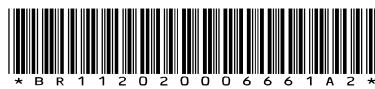




República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020006661-3 A2



* B R 1 1 2 0 2 0 0 0 6 6 6 1 A 2 *

(22) Data do Depósito: 03/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 13/10/2020

(54) Título: TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LIPOSSOMAIS

(51) Int. Cl.: C12N 15/86; C12N 9/16; A61K 48/00; C07K 14/00.

(30) Prioridade Unionista: 03/10/2017 US 62/567,311; 03/10/2017 US 62/567,310; 03/10/2017 US 62/567,301; 03/10/2017 US 62/567,319; 03/10/2017 US 62/567,296.

(71) Depositante(es): PREVAIL THERAPEUTICS, INC..

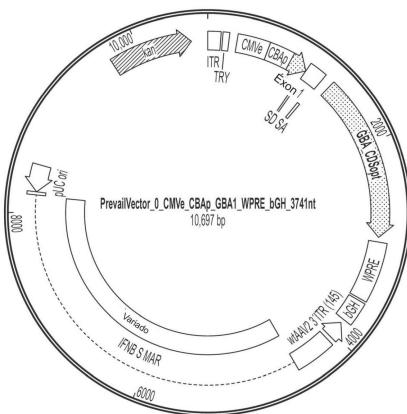
(72) Inventor(es): ASA ABELIOVICH; LAURA HECKMAN; HERVE RHINN.

(86) Pedido PCT: PCT US2018054227 de 03/10/2018

(87) Publicação PCT: WO WO/2019/070894 de 11/04/2019

(85) Data da Fase Nacional: 02/04/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se, em alguns aspectos, a composições e métodos para o tratamento de doenças associadas com a função lisossomal aberrante, por exemplo, o mal de Parkinson (PD) e a doença de Gaucher. Em algumas modalidades, a invenção provê construtos de expressão que compreendem um transgene que codifica a beta-Glucocerebrosidase (GBA) ou uma porção da mesma sozinho ou em combinação com um ou mais genes associados ao PD. Em algumas modalidades, a invenção provê métodos de mal de Parkinson mediante a administração de tais construtos de expressão a um indivíduo com necessidade dos mesmos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LIPOSSOMAIS**”.

PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

[0001] O presente pedido de patente reivindica o benefício sob 35 U.S.C.119(e) da data de depósito dos Pedidos de Patente Provisórios U.S. números de série 62/567.296, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSOMAIS", 62/567.311, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS", 62/567.319, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS", 62/567.301, depositado em 03 de outubro de 2018, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS", e 62/567.310, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS", em que os teores integrais de cada pedido de patente são incorporados ao presente documento a título de referência.

ANTECEDENTES

[0002] A doença de Gaucher é um erro de nascença raro do metabolismo de glicosesfingolipídio devido à deficiência de ácido de β- glucocerebrosidase lisossomal (Gcase, "GBA"). Os pacientes sofrem dos sintomas que não de CNS e averiguações que incluem a hepatosplenomeglia, a insuficiência de medula óssea que conduz à pancitopenia, distúrbios do pulmão e fibrose, e defeitos nos ossos. Além disso, um número significativo de pacientes sofre de manifestações neurológicas, incluindo movimentos e esgazejar dos olhos sacádicos defeituosos, convulsões, déficits cognitivos, desenvolvimento tardio, e distúrbios do movimento incluindo o mal de Parkinson.

[0003] Existem várias terapêuticas destinadas a combater a doença periférica e as principais manifestações clínicas da medula óssea hematopoiética

e das vísceras, incluindo as terapias de substituição de enzima tal como descrito a seguir, fármacos de moléculas pequenas do tipo chaperone que se ligam a Gcase defeituoso e melhoram a estabilidade, e a terapia de redução de substrato que bloqueia a produção de substrato que se acumula na doença de Gaucher que conduz aos sintomas e às averiguações. No entanto, outros aspectos da doença de Gaucher (em particular aqueles que afetam o esqueleto e o cérebro) parecem refratários ao tratamento.

SUMÁRIO

[0004] Além dos pacientes da doença de Gaucher (que possuem mutações em ambos os alelos cromossomais de gene GBA1), os pacientes com mutações em somente um alelo de GBA1 correm um risco altamente aumentado de mal de Parkinson (PD). A gravidade dos sintomas de PD - que incluem a dificuldade em caminhar, um tremor em repouso, a rigidez, e frequentemente a depressão, dificuldades de sono e declínio cognitivo - é correlacionada com o grau de redução da atividade da enzima. Desse modo, os pacientes da doença de Gaucher têm o curso mais grave, ao passo que o paciente com uma única mutação suave em GBA1 tem tipicamente um curso mais benigno. Os portadores de mutação também correm um risco elevado de outros distúrbios relacionados ao PD, incluindo a demência de corpo de Lewy, caracterizada pela disfunção executiva, psicose e um distúrbio do movimento tal como o PD, e a atrofia de múltiplos sistemas, com diminuição motora e cognitiva características. Não existe nenhuma terapia que altera o curso inexorável desses distúrbios.

[0005] Os déficits em enzimas tais como Gcase (por exemplo, o produto de gene do gene de GBA1), assim como as variantes comuns em muitos genes implicados na função de lisossoma ou no tráfego de macromoléculas ao lisossoma (por exemplo, a Proteína de Membrana Lisossomal 1 (LIMP), também indicada como SCARB2), foram associados com o risco aumentado de

PD. A invenção é baseada, em parte, nos construtos de expressão (por exemplo, vetores) que codificam um ou mais genes associados ao PD, por exemplo, Gcase, GBA2, prosaposina, progranulina, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1, GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2, TMEM106B, ou uma combinação de qualquer um dos citados acima (ou porções dos mesmos). Em algumas modalidades, as combinações dos produtos de genes descritos no presente documento agem em conjunto (por exemplo, sinergicamente) para reduzir um ou mais sinais e sintomas do PD quando expressas em um indivíduo.

[0006] Por conseguinte, em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica um Gcase (por exemplo, o produto de gene do gene de GBA1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de Gcase que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica Gcase codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 14 (por exemplo, tal como indicado na Sequência de Referência de NCBI NP_000148.2). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades o construto de expressão compreende repetições de terminais invertidos (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo, AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína Gcase.

[0007] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica Prosaposina (por exemplo, o produto de gene do gene de PSAP). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de prosaposina que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a

expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica prosaposina codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 16 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_002769.1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades o construto de expressão compreende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína prosaposina.

[0008] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica LIMP2/SCARB2 (por exemplo, o produto de gene do gene de SCARB2). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de SCARB2 que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica LIMP2/SCARB2 codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 18 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_005497.1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 29. Em algumas modalidades o construto de expressão compreende repetições de terminais invertidos (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo, AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína SCARB2.

[0009] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína GBA2 (por exemplo, o produto de gene do gene de GBA2). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de

GBA2 que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em célula de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o GBA2 codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 30 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_065995.1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 31. Em algumas modalidades o construto de expressão compreende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo, AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína GBA2.

[0010] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína GALC (por exemplo, o produto de gene do gene de GALC). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de GALC que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o GALC codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 33 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_000144.2). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 34. Em algumas modalidades o construto de expressão compreende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo, AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína GALC.

[0011] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína CTSB (por exemplo, o produto de gene do gene de CTSB). Em

algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de CTSB que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o CTSB codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 35 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_001899.1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 36. Em algumas modalidades, o construto de expressão compreende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo, AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína CTSB.

[0012] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína SMPD1 (por exemplo, o produto de gene do gene de SMPD1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de SMPD1 que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o SMPD1 codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 37 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_000534.3). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 38. Em algumas modalidades o construto de expressão compreende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo, AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína SMPD1.

[0013] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico

isolado que comprehende um construto de expressão que codifica a proteína GCH1 (por exemplo, o produto de gene do gene de GCH1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado comprehende uma sequência de codificação de GCH1 que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o GCH1 codifica uma proteína que comprehende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 45 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_000534.3). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado comprehende a sequência indicada na SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades o construto de expressão comprehende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo, AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína GCH1.

[0014] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que comprehende um construto de expressão que codifica a proteína RAB7L (por exemplo, o produto de gene do gene de RAB7L). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado comprehende uma sequência de codificação de RAB7L que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o RAB7L codifica uma proteína que comprehende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 47 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_003920.1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado comprehende a sequência indicada na SEQ ID NO: 48. Em algumas modalidades o construto de expressão comprehende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína RAB7L.

[0015] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que comprehende um construto de expressão que codifica a proteína VPS35 (por exemplo, o produto de gene do gene de VPS35). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado comprehende uma sequência de codificação de VPS35 que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o VPS35 codifica uma proteína que comprehende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 49 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_060676.2). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado comprehende a sequência indicada na SEQ ID NO: 50. Em algumas modalidades o construto de expressão comprehende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína VPS35.

[0016] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que comprehende um construto de expressão que codifica a proteína IL-34 (por exemplo, o produto de gene do gene de IL34). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado comprehende uma sequência de codificação de IL-34 que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o IL-34 codifica uma proteína que comprehende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 55 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_689669.2). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado comprehende a sequência indicada na SEQ ID NO: 56. Em algumas modalidades o construto de expressão comprehende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo AAV

ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína IL_34.

[0017] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína TREM2 (por exemplo, o produto de gene do gene de TREM). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de TREM2 que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o TREM2 codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 57 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_061838.1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 58. Em algumas modalidades o construto de expressão compreende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína TREM2.

[0018] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína TMEM106B (por exemplo, o produto de gene do gene de TMEM106B). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de TMEM106B que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o TMEM106B codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 63 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_060844.2). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada

na SEQ ID NO:64. Em algumas modalidades o construto de expressão compreende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína TMEM106B.

[0019] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a progranulina (por exemplo, o produto de gene do gene de PGRN). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de prosaposina que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas). Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica a progranulina (PRGN) codifica uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos tal como indicado na SEQ ID NO: 67 (por exemplo, tal como indicado na sequência de referência de NCBI NP_002078.1). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO:68. Em algumas modalidades o construto de expressão compreende repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociados (AAV), por exemplo AAV ITRs que flanqueiam a sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína prosaposina.

[0020] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica um primeiro produto de gene e um segundo produto de gene, em que cada produto de gene é selecionado independentemente de produtos de genes, ou porções dos mesmos, indicados na Tabela 1.

[0021] Em algumas modalidades, um primeiro produto de gene ou um segundo produto de gene são uma proteína Gcase, ou uma porção da mesma. Em algumas modalidades, um primeiro produto de gene é uma proteína Gcase e um segundo produto de gene é selecionado de GBA2, prosaposina, progranulina, LIMP2, GALC, CTSB, SMPD1,

GCH1, RAB7, VPS35, IL-34, TREM2 e TMEM106B.

[0022] Em algumas modalidades, um construto de expressão também codifica um ácido nucleico intermediário (por exemplo, shRNA, miRNA, dsRNA, etc.). Em algumas modalidades, um ácido nucleico intermediário inibe a expressão de α -Sinucleina (α -Syn). Em algumas modalidades, um ácido nucleico intermediário que visa a α -Sinucleina compreende uma sequência indicada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 20-25. Em algumas modalidades, um ácido nucleico intermediário que visa a α -Sinucleina se liga (por exemplo, hibridiza com) uma sequência indicada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 20-25.

[0023] Em algumas modalidades, um ácido nucleico intermediário inibe a expressão de TMEM106B. Em algumas modalidades, um ácido nucleico intermediário que visa TMEM106B compreende uma sequência indicada na SEQ ID NO: 64 ou 65. Em algumas modalidades, um ácido nucleico intermediário que visa TMEM106B se liga a (por exemplo, hibridiza com) uma sequência indicada nas SEQ ID NOs: 64 ou 65.

[0024] Em algumas modalidades, um construto de expressão compreende ainda um ou mais promotores. Em algumas modalidades, um promotor é um promotor de beta actina de galinha (CBA), um promotor de CAG, um promotor de CD68, ou um promotor de JeT. Em algumas modalidades, um promotor é um promotor de pol II de RNA (por exemplo, ou um promotor de pol III de RNA (por exemplo, U6, etc.).

