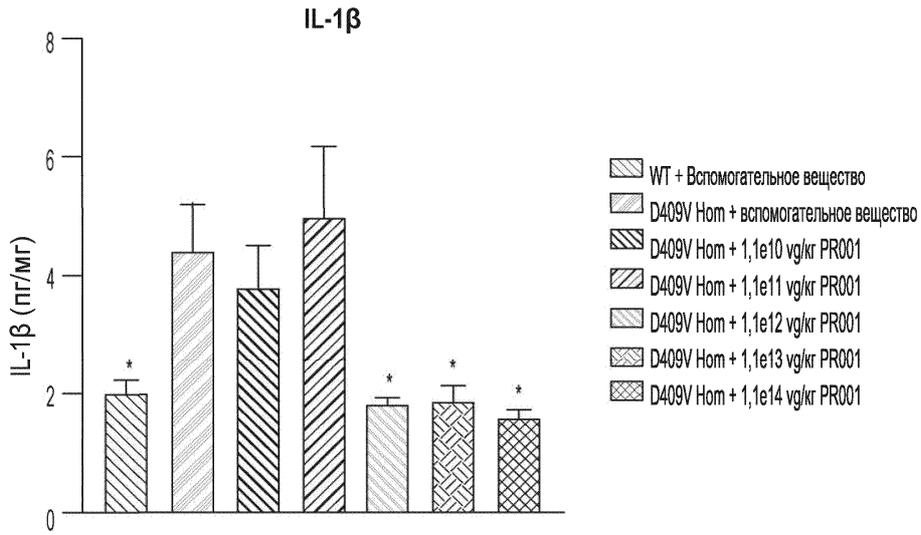
Фиг. 60B



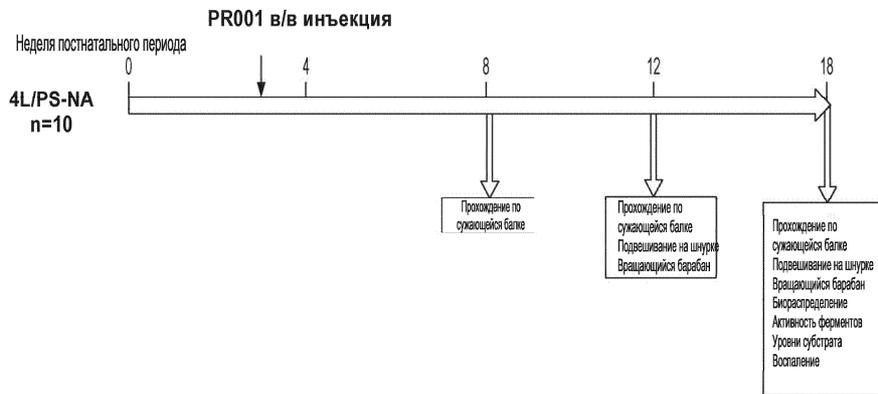
Фиг. 60C



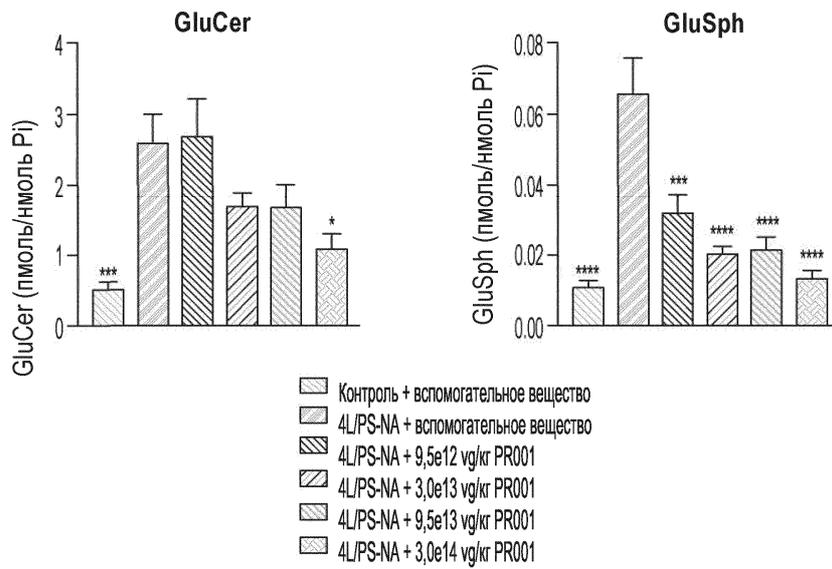
Фиг. 61A, B



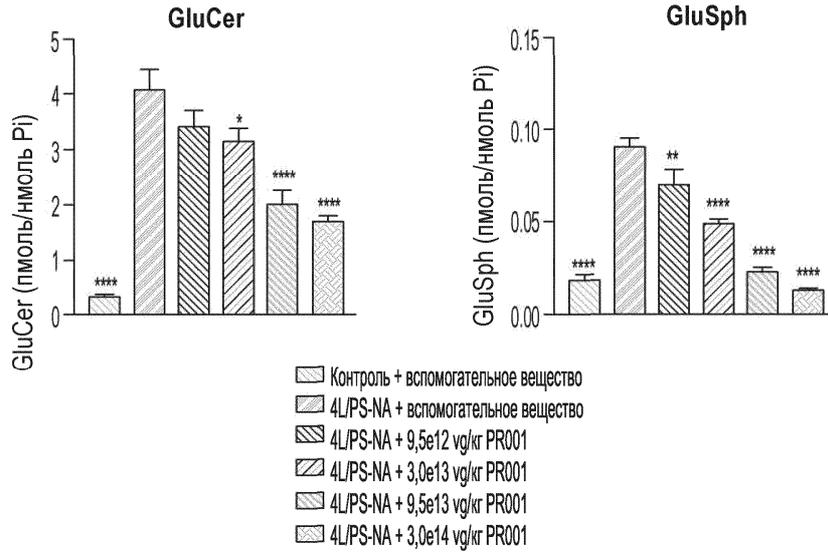
Фиг. 62