[0025] Em algumas modalidades, um construto de expressão compreende ainda um sítio de entrada ribossomal interno (IRES). Em algumas modalidades, um IRES fica localizado entre um primeiro produto de gene e um segundo produto de gene.

[0026] Em algumas modalidades, um construto de expressão compreende ainda uma sequência de codificação de peptídeo autoclivável. Em algumas modalidades, um peptídeo autoclivável é um peptídeo de T2A.

[0027] Em algumas modalidades, um construto de expressão compreende duas sequências de repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adenoassociado (AAV). Em algumas modalidades, as sequências de ITR flanqueiam um primeiro produto de gene e um segundo produto de gene (por exemplo, são arranjados tal como segue das extremidade 5' à extremidade 3': ITR-primeiro produto de gene-segundo produto de gene-ITR). Em algumas modalidades, uma das sequências de ITR de um ácido nucleico isolado não possui um sítio de resolução terminal funcional (trs). Por exemplo, em algumas modalidades, uma das ITRs é uma ΔITR.

[0028] A invenção refere-se, em alguns aspectos, aos vetores do rAAV que compreendem um ITR que tem uma região "D" modificada (por exemplo, uma sequência que seja modificada relativo ao selvagem-tipo AAV2 ITR, NO. SEQ de D do ID: 29). Em algumas modalidades, a ITR que tem a região modificada de D é o 5' ITR do vetor do rAAV. Em algumas modalidades, uma região "D" modificada compreende uma sequência de "S", por exemplo tal como indicado na SEQ ID NO: 26. Em algumas modalidades, a ITR que tem a região "D" modificada é o 3' ITR do vetor do rAAV. Em algumas modalidades, uma região "D" modificada compreende um 3'ITR em que a região de "D" é posicionada no fim 3' da ITR (por exemplo, no fim exterior ou terminal da ITR relativo à inserção do transgene do vetor). Em algumas modalidades, uma região "D" modificada compreende uma sequência tal como indicado na SEQ ID NO: 26 ou 27.

[0029] Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado (por exemplo, um vetor de rAAV) compreende uma região TRY. Em algumas modalidades, uma região TRY compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 28.

[0030] Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado descrito pela invenção compreende ou consiste em, ou codifica em um peptídeo que

tem a sequência indicada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-78.

[0031] Em alguns aspectos, a invenção provê um vetor que compreende um ácido nucleico isolado tal como descrito pela invenção. Em algumas modalidades, um vetor é um plasmídeo, ou um vetor viral. Em algumas modalidades, um vetor viral é um vetor de AAV recombinante (rAAV) ou um vetor de Baculovirus. Em algumas modalidades, um vetor de rAAV é de um só cordão (por exemplo, DNA de um cordão).

[0032] Em alguns aspectos, a invenção provê uma célula hospedeira que compreende um ácido nucleico isolado tal como descrito pela invenção ou um vetor tal como descrito pela invenção.

[0033] Em alguns aspectos, a invenção provê um vírus adenoassociado recombinante (rAAV) que compreende uma proteína de capsídeo e um ácido nucleico isolado ou um vetor tal como descrito pela invenção.

[0034] Em algumas modalidades, uma proteína de capsídeo é capaz de cruzar a barreira sangue-cérebro, por exemplo, uma proteína de capsídeo AAV9 ou uma proteína de capsídeo AAVrh.10. Em algumas modalidades, um rAAV transduz células neuronais e células não neuronais do sistema nervoso central (CNS).

[0035] Em alguns aspectos, a invenção provê um método de tratamento de um indivíduo que tem ou é suspeito de ter mal de Parkinson, em que o método compreende a administração ao indivíduo de uma composição (por exemplo, uma composição que compreende um ácido nucleico isolado ou um vetor ou um rAAV) tal como descrito pela invenção.

[0036] Em algumas modalidades, a administração compreende a injeção direta ao CNS de um indivíduo. Em algumas modalidades, a injeção direta é uma injeção intracerebral, injeção intraparenquimal, injeção intratecal, injeção intra-cisterna manga, ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, a injeção direta ao CNS de um indivíduo compreende a aplicação realçada por convecção (CED).

[0037] Em algumas modalidades, a administração compreende a injeção periférica. Em algumas modalidades, a injeção periférica é uma injeção intravenosa.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0038] A FIGURA 1 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma).

[0039] A FIGURA 2 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e LIMP2 (SCARB2) ou uma porção da mesma. As sequências de codificação de Gcase e LIMP2 são separadas por um sítio de entrada ribosomal interno (IRES).

[0040] A FIGURA 3 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e LIMP2 (SCARB2) ou uma porção da mesma. A expressão de cada uma das sequências de codificação de Gcase e LIMP2 é dirigida por um promotor separado.

[0041] A FIGURA 4 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma), LIMP2 (SCARB2) ou uma porção da mesma, e um RNA intermediário para α-Syn.

[0042] A FIGURA 5 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma), Prosaposina (por exemplo, PSAP ou uma porção da mesma), e um RNA intermediário para α-Syn.

[0043] A FIGURA 6 é um diagrama esquemático que ilustra uma

modalidade de um vetor que comprehende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e Prosaposina (por exemplo, PSAP ou uma porção da mesma). As sequências de codificação de Gcase e Prosaposina são separadas por um sítio de entrada ribossomal interno (IRES).

[0044] A FIGURA 7 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que comprehende um construto de expressão que codifica uma Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma). Nesta modalidade, o vetor comprehende um elemento do promotor de CBA (CBA), que consiste em quatro porções: o intensificador CMV (CMVe), o promotor de CBA (CBAp), Exon 1 e o ítron (int) para expressar constitutivamente a sequência de codificação otimizada com códon de GBA1 humano. A região 3' também contém um elemento regulador de WPRE seguido por uma cauda de polyA bGH. Três sítios de ativação reguladores transpcionais são incluídos na extremidade 5' da região do promotor: TATA, RBS e YY1. As ITRs flanqueadoras permitem a compactação correto das sequências intermediárias. Duas variantes da sequência de 5' ITR (caixa inserida) foram avaliadas; estas têm várias diferenças de nucleotídeo dentro da região "D" de 20 nucleotídeos de AAV2 ITR do tipo selvagem. Em algumas modalidades, um vetor de rAAV contém a sequência de nucleotídeos do domínio "D" mostrada na linha superior. Em algumas modalidades, um vetor de rAAV comprehende um domínio "D" mutante (por exemplo, um domínio "S", com as mudanças de nucleotídeos mostradas na linha inferior).

[0045] A FIGURA 8 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade do vetor descrito na FIGURA 6

[0046] A FIGURA 9 mostra dados representativos para a aplicação de um rAAV que comprehende um transgene que codifica uma Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) em um modelo de camundongo de CBE de mal de Parkinson. Aplicação diária IP do veículo

de PBS, 25 mg/kg de CBE, 37,5 mg/kg de CBE, ou 50 mg/kg de CBE (da esquerda para a direita) iniciado em P8. A sobrevivência (lado esquerdo superior) foi verificada duas vezes ao um dia e o peso (lado direito superior) foi verificada diariamente. Todos os grupos começaram com n = 8. O comportamento foi avaliado pela distância total percorrida no Campo Aberto (lado esquerdo inferior) em P23 e a latência na queda em Rotarod (metade inferior) em P24. Os níveis dos substratos de GCase foram analisados no córtex de camundongos em PBS e grupos de tratamento de 25 mg/kg de CBE, ambos com (dia 3) e sem (dia 1) retirada de CBE. Os níveis agregados de GluSph e de GalSph (lado direito inferior) são mostrados como pmol por mg do peso úmido do tecido. A média é apresentada. As barras de erro são SEM. * p < 0,05; ** p < 0,01; p < 0,001, valores p nominais para grupos de tratamento por meio de regressão linear.

[0047] A FIGURA 10 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um projeto de estudo para a dose máxima de rAAV em um modelo de camundongo de CBE. Resumidamente, o rAAV foi aplicado através de injeção ICV em P3, e o tratamento diário de CBE foi iniciado em P8. O comportamento foi avaliado nos ensaios de Campo Aberto e Rotarod em P24-25 e os níveis de substrato foram medidos em P36 e P38.

[0048] A FIGURA 11 mostra os dados representativos para a avaliação em vida da dose máxima de rAAV em um modelo de camundongo de CBE. Em P3, os camundongos foram tratados com o excipiente ou 8.8e9 vg rAAV-GBA1 através de aplicação via ICV. A aplicação diária IP de PBS ou de 25 mg/kg de CBE foi iniciada em P8. No final do estudo, a metade dos camundongos foi sacrificada um dia após a sua último dose de CBE em P36 (dia 1) ao passo que a metade restante foi através de 3 dias da retirada de CBE antes do sacrifício em P38 (Dia 3). Todos os grupos de tratamento (excipiente + PBS n = 8, rAAV-GBA1+ PBS n

= 7, excipiente + CBE n = 8, e variante + CBE n = 9) foram pesados diariamente (lado esquerdo superior), e o peso em P36 foi analisado (lado direito superior). O comportamento foi avaliado pela distância total percorrida no Campo Aberto em P23 (lado esquerdo inferior) e a latência na queda em Rotarod em P24 (lado direito inferior), avaliado para cada animal como o número médio através de 3 experimentos. Devido à letalidade, n = 7 para o excipiente + grupo de CBE para os ensaios comportamentais, ao passo que n = 8 para todos os grupos restantes. A média através dos animais é apresentada. As barras de erro são SEM.
 * p < 0,05; *** p < 0,001, valores p nominais para grupos de tratamento por meio de regressão linear nos animais tratados com CBE.

[0049] A FIGURA 12 mostra dados representativos para a avaliação bioquímica da dose máxima de rAAV em um modelo de camundongo de CBE. Os córtex de todos os grupos de tratamento (excipiente + PBS n = 8, variante + PBS n = 7, excipiente + CBE n = 7, e variante + CBE n = 9) foram usados para medir a atividade de GCase (lado esquerdo superior), os níveis de GluSph (lado direito superior), os níveis de GluCer (lado esquerdo inferior), e os genomas do vetor (lado direito inferior) nos grupos antes (dia 1) ou após (dia 3) a retirada de CBE. A biodistribuição é mostrada como genomas do vetor por 1 µg de DNA genômico. A média é apresentada. As barras de erro são SEM. (*)p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001, valores p nominais para grupos de tratamento por meio de regressão linear nos animais tratados com CBE, com os dias da coleta e o gênero corrigidos como covariadas.

[0050] A FIGURA 13 mostra os dados representativos para as correlações comportamentais e bioquímicas em um modelo de camundongo de CBE após a administração do excipiente + PBS, excipiente + CBE, e variante + grupos de tratamento de CBE. Através dos grupos de tratamento, o desempenho em Rotarod foi correlacionado negativamente com a acumulação de GluCer (A, p = 0,0012 por meio de regressão linear), e a acumulação de GluSph foi

correlacionada negativamente com a atividade aumentada de GCase (B, p = 0,0086 por meio de regressão linear).

[0051] A FIGURA 14 mostra os dados representativos para a biodistribuição da variante em um modelo de camundongo de CBE. A presença de genomas do vetor foi avaliada no fígado, no baço, no rim e nas gônadas para todos os grupos de tratamento (excipiente + PBS n = 8, variante + PBS n = 7, excipiente + CBE n = 7, e variante + CBE n = 9). A biodistribuição é mostrada como genomas do vetor por 1 µg do DNA genômico. A presença do genoma do vetor foi quantificada por PCR quantitativa ao usar uma curva padrão de referência do vetor; a concentração do DNA genômico foi avaliada por meio da medição da densidade óptica de A260. A média é apresentada. As barras de erro são SEM. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, valores p nominais para grupos do tratamento por meio de regressão linear nos animais tratados com CBE, com os dias de coleta e o gênero corrigidos como covariadas.