Фиг. 63

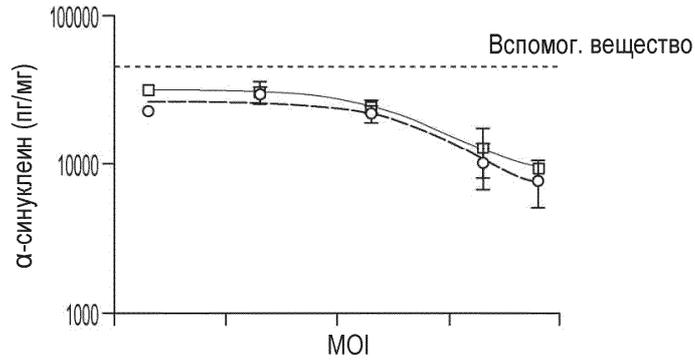


Фиг. 64А, В



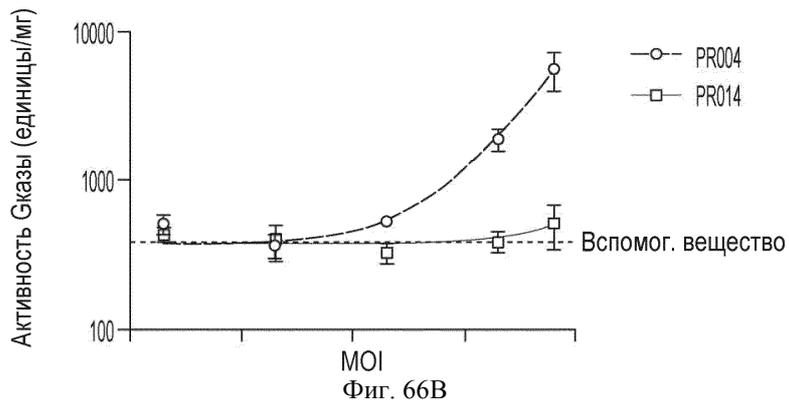
Фиг. 65А, В

α-синуклеин

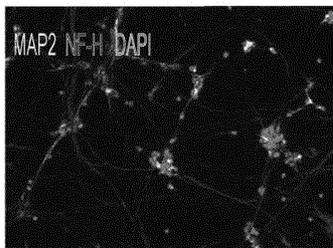
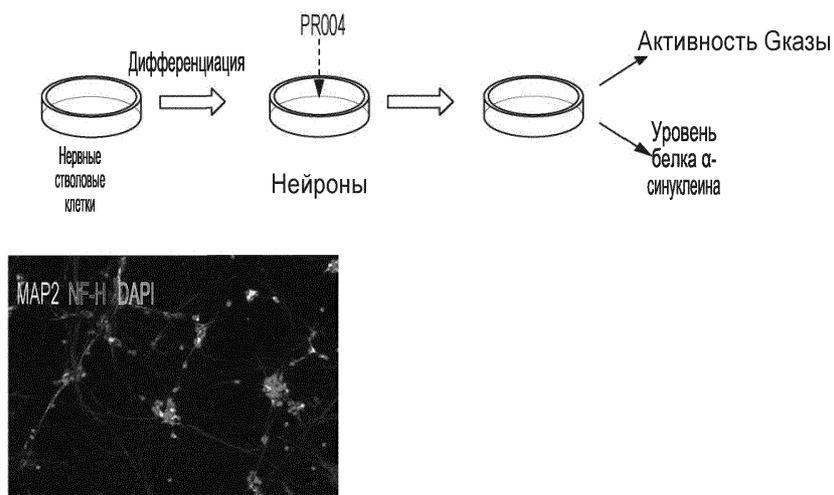


Фиг. 66А

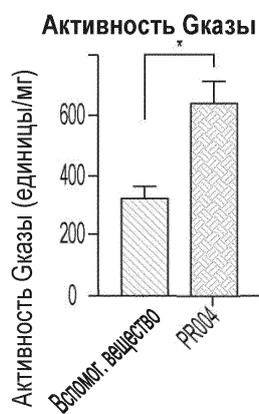
Активность Сказы



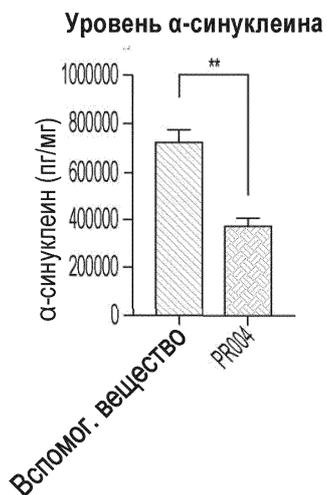
Фиг. 66В



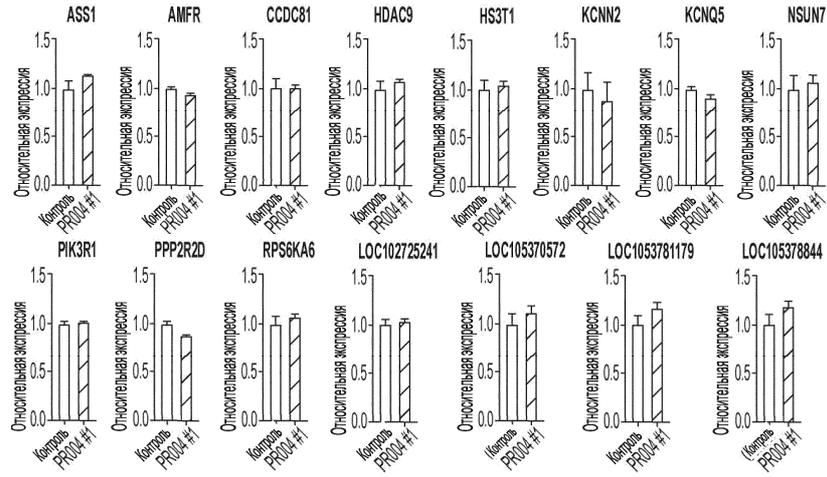
Фиг. 67А



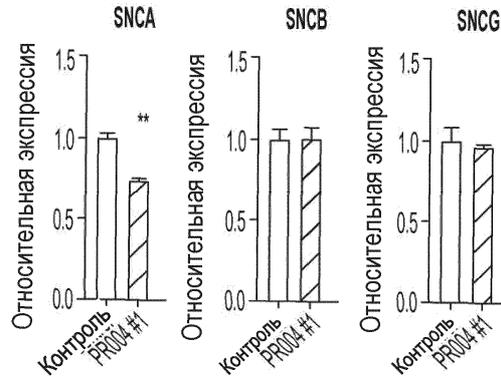
Фиг. 67В