[0052] A FIGURA 15 mostra os dados representativos para a avaliação em vida da dose de rAAV que varia em um modelo de camundongo de CBE. Os camundongos receberam o excipiente ou uma de três doses diferentes de rAAV-GBA1 ICV por meio da aplicação em P3: 3.2e9 vg, 1.0e10vg, ou 3.2e10 vg. Em P8, o tratamento diário IP de 25 mg/kg CBE foi iniciado. Os camundongos que receberam o excipiente e CBE ou o excipiente e PBS serviram como controles. Todos os grupos de tratamento começaram com n = 10 (5M/5F) por grupo. Todos os camundongos foram sacrificados um dia após a sua dose final de CBE (P38-P40). Todos os grupos de tratamento foram pesados diariamente, e o seu peso foi analisado em P36. O desempenho motor foi avaliado pela latência na queda em Rotarod em P24 e a latência para atravessar o Travessa afunilada em P30. Devido à letalidade precoce, o número de camundongos que participam nos ensaios comportamentais era: excipiente + PBS n = 10, excipiente + CBE n = 9, e 3.2e9 vg rAAV-GBA1+

CBE n = 6, 1.0e10 vg rAAV-GBA1+ CBE n = 10, 3.2e10 vg rAAV-GBA1+ CBE n = 7. A média é apresentada. As barras de erro são SEM; * p < 0,05; ** p < 0,01 para valores p nominais por meio de regressão linear nos grupos tratados com CBE, com o gênero corrigido como uma covariada.

[0053] A FIGURA 16 mostra os dados representativos para a avaliação bioquímica da dose de rAAV que varia em um modelo de camundongo de CBE. Os córtex de todos os grupos de tratamento (excipiente + PBS n = 10, excipiente + CBE n = 9, e 3.2e9 vg rAAV-GBA1+ CBE n = 6, 1.0e10 vg rAAV-GBA1+ CBE n = 10, 3.2e10 vg rAAV-GBA1+ CBE n = 7) foram usados para medir a atividade de GCase, os níveis de Glu-Sph, os níveis de GluCer, e os genomas do vetor. A atividade de GCase é mostrada como ng de GCase por mg da proteína total. Os níveis de GluSph e de GluCer são mostrados como pmol por mg de peso úmido do tecido. A biodistribuição é mostrada como genomas do vetor por 1 µg do DNA genômico. A presença do genoma do vetor é quantificada por PCR quantitativa ao usar uma curva padrão de referência do vetor; a concentração do DNA genômico foi avaliada por meio da medição da densidade óptica de A260. A presença do genoma do vetor também foi medida no fígado (E). A média é apresentada. As barras de erro são SEM. ** p < 0,01; *** p < 0,001 para valores p nominais por meio de regressão linear nos grupos tratados com CBE, com o gênero corrigido como uma covariada.

[0054] A FIGURA 17 mostra os dados representativos para a análise de travessa afunilada na dose máximo de rAAV-GBA1 em um modelo de camundongo genético. O desempenho motor dos grupos de tratamento (WT + excipiente, n = 5), 4l/ps-na + excipiente (n = 6), e 4l/ps-na + rAAV-GBA1 (n = 5) foi analisado por Caminhar na Travessa 4 semanas após a administração de rAAV-GBA1. O total de escorregadelas e o tempo ativo é mostrado como total para 5 experimentos em feixes

diferentes. A velocidade e as escorregadelas por velocidade são mostradas como a média de 5 experimentos em feixes diferentes. A média é apresentada. As barras de erro são SEM.

[0055] A FIGURA 18 mostra os dados representativos para a expressão *in vitro* de construtos de rAAV que codificam a proteína programulina (PGRN). O painel esquerdo mostra uma curva padrão de ensaio ELISA da programulina (PGRN). O painel inferior mostra uma resposta à dose da expressão de PGRN medida pelo ensaio ELISA em lisatos de célula de células HEK293T transduzidas com rAAV. MOI = multiplicidade da infecção (genomas do vetor por célula).

[0056] A FIGURA 19 mostra os dados representativos para a expressão *in vitro* de construtos de rAAV que codificam GBA1 em combinação com Prosaposina (PSAP), SCARB2, e/ou um ou mais ácidos nucleicos inibidores. Os dados indicam que a transfecção das células HEK293 com cada construto resultou na superexpressão dos transgenes de interesse em relação às células transfetadas simuladas.

[0057] A FIGURA 20 é um diagrama esquemático que ilustra os vetores de um rAAV que compreendem uma região "D" localizada na "parte externa" da ITR (por exemplo, proximal ao terminal da ITR em relação à inserção de transgene ou ao construto de expressão) (topo) e um vetor de rAAV do tipo selvagem que tem ITRs no "interior" do vetor (por exemplo, proximal à inserção de transgene do vetor).

[0058] A FIGURA 21 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica GBA2 ou uma porção da mesma, e um RNA intermediário para α-Syn.

[0059] A FIGURA 22 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e Galactosilceramidase (por exemplo, GALC ou uma porção da mesma).

A expressão das sequências de codificação de Gcase e Galactosilceramidase é separada por uma sequência de peptídeo autoclivável de T2A.

[0060] A FIGURA 23 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e Galactosilceramidase (por exemplo, GALC ou uma porção da mesma). A expressão das sequências de codificação de Gcase e Galactosilceramidase é separada por uma sequência de peptídeo autoclivável de T2A.

[0061] A FIGURA 24 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma), catepsina B (por exemplo, CTSB ou uma porção da mesma), e um RNA intermediário para α -Syn. A expressão das sequências de codificação de Gcase e catepsina B é separada por uma sequência de peptídeo autoclivável de T2A.

[0062] A FIGURA 25 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma), Esfingomielina fosfodiesterase 1 (por exemplo, SMPD1, uma porção da mesma, e um RNA intermediário para α -Syn.

[0063] A FIGURA 26 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e Galactosilceramidase (por exemplo, GALC ou uma porção da mesma). As sequências de codificação de Gcase e Galactosilceramidase são separadas por um sítio de entrada ribossomal interno (IRES).

[0064] A FIGURA 27 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e catepsina B (por exemplo, CTSB ou uma porção da mesma). A expressão de cada uma das

sequências de codificação de Gcase e catepsina B é dirigida por um promotor separado.

[0065] A FIGURA 28 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma), GCH1 (por exemplo, GCH1 ou uma porção da mesma), e um RNA intermediário para α -Syn. As sequências de codificação de Gcase e GCH1 são separadas por uma sequência de peptídeo autoclivável de T2A

[0066] A FIGURA 29 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma), RAB7L1 (por exemplo, RAB7L1 ou uma porção da mesma), e um RNA intermediário para α -Syn. As sequências de codificação de Gcase e RAB7L1 são separadas por uma sequência de peptídeo autoclivável de T2A.

[0067] A FIGURA 30 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma), GCH1 (por exemplo, GCH1 ou uma porção da mesma), e um RNA intermediário para α -Syn. A expressão das sequências de codificação de Gcase e GCH1 é um sítio de entrada ribossomal interno (IRES).

[0068] A FIGURA 31 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica VPS35 (por exemplo, VPS35 ou uma porção da mesma) e RNAs intermediários para α -Syn e TMEM106B.

[0069] A FIGURA 32 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma), IL-34 (por exemplo, IL34 ou uma porção da mesma), e um RNA intermediário para α -

Syn. As sequências de codificação de Gcase e IL-34 são separadas pela sequência de peptídeo autoclivável de T2A.

[0070] A FIGURA 33 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e IL-34 (por exemplo, IL34 ou uma porção da mesma). As sequências de codificação de Gcase e IL-34 são separadas por um sítio de entrada ribossomal interno (IRES).

[0071] A FIGURA 34 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e TREM2 (por exemplo, TREM2 ou uma porção da mesma). A expressão de cada uma das sequências de codificação de Gcase e TREM2m é dirigida por um promotor separado.

[0072] A FIGURA 35 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica Gcase (por exemplo, GBA1 ou uma porção da mesma) e IL-34 (por exemplo, IL34 ou uma porção da mesma). A expressão de cada uma das sequências de codificação de Gcase e IL-34 é dirigida por um promotor separado.

[0073] As FIGURAS 36A e 36B mostram os dados representativos para a superexpressão de TREM2 e GBA1 nas células HEK293 em relação às células transduzidas, tal como medido por meio de qPCR e ELISA. A FIGURA 36A mostra os dados para a superexpressão de TREM2. A FIGURA 36B mostra os dados para a superexpressão de GBA1 do mesmo construto.

[0074] A FIGURA 37 mostra os dados representativos que indicam o silenciamento bem sucedido de SCNA *in vitro* pelo ensaio de repórter de GFP (topo) e pelo ensaio de α-Syn (base).

[0075] A FIGURA 38 mostra os dados representativos que indicam

o silenciamento bem sucedido de TMEM106B *in vitro* pelo ensaio de repórter de GFP (topo) e pelo ensaio de α -Syn (base).

[0076] A FIGURA 39 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica PGRN.

[0077] A FIGURA 40 mostra os dados para a transdução das células HEK293 ao usar os rAAVs que têm ITRs com a colocação da sequência "D" do tipo selvagem (círculos) ou alternativa (por exemplo, "parte externa"; quadrados). Os rAAVs que têm ITRs colocadas na "parte externa" podem transduzir células tão eficientemente quanto os rAAVs que têm ITRs do tipo selvagem.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0078] A invenção é baseada, em parte, em composições e métodos para a expressão de combinações de produtos de genes associados ao PD em um indivíduo. Um produto de gene pode ser uma proteína, um fragmento (por exemplo, uma porção) de uma proteína, um ácido nucleico intermediário que inibe um gene associado ao PD, etc. Em algumas modalidades, um produto de gene é uma proteína ou um fragmento de proteína codificado por um gene associado ao PD. Em algumas modalidades, um produto de gene é um ácido nucleico intermediário (por exemplo, shRNA, siRNA, miRNA, amiRNA, etc.) que inibe um gene associado ao PD.

[0079] Um gene associado ao PD refere-se a um gene que codifica um produto de gene que é associado genética, bioquímica ou funcionalmente com o PD. Por exemplo, foi observado que os indivíduos que têm mutações no gene GBA1 (que codifica a proteína Gcase) têm um risco maior de desenvolver o PD em comparação aos indivíduos que não têm uma mutação em GBA1. Em um outro exemplo, o PD é associado com a acumulação dos agregados de proteína que compreendem a proteína α -Sinucleina (α -Syn); por conseguinte, o SCNA (que codifica α -Syn) é

um gene associado ao PD. Em algumas modalidades, um cassete de expressão descrito no presente documento codifica uma forma do tipo selvagem ou não mutante de um gene associado ao PD (ou sua sequência de codificação). Os exemplos de genes associados ao PD são listados na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de genes associados ao PD

Nome	Gene	Função	Nº de Acesso NCBI
Proteína de membrana de lisossoma 2	SCARB2/LIMP2	Receptor lisossomal para a glucosilceramidase (foco em GBA)	NP_005497.1 (Isoforma 1), NP_001191184.1 (Isoforma 2)
Prosaposina	PSAP	Precursor para as saposinas A, B, C e D, que ficam localizadas no compartimento lisossomal e facilitam o catabolismo da glicoesfingolipídios com grupos de oligossacáridos curtos	AAH01503.1, AAH07612.1, AAH04275.1, AAA60303.1
beta-glucocerebrosidase	GBA1	Cliva a ligação beta-glucosídio de glucocerebroside	NP_001005742.1 (Isoforma 1), NP_001165282.1 (Isoforma 2), NP_001165283.1 (Isoforma 3)
Glucosilceramidase não lisossomal	GBA2	Catalisa a conversão de glucosilceramida em glicose e ceramida livres	NP_065995.1 (Isoforma 1), NP_001317589.1 (Isoforma 2)
Galactosilceramidase	GALC	Remove a galactose dos derivados de ceramida	EAW81359.1 (Isoforma CRA_a), EAW81360.1 (Isoforma CRA_b), EAW81362.1 (Isoforma CRA_c)
Esfingomielina fosfodiesterase 1	SMPD1	Converte a esfingomielina em ceramida	EAW68726.1 (Isoforma CRA_a), EAW68727.1 (Isoforma CRA_b), EAW68728.1 (Isoforma CRA_c), EAW68729.1 (Isoforma CRA_d)
Catepsina B	CTSB	Tiol protease que deve participar da degradação celular e rotação de proteínas; também implicada na invasão de tumor e na metástase	AAC37547.1, AAH95408.1, AAH10240.1
RAB7, oncogene RAS de membro da família do tipo 1	RAB7L1	Regula o transporte vesicular	AAH02585.1
Proteína associada com a classificação de proteína vacuolar 35	VPS35	Componente de complexo seletivo de carga de retrômero	NP_060676.2

GTP ciclohidrolase 1	<i>GCH1</i>	Responsável pela hidrólise de trifosfato de guanosina para formar trifosfato de 7,8-diidroneopterina	AAH25415.1
Interleucina 34	<i>IL34</i>	Aumenta o crescimento ou a sobrevivência de monócitos; induz a atividade mediante a ligação do receptor 1 do fator estimulador de colônia receptor	AAH29804.1
Receptor ativador expresso em células mieloides 2	<i>TREM2</i>	Forma um complexo de sinalização de receptor com a proteína de ligação TYRO da proteína tirosina cinase; funciona na imuno resposta e pode estar envolvida na inflamação crônica	AAF69824.1
Progranulina	<i>PGRN</i>	Desempenha um papel no desenvolvimento, inflamação, proliferação de células e homeostase de proteína	NP_002087.1

Ácidos nucleicos e vetores isolados

[0080] Um ácido nucleico isolado pode ser o DNA ou o RNA. A invenção provê, em alguns aspectos, ácidos nucleicos isolados (por exemplo, vetores de rAAV) que compreendem um construto de expressão que codifica um ou mais genes associados a PD, por exemplo, uma Gcase (por exemplo, o produto de gene do gene de GBA1) ou uma porção da mesma. A Gcase, também indicada como β -glucocerebrosidase ou GBA, refere-se a uma proteína lisossomal que cliva a ligação beta-glucosídica do glucocerebrosídeo químico, um intermediário no metabolismo de glicolipídios. Nos seres humanos, a Gcase é codificada pelo gene GBA1, localizado no cromossoma 1. Em algumas modalidades, GBA1 codifica um peptídeo que é representado pela Sequência de Referência de NCBI NP_000148.2 (SEQ ID NO: 14). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de Gcase que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas), tal como a sequência indicada na SEQ ID NO: 15.

[0081] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico

isolado que comprehende um construto de expressão que codifica a Pro-saposina (por exemplo, o produto de gene do gene de PSAP). A Pro-saposina é uma glicoproteína precursoras para proteínas ativadoras de esfingolipídios (saposinas) A, B, C e D, que facilitam o catabolismo dos glioessfingolipídios com grupos de oligossacarídeos curtos. Nos seres humanos, o gene de PSAP fica localizado no cromossoma 10. Em algumas modalidades, PSAP codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_002769.1 (por exemplo, a SEQ ID NO: 16). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado comprehende uma sequência de codificação de prosaposina que é otimizada com códons (por exemplo, otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos, por exemplo, células humanas), tal como a sequência indicada na SEQ ID NO: 17.

[0082] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que comprehende um construto de expressão que codifica LIMP2/SCARB2 (por exemplo, o produto de gene do gene de SCARB2). SCARB2 refere-se a uma proteína de membrana que regula o transporte lisossomal e endossomal dentro de uma célula. Nos seres humanos, o gene SCARB2 fica localizado no cromossoma 4. Em algumas modalidades, o gene SCARB2 codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_005497.1 (SEQ ID NO: 18). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado comprehende a sequência indicada na SEQ ID NO: 19. Em algumas modalidades o ácido nucleico isolado comprehende uma sequência de codificação de SCARB2 que é otimizada com códons.

[0083] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que comprehende um construto de expressão que codifica a proteína GBA2 (por exemplo, o produto de gene do gene de GBA2). A proteína GBA2 refere-se à glucosilceramidase não lisossomal. Nos seres humanos, o gene GBA2 fica localizado no cromossoma 9. Em algumas

modalidades, o gene GBA2 codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_065995.1 (SEQ ID NO: 30). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 31. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de GBA2 que é otimizada com códons.

[0084] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína GALC (por exemplo, o produto de gene do gene de GALC). A proteína GALC refere-se à Galactosilceramidase (ou à galactocerebrosidase), que é uma enzima que hidrolisa as ligações de éster de galactose de galactocerebrosídeo, galactosilesfingosina, lactosilceramida e monogalactosildiglicerídeo. Nos seres humanos, o gene de GALC fica localizado no cromossoma 14. Em algumas modalidades, o gene de GALC codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_000144.2 (SEQ ID NO: 33). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 34. Em algumas modalidades o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de GALC que é otimizada com códons.

[0085] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína CTSB (por exemplo, o produto de gene do gene de CTSB). A proteína CTSB refere-se à catepsina B, que é uma cisteína protease lisosomal que desempenha um papel importante na proteólise intracelular. Nos seres humanos, o gene de CTSB fica localizado no cromossoma 8. Em algumas modalidades, o gene de CTSB codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_001899.1 (SEQ ID NO: 35). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 36. Em algumas mo-

dalidades o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de CTSB que é otimizada com códons.

[0086] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína SMPD1 (por exemplo, o produto de gene do gene de SMPD1). A proteína SMPD1 refere-se à esfingomielina fosfodiesterase 1, que é uma enzima de hidrolase que está envolvida no metabolismo de esfingolipídios. Nos seres humanos, o gene SMPD1 fica localizado no cromossoma 11. Em algumas modalidades, o gene SMPD1 codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_000534.3 (SEQ ID NO: 37). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 38. Em algumas modalidades o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de SMPD1 que é otimizada com códons.

[0087] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína GCH1 (por exemplo, o produto de gene do gene de GCH1). A proteína GCH1 refere-se à GTP ciclohidrolase I, que é uma enzima de hidrolase que faz parte das vias de biossíntese de folato e biopterina. Nos seres humanos, o gene GCH1 fica localizado no cromossoma 14. Em algumas modalidades, o gene GCH1 codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_000152.1 (SEQ ID NO: 45). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de GCH1 que é otimizada com códons.

[0088] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína RAB7L (por exemplo, o produto de gene do gene de RAB7L). A proteína RAB7L refere-se a RAB7, oncogene RAS membro da família

do tipo 1, que é uma proteína de ligação de GTP. Nos seres humanos, o gene de RAB7L fica localizado no cromossoma 1. Em algumas modalidades, o gene de RAB7L codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_003920.1 (SEQ ID NO: 47). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 48. Em algumas modalidades o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de RAB7L que é otimizada com códons.

[0089] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína VPS35 (por exemplo, o produto de gene do gene de VPS35). A proteína VPS35 refere-se à proteína associada à classificação de proteína vacuolar 35, que faz parte de um complexo de proteína envolvido no transporte retrógrado de proteínas dos endossomas à rede trans-Golgi. Nos seres humanos, o gene VPS35 fica localizado no cromossoma 16. Em algumas modalidades, o gene VPS35 codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_060676.2 (SEQ ID NO: 49). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO:50. Em algumas modalidades o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de VPS35 que é otimizada com códons.

[0090] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína IL-34 (por exemplo, o produto de gene do gene de IL34). A proteína IL-34 refere-se à interleucina 34, que é uma citocina que aumenta o crescimento e a sobrevivência dos monócitos. Nos seres humanos, o gene IL34 fica localizado no cromossoma 16. Em algumas modalidades, o gene IL34 codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_689669.2 (SEQ ID NO: 55). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada

na SEQ ID NO: 56. Em algumas modalidades o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de IL-34 que é otimizada com códons.

[0091] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína TREM2 (por exemplo, o produto de gene do gene de TREM2). A proteína TREM2 refere-se ao receptor de ativação expresso nas células mieloides 2, que é um receptor da superfamília de imunoglobulina encontrado em células mieloides. Nos seres humanos, o gene TREM2 fica localizado no cromossoma 6. Em algumas modalidades, o gene TREM2 codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_061838.1 (SEQ ID NO: 57). Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 58. Em algumas modalidades um ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de TREM2 que é otimizada com códons.

[0092] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica a proteína TMEM106B (por exemplo, o produto de gene do gene de TMEM106B). A proteína TMEM106B refere-se à proteína de transmembrana 106B, que é uma proteína envolvida na morfogênese de dendrito e na regulação do tráfico lisossomal. Nos seres humanos, o gene de TMEM106B fica localizado no cromossoma 7. Em algumas modalidades, o gene de TMEM106B codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_060844.2 (SEQ ID NO: 62). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 63. Em algumas modalidades o ácido nucleico isolado compreende uma sequência de codificação de TMEM106B que é otimizada com códons.

[0093] Os aspectos da invenção referem-se a um ácido nucleico

isolado que comprehende um construto d expressão que codifica a proteína programulina (por exemplo, o produto de gene do gene de PRGN). A proteína PGRN refere-se à programulina, que é uma proteína envolvida no desenvolvimento, na inflamação, na proliferação de célula e na homeostase de proteína. Nos seres humanos, o gene de PGRN fica localizado no cromossoma 17. Em algumas modalidades, o gene de PGRN codifica um peptídeo que é representado pela sequência de referência de NCBI NP_002078.1 (SEQ ID NO: 66). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado comprehende a sequência indicada na SEQ ID NO: 67. Em algumas modalidades o ácido nucleico isolado comprehende uma sequência de codificação de PGRN que é otimizada com códons.

[0094] Em alguns aspectos, a invenção provê um ácido nucleico isolado que comprehende um construto de expressão que codifica um primeiro produto de gene e um segundo produto de gene, em que cada produto de gene é selecionado independentemente dos produtos de genes, ou das porções dos mesmos, indicados na Tabela 1.

[0095] Em algumas modalidades, um produto de gene é codificado por uma porção de codificação (por exemplo, um cDNA) de um gene natural. Em algumas modalidades, um primeiro produto de gene é uma proteína (ou um fragmento da mesma) codificada pelo gene GBA1. Em algumas modalidades, um produto de gene é uma proteína (ou um fragmento da mesma) codificada por um outro gene listado na Tabela 1, por exemplo, o gene de SCARB2/LIMP2 ou o gene de PSAP. No entanto, o elemento versado no estado da técnica reconhece que a ordem de expressão de um primeiro produto de gene (por exemplo, Gcase) e de um segundo produto de gene (por exemplo, LIMP2, etc.) pode ser geralmente invertida (por exemplo, LIMP2 é o primeiro produto de gene e Gcase é o segundo produto de gene). Em algumas modalidades, um produto de gene é um fragmento (por exemplo, uma porção) de um gene

listado na Tabela 1. Um fragmento da proteína pode compreender cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80% cerca de 90% ou cerca de 99% de uma proteína codificada pelos genes listados na Tabela 1. Em algumas modalidades, um fragmento de proteína compreende entre 50% e 99,9% (por exemplo, qualquer valor entre 50% e 99,9%) de uma proteína codificada por um gene listado na Tabela 1.

[0096] Em algumas modalidades, um construto de expressão é monocistrônico (por exemplo, o construto de expressão codifica uma única proteína de fusão que compreende um primeiro produto de gene e um segundo produto de gene). Em algumas modalidades, um construto de expressão é policistrônico (por exemplo, o construto de expressão codifica dois produtos de genes distintos, por exemplo, duas proteínas ou fragmentos de proteína diferentes).

[0097] Um vetor de expressão policistrônico pode compreender um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais) promotores. Qualquer promotor apropriado pode ser usado, por exemplo, um promotor constitutivo, um promotor induzível, um promotor endógeno, um promotor específico de tecido (por exemplo, um promotor específico de CNS), etc. Em algumas modalidades, um promotor é um promotor de beta-actina de galinha (promotor de CBA), um promotor de CAG (por exemplo, tal como descrito por Alexopoulou et al. (2008) *BMC Cell Biol.* 9:2; doi: 10.1186/1471-2121-9-2), um promotor de CD68, ou um promotor de JeT (por exemplo, tal como descrito por Tornøe et al. (2002) *Gene* 297(1-2):21-32). Em algumas modalidades, um promotor é operavelmente ligado a uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um primeiro produto de gene, um segundo produto de gene, ou um primeiro produto de gene e um segundo produto de gene. Em algumas modalidades, um cassete de expressão compreende uma ou mais sequências reguladoras adicionais incluindo, mas sem nenhuma limitação, as sequências de ligação do fator de transcrição, os sítios de emenda de ítron, os sítios

de adição de poli(A), as sequências de intensificadores, os sítios de ligação de repressores, ou qualquer combinação dos elementos acima.