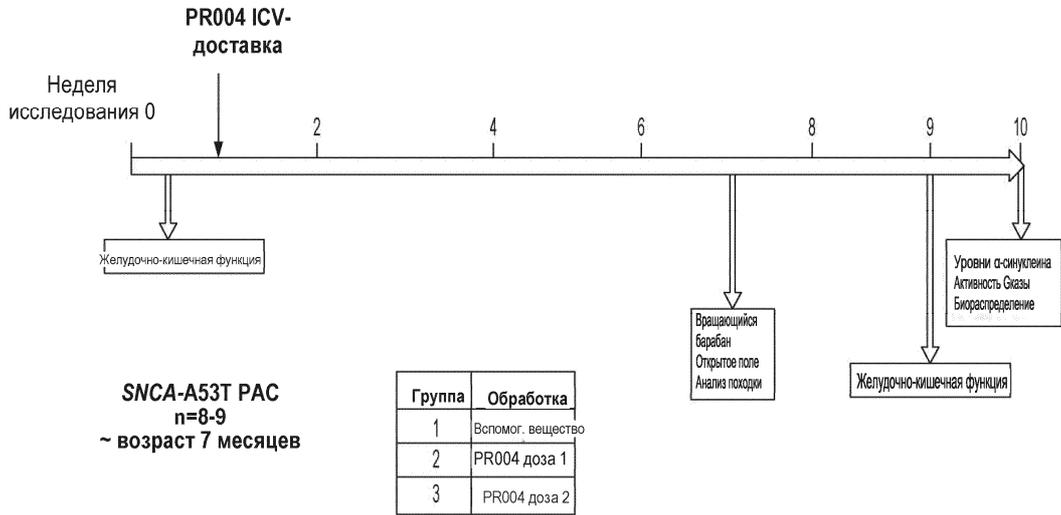
Фиг. 67С



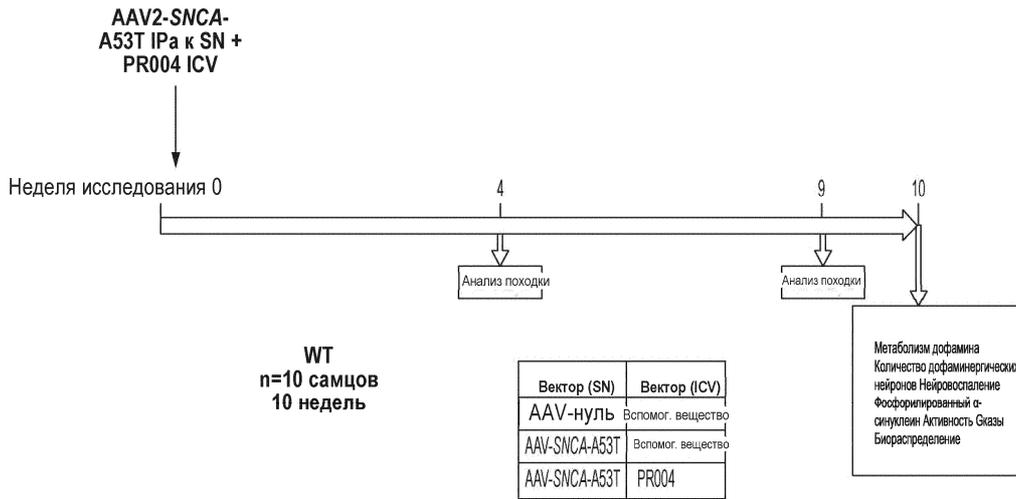
Фиг. 68А



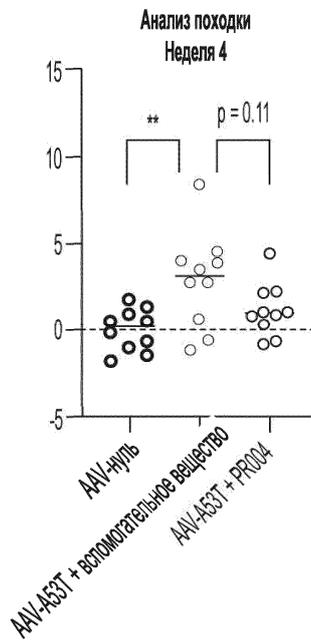
Фиг. 68В



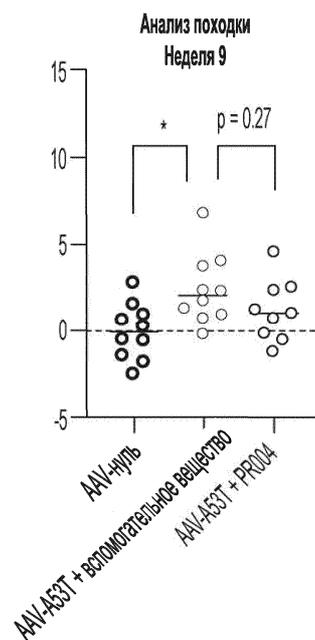
Фиг. 69



Фиг. 70



Фиг. 71А



Фиг. 71В