[0098] Em algumas modalidades, uma sequência de ácidos nucleicos que codificam um primeiro produto de gene e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um segundo produto de gene são separadas por uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um sítio de entrada ribossomal interno (IRES). Os exemplos de sítios de IRES são descritos, por exemplo, por Mokrejs et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34 (Database issue):D125-30. Em algumas modalidades, uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um primeiro produto de gene e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um segundo produto de gene são separadas por uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um peptídeo autoclivável. Os exemplos de peptídeos autocliváveis incluem, mas sem ficar a eles limitados, T2A, P2A, E2A, F2A, BmCPV 2A e BmIFV 2A, e aqueles descritos por Liu et al. (2017) *Sci Rep.* 7: 2193. Em algumas modalidades, o peptídeo autoclivável é um peptídeo T2A.

[0099] Patologicamente, distúrbios tais como o PD e a doença de Gaucher são associados com a acumulação de agregados de proteínas compostos em sua maior parte pela proteína α -Sinucleina (α -Syn). Por conseguinte, em algumas modalidades, os ácidos nucleicos isolados descritos no presente documento compreendem um ácido nucleico inibidor que reduz ou impede a expressão da proteína α -Syn. Uma sequência que codifica um ácido nucleico inibidor pode ser colocada em uma região não traduzida (por exemplo, ítron, 5'UTR, 3'UTR, etc.) do vetor de expressão.

[0100] Em algumas modalidades, um ácido nucleico inibidor é posicionado em um ítron de um construto de expressão, por exemplo, em um ítron a montante da sequência que codifica um primeiro produto de gene. Um ácido nucleico inibidor pode ser um RNA de cordão duplo

(dsRNA), siRNA, micro RNA (miRNA), miRNA artificial (amiRNA), ou um aptâmero de RNA. De maneira geral, um ácido nucleico inibidor liga (por exemplo, hibridiza com) entre cerca de 6 e cerca de 30 (por exemplo, qualquer número inteiro entre 6 e 30, inclusive) nucleotídeos contíguos de um RNA alvo (por exemplo, mRNA). Em algumas modalidades, a molécula do ácido nucleico inibidor é um miRNA ou um amiRNA, por exemplo, um miRNA que visa SNCA (o gene que codifica a proteína α-Syn) ou TMEM106B (por exemplo, o gene que codifica a proteína TMEM106B). Em algumas modalidades, o miRNA não compreende nenhuma má combinação com a região de SNCA mRNA com a qual hibridiza (por exemplo, o miRNA é "aperfeiçoadão"). Em algumas modalidades, o ácido nucleico inibidor é um shRNA (por exemplo, um shRNA que visa SNCA ou TMEM106B). Em algumas modalidades, um ácido nucleico inibidor é um miRNA artificial (amiRNA) que inclui uma estrutura de suporte de miR-155 e uma sequência de focar em SCNA ou TMEM106B.

[0101] Um ácido nucleico isolado tal como descrito no presente documento pode existir por si próprio, ou como parte de um vetor. De modo geral, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um fagemídeo, um cromossoma artificial bacteriano (BAC), ou um vetor viral (por exemplo, vetor adenoviral, vetor de vírus adenoassociado (AAV), vetor retroviral, vetor baculoviral, etc.). Em algumas modalidades, o vetor é um plasmídeo (por exemplo, um plasmídeo que compreende um ácido nucleico isolado tal como descrito no presente documento). Em algumas modalidades, um vetor de rAAV de um só cordão (por exemplo, DNA de um só cordão). Em algumas modalidades, o vetor é um vetor de AAV recombinante (rAAV). Em algumas modalidades, um vetor é um vetor de Baculovirus (por exemplo, um vetor de poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV)).

[0102] Tipicamente, um vetor de rAAV (por exemplo, genoma de

rAAV) compreende um transgene (por exemplo, um construto de expressão que compreende um ou mais de cada um dos seguintes: promotor, íntron, sequência de intensificadores, sequência de codificação de proteína, sequência de codificação inibidora de RNA, sequência de cauda de poliA, etc.) flanqueados por duas sequências de repetição terminal invertida (ITR) de AAV. Em algumas modalidades, o transgene de um vetor de rAAV compreende um ácido nucleico isolado tal como descrito pela invenção. Em algumas modalidades, cada uma das duas sequências de ITR de um vetor de rAAV é uma ITR de comprimento total (por exemplo, cerca de 145 bp de comprimento, e contendo o sítio de ligação de *Rep* funcional (RBS) e o sítio de resolução terminal (trs)). Em algumas modalidades, uma das ITRs de um vetor de rAAV é truncado (por exemplo, encurtado ou que não de comprimento total). Em algumas modalidades, uma ITR truncada não possui um sítio de resolução terminal funcional (trs) e é usado para a produção de vetores de AAV auto complementares (vetores de scAAV). Em algumas modalidades, uma ITR truncada é uma ΔITR, por exemplo, tal como descrito por McCarty et al. (2003) *Gene Ther.* 10(26):2112-8.

[0103] Os aspectos da invenção referem-se a ácidos nucleicos isolados (por exemplo, vetores de rAAV) que compreendem uma ITR que tem uma ou mais modificações (por exemplo, adições de ácidos nucleicos, deleções, substituições, etc.) em relação a uma AAV ITR do tipo selvagem, por exemplo, em relação à AAV2 ITR do tipo selvagem (por exemplo, a SEQ ID NO: 29). A estrutura da AAV2 ITR do tipo selvagem é mostrada na FIGURA 20. De maneira geral, uma ITR do tipo selvagem compreende uma região de 125 nucleotídeo que se auto emparelha para formar uma estrutura de hairpin em forma de T de cordão duplo palindrómica, em que a estrutura de hairpin consiste em dois braços transversais (formados pelas sequências indicadas como B/B' e C/C', respectivamente), uma região de haste mais longa (formada pelas sequências A/A'), e uma região terminal de um

só cordão indicada como região "D" (FIGURA 20). De maneira geral, a região "D" de uma ITR é posicionada entre a região da haste formada pelas sequências A/A' e a inserção que contém o transgene do vetor de rAAV (por exemplo, posicionado no "interior" da ITR em relação ao terminal da ITR ou proximal à inserção de transgene ou ao construto de expressão do vetor de rAAV). Em algumas modalidades, uma região "D" compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 27. Foi observado que a região "D" desempenha um papel importante na encapsidação de vetores de rAAV por proteínas de capsídeo, por exemplo, tal como divulgado por Ling et al. (2015) J Mol Genet Med 9(3).

[0104] A invenção é baseada, em parte, na descoberta surpreendente que os vetores de rAAV que compreendem uma região "D" localizada na "parte externa" da ITR (por exemplo, proximal ao terminal da ITR em relação à inserção de transgene ou ao construto de expressão) são encapsidados eficientemente por proteínas de capsídeo de AAV do que os vetores de rAAV que têm ITRs com ITRs não modificadas (por exemplo, do tipo selvagem) em algumas modalidades, vetores de rAAV que têm uma sequência de "D" modificada (por exemplo, uma sequência de "D" na posição da "parte externa") têm uma toxicidade reduzida em relação aos vetores de rAAV que têm sequências de ITR do tipo selvagem.

[0105] Em algumas modalidades, uma sequência de "D" modificada compreende pelo menos uma substituição de nucleotídeo em relação a uma sequência de "D" do tipo selvagem (por exemplo, a SEQ ID NO: 27). Uma sequência de "D" modificada pode ter pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais de 10 substituições de nucleotídeos em relação a uma sequência de "D" do tipo selvagem (por exemplo, a SEQ ID NO: 27). Em algumas modalidades, uma sequência de "D" modificada compreende pelo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, ou 19 substituições de ácidos nucleicos em relação a uma sequência de "D" do tipo

selvagem (por exemplo, a SEQ ID NO: 27). Em algumas modalidades, uma sequência de "D" modificada fica entre cerca de 10% e cerca de 99% (por exemplo, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 99%) idêntica a uma sequência de "D" do tipo selvagem (por exemplo, a SEQ ID NO: 27). Em algumas modalidades, uma sequência de "D" modificada compreende a sequência indicada na SEQ ID NO: 26, também indicada como uma sequência de "S" tal como descrito por Wang et al. (1995) *J Mol Biol* 250(5):573-80.

[0106] Um ácido nucleico isolado ou um vetor de rAAV tal como descrito pela invenção também pode compreender uma sequência de "TRY", por exemplo, tal como indicado na SEQ ID NO: 28, ou tal como descrito por Francois, et al. 2005. *The Cellular TATA Binding Protein Is Required for Rep-Dependent Replication of a Minimal Adeno-Associated Virus Type 2 p5 Element J Virol.* Em algumas modalidades, uma sequência de TRY é posicionada entre uma ITR (por exemplo, uma 5'ITR) e um construto de expressão (por exemplo, uma inserção de codificação de transgene) de um ácido nucleico ou vetor de rAAV isolado.

[0107] Em alguns aspectos, a invenção refere-se a vetores de Baculovirus que compreendem um ácido nucleico ou vetor de rAAV isolado tal como descrito pela invenção. Em algumas modalidades, o vetor de Baculovirus é um vetor de poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), por exemplo, tal como descrito por Urabe et al. 2002) *Hum Gene Ther* 13(16):1935-43e Smith et al. (2009) *Mol Ther* 17(11):1888-1896.

[0108] Em alguns aspectos, a invenção provê uma célula hospedeira que compreende um ácido nucleico ou um vetor isolado tal como descrito no presente documento. Uma célula hospedeira pode ser uma célula procariótica ou uma célula eucariótica. Por exemplo, uma célula hospedeira pode ser uma célula de mamífero, uma célula bacteriana,

uma célula de levedura, uma célula de inseto, etc. Em algumas modalidades, uma célula hospedeira é uma célula de mamífero, por exemplo, uma célula de HEK293T. Em algumas modalidades, uma célula hospedeira é uma célula bacteriana, por exemplo, uma célula de *E. coli*.

rAAVs

[0109] Em alguns aspectos, a invenção refere-se a AAVs recombinantes (rAAVs) que compreendem um transgene que codifica um ácido nucleico tal como descrito no presente documento (por exemplo, um vetor de rAAV tal como descrito no presente documento). O termo "rAAVs" refere-se de maneira geral às partículas virais que compreendem um vetor de rAAV encapsulado por uma ou mais proteínas de capsídeo de AAV. Um rAAV descrito pela invenção pode compreender uma proteína de capsídeo que tem um sorotipo selecionado de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 e AAV10. Em algumas modalidades, um rAAV compreende uma proteína de capsídeo de um hospedeiro não humano, por exemplo uma proteína de capsídeo de AAV de rhesus, tal como AAVrh.10, AAVrh.39, etc. Em algumas modalidades, um rAAV descrito pela invenção compreende uma proteína de capsídeo que é uma variante de uma proteína de capsídeo do tipo selvagem, tal como uma variante da proteína de capsídeo que inclui pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais de 10 (por exemplo, 15, 20 25, 50, 100, etc.) substituições de aminoácido (por exemplo, mutações) em relação à proteína de capsídeo de AAV do tipo selvagem da qual é derivada.

[0110] Em algumas modalidades, as rAAVs descritos pela invenção se disseminam de imediato através do CNS, em particular quando introduzidos no espaço do CSF ou diretamente no parênquima do cérebro. Por conseguinte, em algumas modalidades, os rAAVs descritos pela invenção compreendem uma proteína de capsídeo que é capaz de cruzar a barreira de sangue-cérebro (BBB). Por exemplo, em algumas modalidades, um rAAV compreende uma proteína de capsídeo que tem um

sorotipo AAV9 ou AAVrh.10. A produção de rAAVs é descrita, por exemplo, por Samulski et al. (1989) *J Virol.* 63(9):3822-8 e Wright (2009) *Hum Gene Ther.* 20(7): 698-706.

[0111] Em algumas modalidades, um rAAV tal como descrito pela invenção (por exemplo, que compreende um genoma de rAAV recombinante encapsulado por proteínas de capsídeo de AAV para formar uma partícula de capsídeo de rAAV) é produzido em um sistema de expressão de vetor de Baculovirus (BEVS). A produção de rAAVs com o uso de BEVS é descrita, por exemplo, por Urabe et al. (2002) *Hum Gene Ther* 13(16):1935-43, Smith et al. (2009) *Mol Ther* 17(11):1888-1896, na Patente U.S. nº. 8.945.918, na Patente U.S. nº 9.879.282, e na Publicação de Patente PCT Internacional WO 2017/184879. No entanto, um rAAV pode ser produzido ao usar qualquer método apropriado (por exemplo, ao usar genes rep e cap recombinantes).

Composições Farmacêuticas

[0112] Em alguns aspectos, a invenção provê composições farmacêuticas que compreendem um ácido nucleico isolado ou um rAAV tal como descrito no presente documento, e um veículo farmaceuticamente aceitável. Tal como usado no presente documento, o termo "farmaceuticamente aceitável" refere-se a um material, tal como um veículo ou um diluente, que não anulam a atividade ou as propriedades biológicas do composto, e é relativamente atóxico, por exemplo, o material pode ser administrado a um indivíduo sem causar efeitos biológicos indesejáveis ou interagir de uma maneira deletéria com qualquer um dos componentes da composição na qual é contido.

[0113] Tal como usado no presente documento, o termo "veículo farmaceuticamente aceitável" refere-se a um material, uma composição ou um veículo farmaceuticamente aceitável, tal como uma carga líquida ou sólida, um estabilizante, um agente de dispersão, um agente de suspensão, um diluente, um excipiente, um agente espessante, um solvente ou material

encapsulante, envolvido na condução ou no transporte de um composto útil dentro da invenção dentro ou para o paciente de maneira tal que pode executar a sua função pretendida. Os ingredientes adicionais que podem ser incluídos nas composições farmacêuticas usadas na prática da invenção são conhecidos no estado da técnica e descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA), que é incorporado no presente documento a título de referência.

[0114] As composições (por exemplo, composições farmacêuticas) providas no presente documento podem ser administradas por qualquer via, inclusive enteral (por exemplo, oral), parenteral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, subcutânea, intraventricular, transdermal, interdermal, retal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (tal como por meio de pós, pomadas, cremes e/ou gotas), mucosal, nasal, bucal, sublingual; por meio de instilação intratraqueal, instilação bronquial e/ou inalação; e/ou como um spray oral, spray nasal e/ou aerosol. As vias especificamente contempladas são a administração oral, a administração intravenosa (por exemplo, injeção intravenosa sistêmica), a administração regional através do suprimento de sangue e/ou linfa, e/ou a administração direta a um sítio afetado. De modo geral, a via de administração mais apropriada irá depender de uma variedade de fatores incluindo a natureza do agente (por exemplo, a sua estabilidade no ambiente do trato gastrointestinal), e/ou da condição do indivíduo (por exemplo, se o indivíduo pode tolerar a administração oral). Em determinadas modalidades, o composto ou a composição farmacêutica descritos no presente documento são apropriados para a administração tópica ao olho de um indivíduo.

Métodos

[0115] A invenção é baseada, na parte, em composições para a expressão de combinações dos produtos de genes associados ao PD em

um indivíduo que agem em conjunto (por exemplo, sinergicamente) para tratar o mal de Parkinson. Tal como usado no presente documento, "tratar" ou "tratamento" refere-se (a) à prevenção ou surgimento retardado do mal de Parkinson; (b) redução da gravidade do mal de Parkinson; (c) redução ou prevenção do desenvolvimento dos sintomas característicos do mal de Parkinson; (d) e/ou prevenção da piora dos sintomas característicos do mal de Parkinson. Os sintomas do mal de Parkinson incluem, por exemplo, a disfunção motora (por exemplo, agitação, rigidez, lentidão nos movimentos, dificuldade no caminhar), a disfunção cognitiva (por exemplo, demência, depressão, ansiedade) e a disfunção emocional e comportamental.

[0116] Por conseguinte, em alguns aspectos, a invenção provê um método de tratamento de um indivíduo que tem ou é suspeito de ter o mal de Parkinson, em que o método compreende a administração ao indivíduo de uma composição (por exemplo, uma composição que compreende um ácido nucleico isolado ou um vetor ou um rAAV) tal como descrito pela invenção.

[0117] Em algumas modalidades, uma composição é administrada diretamente ao CNS do indivíduo, por exemplo, por meio de injeção direta no cérebro e/ou no cordão espinal do indivíduo. Os exemplos de modalidades de administração direta no CNS incluem, mas sem ficar a eles limitados, a injeção intracerebral, a injeção intraventricular, a injeção intracisternal, a injeção intraparenquimal, injeção intratecal e qualquer combinação das opções acima. Em algumas modalidades, a injeção direta no CNS de um indivíduo resulta na expressão do transgene (por exemplo, expressão do primeiro produto de gene, segundo produto de gene e, se for aplicável, do terceiro produto de gene) no mesencéfalo, no striatum e/ou no córtex cerebral do indivíduo. Em algumas modalidades, a injeção direta no CNS resulta na expressão do transgene (por exemplo, expressão do primeiro produto de gene, segundo produto

de gene e, se for aplicável, do terceiro produto de gene) no cordão espinhal e/ou no CSF do indivíduo.

[0118] Em algumas modalidades, a injeção direta ao CNS de um indivíduo compreende a aplicação realçada por convecção (CED). A aplicação realçada por convecção é uma estratégia terapêutica que envolve a exposição cirúrgica do cérebro e a colocação de um cateter de pequeno diâmetro diretamente em uma área alvo do cérebro, seguida pela infusão de um agente terapêutico (por exemplo, uma composição ou um rAAV tal como descrito no presente documento) diretamente ao cérebro do indivíduo. A CED é descrita, por exemplo, por Debinski et al. (2009) *Expert Rev Neurother.* 9(10):1519-27.

[0119] Em algumas modalidades, uma composição é administrada perifericamente a um indivíduo, por exemplo, por meio de injeção periférica. Os exemplos de injeção periférica incluem a injeção subcutânea, a injeção intravenosa, a injeção intra-arterial, a injeção intraperitoneal, ou qualquer combinação das opções acima. Em algumas modalidades, a injeção periférica é a injeção intra-arterial, por exemplo, a injeção na artéria carótida de um indivíduo.

[0120] Em algumas modalidades, uma composição (por exemplo, uma composição que compreende um ácido nucleico isolado ou um vetor ou um rAAV) tal como descrito pela invenção é administrada periférica e diretamente ao CNS de um indivíduo. Por exemplo, em algumas modalidades, a um indivíduo é administrada uma composição por meio de injeção intra-arterial (por exemplo, injeção na artéria carótida) e de injeção intraparenquimal (por exemplo, injeção intraparenquimal por CED). Em algumas modalidades, a injeção direta ao CNS e a injeção periférica são simultâneas (por exemplo, acontecem ao mesmo tempo). Em algumas modalidades, a injeção direta ocorre anteriormente (por exemplo, entre 1 minuto e 1 semana, ou mais antes) à injeção periférica. Em algumas modalidades, a injeção direta ocorre posteriormente (por

exemplo, entre 1 minuto e 1 semana, ou mais depois) à injeção periférica.

[0121] A quantidade de composição (por exemplo, uma composição que compreende um ácido nucleico isolado ou um vetor ou um rAAV) tal como descrito pela invenção administrada a um indivíduo irá variar dependendo do método de administração. Por exemplo, em algumas modalidades, um rAAV tal como descrito no presente documento é administrado a um indivíduo a um título entre cerca de 10^9 cópias do genoma (GC)/kg e cerca de 10^{14} GC/kg (por exemplo, cerca de 10^9 GC/kg, cerca de 10^{10} GC/kg, cerca de 10^{11} GC/kg, cerca de 10^{12} GC/kg, cerca de 10^{12} GC/kg, ou cerca de 10^{14} GC/kg). Em algumas modalidades, a um indivíduo é administrado um título elevado (por exemplo, $> 10^{12}$ cópia de genoma GC/kg de um rAAV) por meio de injeção ao espaço do CSF, ou através de injeção intraparenquimal.

[0122] Uma composição (por exemplo, uma composição que compreende um ácido nucleico isolado ou um vetor ou um rAAV) tal como descrito pela invenção pode ser administrada a um indivíduo uma vez ou múltiplas vezes (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 vezes ou mais). Em algumas modalidades, uma composição é administrada a um indivíduo continuamente (por exemplo, cronicamente), por exemplo através de uma bomba de infusão.

EXEMPLOS

Exemplo 1: vetores de rAAV

[0123] Os vetores de AAV são gerados ao usar células, tais como células HEK293, para a transfecção de plasmídeo triplo. As sequências de ITRs flanqueiam um construto de expressão que compreende um promotor/elemento intensificador para cada transgene de interesse, um sinal de 3' polyA, e sinais pós-translacionais tais como o elemento de WPRE. Múltiplos produtos de genes podem ser expressos simultaneamente, tais como GBA1 e LIMP2 e/ou Prosaposina, através da fusão

das sequências de proteínas; ou ao usar um ligante de peptídeo 2A, tal como T2A ou P2A, que conduz 2 fragmentos de peptídeo com aminoácidos adicionados devido à prevenção da criação de uma ligação peptídica; ou ao usar um elemento de IRES; ou pela expressão com 2 cassetes de expressão separados. A presença de uma sequência intrônica curta que é emendada eficientemente, a montante do gene expresso, pode melhorar os níveis de expressão. Os shRNAs e outros RNAs reguladores podem ser potencialmente incluídos dentro dessas sequências. Os exemplos dos construtos de expressão descritos pela invenção são mostrados nas FIGURAS 1 a 8 e 21 a 35, e na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2

Nome	Promotor 1	shRNA	CDS1	PolyA 1	Elemento bicistrônico	Promo-tor 2	CDS2	PolyA 2	Extensão entre as ITRs
CMVe_CBAp_GBA1_WPREGH	CBA		GBA1	WPREGH					3741
LT1s_JetLong_mRNAiaSYn_SCARB2-T2A-GBA1_bGH	JetLong	aSyn	SCAR B2	bGH	T2A		GBA1		4215
LI1_JetLong_SCARB2-IRES-GBA1_bGH	JetLong		SCAR B2	bGH	IRES		GBA1		4399
FP1_JetLong_GBA1_bGH_JetLong_SCARB2_SV40L	JetLong		GBA1	bGH		JetLong	SCAR B2	SV40 L	4464
PrevailVec-tor_LT2s_JetLong_mRNAiaSYn_PSA-P-T2A-GBA1_bGH_4353nt	JetLong	aSyn	PSAP	bGH	T2A	-	GBA1	-	4353
PrevailVec-tor_LI2_JetLong_PSAP_IRES_GBA1_SyntheticpolyA_4337nt	JetLong	-	PSAP	Synthetic pA	IRES	-	GBA1	-	4337
PrevailVec-tor_10s_JetLong_mRNAiaSy_GBA2_WPREGH_4308nt	JetLong	aSyn	GBA2	WPREGH	-	-	-	-	4308
PrevailVec-tor_FT4_JetLong_GBA1_T2A_GALC_SyntheticpolyA_4373nt	JetLong	-	GBA1	Synthetic pA	T2A	-	GALC	-	4373
PrevailVec-tor_LT4_JetLong_GALC_T2A_GBA1_SyntheticpolyA_4373nt	JetLong	-	GALC	Synthetic pA	T2A	-	GBA1	-	4373
PrevailVec-tor_LT5s_JetLong_mRNAiaSyn_CTS-B-T2A-GBA1_WPREGH_4392nt	JetLong	aSyn	CTSB	WPREGH	T2A	-	GBA1	-	4392
PrevailVec-tor_FT11t_JetLong_mRNAiaSyn_GBA1_T2S_SMPD1_SyntheticpolyA_4477nt	JetLong	aSyn	GBA1	Synthetic pA	T2A	-	SMPD 1	-	4477
PrevailVec-tor_LI4_JetLong_GALC_IRES_GBA1_SyntheticpolyA_4820nt	JetLong	-	GALC	Synthetic pA	IRES	-	GBA1	-	4820
PrevailVec-tor_FTP5_JetLong_GBA1_bGH_JetLong_CTSB_SV40L_4108nt	JetLong	-	GBA1	bGH	-	JetLong	CTSB	SV40 L	4108
PrevailVec-tor_FT6s_JetLong_mRNAiaSyn_GBA1-T2A-GCH1_WPREGH_4125nt	JetLong	aSyn	GBA1	WPREGH	T2A	-	GCH1	-	4125

PrevailVec-tor_LT7s_JetLong_mRNAiaSyn_RAB7L1-T2A-GBA1_WPREGH_3984nt	JetLong	aSyn	RAB7 L1	WPREGH	T2A	-	GBA1	-	3984
PrevailVec-tor_FI6s_JetLong_mRNAiaSYn_GBA1-IRES-GCH1_bGH_3978nt	JetLong	aSyn	GBA1	bGH	IRES	-	GCH1	-	3978
PrevailVec-tor_9st_JetLong_mRNAiaSyn_mRNAiTMEM10B_VPS35_WPREGH_4182nt	JetLong	aSyn & TMEM10 5 6B	VPS3 5	WPREGH	-	-	-	-	4182
PrevailVec-tor_FT12s_JetLong_mRNAiaSyn_GBA1-T2A-IL34_WPREGH_4104nt	JetLong	aSyn	GBA1	WPREGH	T2A	-	IL34	-	4104
PrevailVec-tor_FI12s_JetLong_mRNAiaSYn_GBA1-IRES-IL34_bGH_3957nt	JetLong	aSyn	GBA1	bGH	IRES	-	IL34	-	3957
PrevailVec-tor_FP8_JetLong_GBA1_bGH_CD68_TREM2_SV40L_4253nt	JetLong	-	GBA1	bGH	-	CD68	TREM 2	SV40 L	4253
PrevailVec-tor_FP12_CMVe_CBA_GBA1_bGH_JetLong_IL34_SV40L_4503nt	CBA		GBA1	bGH		JetLong	IL34	SV40 L	4503

Exemplo 2: Ensaios à base de células de transdução viral em células com déficit de GBA

[0124] As células com déficit de GBA1 são obtidas, por exemplo, como fibroblastos dos pacientes de GD, monócitos, ou célula hES, ou células tronco pluripotentes induzidas derivadas de pacientes (iPSCs). Essas células acumulam substratos tais como a glucosilceramida e a glucosilefingosina (GlcCer e GlcSph). O tratamento de linhagens de células cultivada mutantes ou do tipo selvagem com inibidores de Gcase, tal como CBE, também é usado para obter células com déficit de GBA.

[0125] Ao usar tais modelos de células, os defeitos lisossomais são quantificados em termos da acumulação de agregados de proteína, tal como a α-Sinucleína, com um anticorpo para essa proteína ou fosfo-α-Syn, seguida pela obtenção de imagem ao usar microscopia fluorescente. A obtenção de imagem para anomalias lisossomais por ICC para marcadores de proteínas tais como LAMP1, LAMP2, LIMP1, LIMP2, ou o uso de corantes tais como Lysotracker, ou a absorção através do compartimento endocítico de dextrana fluorescente ou outros marcadores, também é executada. A obtenção de imagem para a acumulação de marcador de autofagia devido à fusão deficiente com o lisossoma, tal

como para LC3, também pode ser executada. A transferência Western e/ou o ensaio ELISA são usados para quantificar a acumulação anormal desses marcadores. Além disso, a acumulação de substratos de glicolipídios e produtos de GBA1 é medida ao usar abordagens padrão.

[0126] Os pontos extremos terapêuticos (por exemplo, a redução da patologia associado ao PD) são medidos no contexto da expressão da transdução dos vetores de AAV, para confirmar e quantificar a atividade e a função. Gcase também pode ser quantificada ao usar medições ELISA de proteína, ou por ensaios da atividade de Gcase padrão.

*Exemplo 3: Ensaios *in vivo* ao usar camundongos mutantes*

[0127] Este exemplo descreve os ensaios *in vivo* de vetores de AAV ao usar camundongos mutantes. Os estudos *in vivo* de vetores de AAV tal como acima em camundongos mutantes são realizados ao usar os ensaios descritos, por exemplo, por Liou et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281(7): 4242-4253, Sun et al. (2005) *J. Lipid Res.* 46:2102-2113, e Farfel-Becker et al. (2011) *Dis. Modelo Mech.* 4(6):746-752.

[0128] A aplicação intratecal ou intraventricular de vetores de controle de veículo e de AAV (por exemplo, a uma dose de 2×10^{11} vg/camundongo) é executada ao usar materiais de partida de AAV concentrados, por exemplo, a um volume de injeção entre 5 e 10 μl . A aplicação intraparenquimal pela aplicação realçada por convecção é executada.

[0129] O tratamento é iniciado tanto antes do surgimento dos sintomas, quanto subsequente ao surgimento. Os pontos extremos medidos são a acumulação do substrato no CNS e CSF, a acumulação da enzima Gcase por ELISA e os pontos extremos da atividade da enzima, motora e cognitiva, disfunção lisossomal e a acumulação de monômeros, protofibrilas e fibrilas de α -Sinucleína.

Exemplo 4: Modelos químicos da doença

[0130] Este exemplo descreve os ensaios *in vivo* de vetores de AAV ao usar um modelo de camundongo quimicamente induzido da doença

de Gaucher (por exemplo, o modelo de camundongo de CBE). Os estudos *in vivo* desses vetores de AAV são realizados em um modelo de camundongo quimicamente induzido da doença de Gaucher, por exemplo, tal como descrito por Vardi et al. (2016) *J Pathol.* 239(4):496-509.

[0131] A aplicação intratecal ou intraventricular dos vetores de controle de veículo e de AAV (por exemplo, a uma dose de 2×10^{11} vg/camundongo) é executada ao usar materiais de partida de AAV concentrado, por exemplo, com um volume da injeção entre 5 e 10 μ l. A aplicação intraparenquimal pela aplicação realçada por convecção é executada. A aplicação periférica é obtida por meio de injeção na veia da cauda.

[0132] O tratamento é iniciado tanto antes do surgimento dos sintomas, quanto depois do surgimento. Os pontos extremos medidos são a acumulação do substrato no CNS e CSF, a acumulação da enzima Gcase por ELISA e da atividade da enzima, e os pontos extremos cognitivos, disfunção lisossomal e acumulação de monômeros, protofibrilas e fibrilas de α -Sinucleína.

Exemplo 5: Experimentos clínicos em pacientes de PD, LBD e doença de Gaucher

[0133] Em algumas modalidades, os pacientes que têm determinadas formas da doença de Gaucher (por exemplo, GD1) têm um risco maior de desenvolver o mal de Parkinson (PD) ou a demência de corpos de Lewy (LBD). Este exemplo descreve experimentos clínicos para avaliar a segurança e a eficácia dos rAAVs tal como descrito pela invenção, nos pacientes que têm a doença de Gaucher, PD e/ou LBD.

[0134] Os experimentos clínicos de tais vetores para o tratamento da doença de Gaucher, PD e/ou LBD são realizados ao usar um projeto de estudo similar àquele descrito por Grabowski et al. (1995) *Ann. Internar. Med.* 122(1):33-39.

Exemplo 6: Tratamento de doença periférica

[0135] Em algumas modalidades, os pacientes que têm determinadas formas da doença de Gaucher exibem sintomas de neuropatia periférica, por exemplo, tal como descrito por Biegstraaten et al. (2010) *Brain* 133(10):2909-2919.

[0136] Este exemplo descreve ensaios *in vivo* de vetores de AAV tal como descrito no presente documento para o tratamento da neuropatia periférica associada com a doença de Gaucher (por exemplo, doença de Gaucher do tipo 1). Resumidamente, aos pacientes da doença de Gaucher do tipo 1 identificados como tendo sinais ou sintomas de neuropatia periférica é administrado um rAAV tal como descrito pela invenção. Em algumas modalidades, os sinais e os sintomas de neuropatia periférica do indivíduo são monitorados, por exemplo, ao usar os métodos descritos por Biegstraaten et al., após a administração de rAAV.

[0137] Os níveis de produtos de genes transduzidos tal como descrito pela presente invenção nos pacientes (por exemplo, no soro de um paciente, no tecido periférico (por exemplo, tecido do fígado, tecido do baço, etc.)) de um paciente submetido ao ensaio, por exemplo, pela análise de transferência Western, ensaios funcionais enzimáticos, ou estudos com obtenção de imagem.

Exemplo 7: Tratamento de formas do CNS

[0138] Este exemplo descreve os ensaios *in vivo* de rAAVs tal como descrito no presente documento para o tratamento de formas do CNS da doença de Gaucher. Resumidamente, aos pacientes da doença de Gaucher identificados como tendo uma forma de CNS da doença de Gaucher (por exemplo, doença de Gaucher do tipo 2 ou do tipo 3) é administrada um rAAV tal como descrito pela invenção. Os níveis de produtos de gene transduzidos tal como descrito pela presente invenção no CNS dos pacientes (por exemplo, no soro do CNS de um paciente, no fluido cerebrospinal (CSF) de um paciente, ou no tecido do CNS de um paciente) submetidos ao ensaio, por exemplo, pela análise de transferência Western, ensaios funcionais enzimáticos, ou estudos

com obtenção de imagem.

Exemplo 8: Terapia de genes do mal de Parkinson em indivíduos que têm mutações em GBA1

[0139] Este exemplo descreve a administração de um vírus adeno-associado recombinante (rAAV) GBA1 codificando a um indivíduo que tem mal de Parkinson caracterizado por uma mutação no gene de GBA1.

[0140] A inserção do vetor rAAV-GBA1 contém o elemento promotor de CBA (CBA), que consiste em quatro partes: o intensificador de CMV (CMVe), o promotor de CBA (CBAp), o Éxon 1, e o íntron (int) para expressar constitutivamente a sequência de codificação (CD) otimizada com códons de GBA1 humano (marrom). A região 3' também contém um elemento regulador pós-transcricional Elemento Regulador Pós-transcricional (WPRE) do vírus da hepatite de Woodchuck seguido por uma cauda de sinal poliA do Hormônio do Crescimento de bovino (bGH polyA). As ITRs de flanqueio permitem a compactação correta das sequências intermediárias. Duas variantes da sequência de 5' ITR (FIGURA 7, caixa inserida, sequência de baixo) foram avaliadas; essas variantes têm várias diferenças de nucleotídeos dentro da região "D" de 20 nucleotídeos da ITR, que se acredita causa impactos na eficiência de compactação e de expressão. O produto do vetor rAAV-GBA1 contém a sequência de nucleotídeos de domínio "D" mostrada na FIGURA 7 (caixa inserida, sequência de cima). Um vetor da variante abriga um domínio "D" mutante (denominado como domínio "S" no presente documento, com as mudanças de nucleotídeos mostradas por sombreado), teve um desempenho similar em estudos pré-clínicos. A cadeia principal contém o gene para conferir resistência à Canamicina, bem como uma sequência de recheador para impedir a compactação reversa. Um diagrama esquemático que ilustra um vetor rAAV-GBA1 é mostrado na FIGURA 8. O vetor rAAV-GBA1 é compactado em um

rAAV ao usar proteínas de capsídeo de sorotipo AAV9.

[0141] rAAV-GBA1 é administrado a um indivíduo como uma única dose através de uma injeção suboccipital guiada por fluoroscopia na cisterna magna (magna intracisternal; ICM). Uma modalidade de um estudo de regime de dosagem de rAAV-GBA1 é tal como segue.

[0142] Uma única dose de rAAV-GBA1 é administrada aos pacientes (N = 12) a um de dois níveis de dose (3e13 vg (dose baixa); 1e14 vg (dose elevada), etc.) que são determinados com base nos resultados de estudos de farmacologia e toxicologia não clínicos.

[0143] Os estudos iniciais foram realizados em um modelo de camundongo químico envolvendo a aplicação diária de conduritol-b-epóxido (CBE), um inibidor de GCase para avaliar a eficácia e a segurança do vetor rAAV-GBA1 e um construto da variante S de rAAV-GBA1 (tal como descrito mais adiante). Além disso, os estudos iniciais foram realizados em um modelo de camundongo genético, que carrega uma mutação GBA1 homozigótica e é parcialmente deficiente em saposinas (4L/PS-NA). Os estudos de variação de doses adicionais nos camundongos e em primatas não humanos (NHPs) são realizados para avaliar ainda mais a segurança e a eficácia do vetor.

[0144] Duas versões ligeiramente diferentes da repetição de terminal invertido 5' (ITR) na cadeia principal de AAV foram testadas para avaliar a manufaturabilidade e a expressão de transgene (FIGURA 7). Acredita-se que o domínio "D" de 20 bp dentro da 5' ITR de 145 bp seja necessário para a produção viral ideal do vetor, mas também foram relatadas mutações dentro do domínio "D" para aumentar a expressão do transgene em alguns casos. Desse modo, além do vetor rAAV-GBA1 viral, que abriga um domínio "D" intacto, uma segunda forma de vetor com um domínio D mutante (denominado como domínio "S" no presente documento) também foi avaliada. Ambos rAAV-GBA1 e a variante expressam o mesmo transgene. Embora ambos os vetores tenham produzido o vírus que era eficaz in vivo tal como detalhado

a seguir, rAAV-GBA1, que contém um domínio "D" do tipo selvagem, foi selecionado para mais desenvolvimento.

[0145] Para estabelecer o modelo de CBE da deficiência de GCase, camundongos juvenis foram dosados com CBE, um inibidor específico de GCase. Aos camundongos foi administrado CBE através de injeção IP diária, começando no 8º dia após o nascimento (P8). Três doses diferentes de CBE (25 mg/kg, 37,5 mg/kg, 50 mg/kg) e PBS foram testadas para estabelecer um modelo que exibisse um fenótipo comportamental (FIGURA 9). Doses mais elevadas de CBE conduziram à letalidade de uma maneira dependente da dose. Todos os camundongos tratados com 50 mg/kg de CBE morreram em P23, e 5 dos 8 camundongos tratados com 37,5 mg/kg de CBE morreram em P27. Não havia nenhuma letalidade nos camundongos tratados com 25 mg/kg de CBE. Ao passo que os camundongos nos quais foi injetado CBE não mostraram nenhum déficit motor geral no ensaio de campo aberto (percorrendo a mesma distância e à mesma velocidade que os camundongos que receberam PBS), os camundongos tratados com CBE exibiram um déficit de coordenação motora e equilíbrio tal como medido pelo ensaio rotarod.

[0146] Os camundongos que sobreviveram ao final do estudo foram sacrificados no dia após a sua última dose de CBE (P27, "dia 1") ou três dias depois da retirada de CBE (P29, "dia 3"). A análise de lipídio foi executada no córtex dos camundongos que receberam 25 mg/kg de CBE para avaliar a acumulação de substratos de GCase nas coortes do dia 1 e do dia 3. Os níveis de GluSph e de GalSph (medidos no agregado neste exemplo) foram acumulados de maneira significativa nos camundongos tratados com CBE em comparação aos controles tratados com PBS, consistentes com a insuficiência de GCase.

[0147] Com base no estudo descrito acima, a dose de 25 mg/kg de CBE foi selecionada, uma vez que produziu déficits comportamentais

sem causar impactos na sobrevivência. Para obter a distribuição de GBA1 amplamente difundida por todo o cérebro e a expressão do trans-gene durante o tratamento de CBE, rAAV-GBA1 ou o excipiente foi aplicado através de injeção intracerebroventricular (ICV no dia 3 após o nascimento (P3) seguido pelo tratamento diário de IP CBE ou PBS iniciado em P8 (FIGURA 10).

[0148] Os camundongos tratados com CBE que receberam rAAV-GBA1 tiveram um desempenho estatisticamente significativamente melhor no rotarod do que aqueles que receberam o excipiente (FIGURA 11). Os camundongos no grupo de tratamento variante não diferiram dos camundongos tratados com excipiente em termos de outras medidas comportamentais, tal como a distância total percorrida durante os testes (FIGURA 11).

[0149] Na conclusão do estudo em vida, a metade dos camundongos foi sacrificada no dia após a última dose de CBE (P36, "dia 1") ou três dias depois da retirada de CBE (P38, "dia 3") para a análise bioquímica (FIGURA 12). Ao usar um ensaio de enzima fluorométrico realizado em triplicata biológica, a atividade de GCase foi avaliada no córtex. A atividade de GCase foi aumentada nos camundongos que foram tratados com rAAV-GBA1, ao passo que o tratamento de CBE reduziu a atividade de GCase. Além disso, os camundongos que receberam CBE e rAAV-GBA1 tiveram níveis de atividade de GCase que eram similares ao grupo tratado com pBS, indicando que a aplicação de rAAV-GBA1 pode superar a inibição da atividade de GCase induzida pelo tratamento de CBE. A análise de lipídio foi executada no córtex motor dos camundongos para examinar níveis dos substratos GluCer e GluSph. Ambos os lipídios acumularam nos cérebros dos camundongos que receberam CBE, e o tratamento de rAAV-GBA1 reduziu de maneira significativa a acumulação do substrato.

[0150] Os níveis de lipídios foram correlacionados negativamente

com a atividade e o desempenho de GCase no ensaio Rotarod através dos grupos de tratamento. A atividade aumentada de GCase depois da administração de rAAV-GBA1 foi associada com a redução do substrato e realçou a função motora (FIGURA 13). Tal como mostrado na FIGURA 14, a biodistribuição preliminar foi avaliada pela presença do genoma do vetor, tal como medido por qPCR (com > 100 genomas de vetor por 1 µg de DNA genômico definido como positivo). Os camundongos que receberam rAAV-GBA1, com e sem CBE, eram positivos para genomas do vetor rAAV-GBA1 no córtex, indicando que a aplicação ICV resulta na aplicação de rAAV-GBA1 ao córtex. Além disso, os genomas de vetor foram detectados no fígado, poucos no baço, e nenhum no coração, no rim ou nas gônadas. Para todas as medidas, não havia nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos no dia 1 e no dia 3.

[0151] Um estudo mais amplo no modelo de CBE também explorou doses eficazes de rAAV-GBA1 no modelo de CBE. Ao usar o modelo de dose de 25 mg/kg de CBE, o excipiente ou o rAAV-GBA1 foi aplicado através de ICV em P3, e o tratamento diário de IP PBS ou CBE foi iniciado em P8. Devido à similaridade entre os grupos com e sem a retirada de CBE observada nos estudos precedentes, todos os camundongos foram sacrificados um dia após a dose final de CBE (P38-40). O efeito de três doses de rAAV-GBA1 diferentes foi avaliado, resultando nos cinco grupos a seguir, com 10 camundongos (5M/5F) por grupo:

Excipiente ICV + PBS IP

Excipiente ICV + 25 mg/kg de CBE IP

3.2e9 vg (2.13e10 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV + 25 mg/kg de CBE IP

1.0e10 vg (6.67e10 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV + 25 mg/kg de CBE IP

3.2e10 vg do cérebro) rAAV-GBA1 ICV + 25 mg/kg de CBE IP.

[0152] A dose mais elevada de rAAV-GBA1 resgatou a falha relacionada ao tratamento de CBE para ganho de peso em P37. Além disso,

essa dose resultou em um aumento estatisticamente significativo no desempenho no ensaio rotarod e na travessa afunilada em comparação ao grupo tratado com excipiente + CBE (FIGURA 15). A letalidade foi observado em vários grupos, incluindo os grupos tratados com excipiente e tratados com rAAV-GBA1 (excipiente + PBS: 0; Excipiente + 25 mg/kg de CBE: 1; 3.2e9 vg rAAV-GBA1 + 25 mg/kg de CBE: 4; 1.0e10 vg rAAV-GBA1 + 25 mg/kg de CBE: 0; 3.2e10 vg rAAV-GBA1 + 25 mg/kg de CBE: 3).

[0153] Na conclusão do estudo em vida, os camundongos foram sacrificados para a análise bioquímica (FIGURA 16). A atividade de GCase no córtex foi avaliada em triplicatas biológicas por um ensaio fluorométrico. Os camundongos tratados com CBE exibiram uma atividade reduzida de GCase, ao passo que os camundongos que receberam uma dose elevada de rAAV-GBA1 exibiram um aumento estatisticamente significativo na atividade de GCase em comparação ao tratamento de CBE. Os camundongos tratados com CBE também tiveram uma acumulação de GluCer e de GluSph, ambos os quais foram resgatados mediante a administração de uma dose elevada de rAAV-GBA1.

[0154] Além do modelo de CBE químico estabelecido, rAAV-GBA1 também é avaliado no modelo genético de 4L/PS-NA, que é homozigótico para a mutação de V394L GD em Gba1 e também é parcialmente deficiente em saposinas, o que afeta a localização e a atividade de GCase. Esses camundongos exibem déficits na resistência motora, na coordenação e no equilíbrio, tal como evidenciado por seu desempenho nos ensaios de caminhar na travessa, rotarod e pendurar no fio. Tipicamente, o período de vida desses camundongos é de menos de 22 semanas. Em um estudo inicial, 3 µl do vírus ao título máximo foram aplicados por ICV em P23, com uma dose final de 2.4e10 vg (6.0e10 vg/g do cérebro). Com 6 camundongos por grupo, os grupos do tratamento eram:

WT + Excipiente ICV

4L/PS-NA + Excipiente ICV

4L/PS-NA + 2.4e10 vg (6.0e10 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV

[0155] O desempenho motor pelo teste de caminhar na travessa foi avaliado 4 semanas após a aplicação de rAAV-GBA1. O grupo dos camundongos mutantes que receberam rAAV-GBA1 mostrou uma tendência para menos escorregadelas no total e menos escorregadelas por velocidade quando comparado aos camundongos mutantes tratados com o excipiente, restaurando a função motora até quase níveis de WT (FIGURA 17). Uma vez que os fenótipos da função motora se tornam mais graves à medida que esses camundongos envelhecem, o seu desempenho neste e em outros testes comportamentais é avaliado em pontos no tempo mais adiante. Na conclusão do estudo em vida, os níveis de lipídios, a atividade de GCase e a biodistribuição são avaliados nesses camundongos.

[0156] Doses menores adicionais de rAAV-GBA1 estão sendo testadas atualmente ao usar o modelo de CBE, que corresponde a 0,03x, 0,1x e 1x a dose clínica elevada de fase 1 proposta. Cada grupo inclui 10 camundongos (5M/5F) por grupo:

Excipiente ICV

Excipiente ICV + 25 mg/kg de CBE IP

3.2e8 vg (2.13e9 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV + 25 mg/kg de CBE IP

1.0e9 vg (6.67e9 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV + 25 mg/kg de CBE IP

1.0e10 vg (6.67e10 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV + 25 mg/kg de CBE IP.

[0157] Além dos fenótipos da função motora, os níveis de lipídios e a atividade de GCase são avaliados no córtex. O curso do tempo dos tratamentos e das análises também é executado.

[0158] Um estudo de maior variação da dose foi iniciado para avaliar os dados da eficácia e da segurança. 10 camundongos 4L/PS-NA (5M/5F por grupo) foram injetados com 10 µl de rAAV-GBA1. Ao usar um cálculo do peso alométrico do cérebro, as doses foram correlacionadas a 0,15x, 1,5x, 4,4x e 14,5x a dose elevada clínica da fase 1 proposta. Os grupos de injeção consistem em:

WT + Excipiente ICV

4L/PS-NA + Excipiente ICV

4L/PS-NA + 4.3e9 vg (1.1e10 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV

4L/PS-NA + 4.3e10 vg (1.1e11 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV

4L/PS-NA + 1.3e11 vg (3.2e11 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV

4L/PS-NA + 4.3e11 vg (1.1e12 vg/g do cérebro) rAAV-GBA1 ICV.

[0159] Um sumário de estudos não clínicos no modelo de CBE é mostrado na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3: Sumário dos Resultados no Modelo de Camundongo CBE

Material de teste	Número do estudo	Coorte da dose	Mudanças Comportamentais			Lipídios	Enzima	BD	
			Rotarod	Haste Atulilada	Campo Aberto			Cérebro	Fígado
rAAV-GBA1	PRV-2018-005 Faixa de dose de rAAV-GBA1 no modelo CBE	3.2e9 vg (2.13e10 vg/g cérebro)	NS	NS	NS	NS	NS	+	-
		1.10e10 vg (6.67e10 vg/g cérebro)	T	NS	NS	T/S	NS	+	+
		2.3e10vg (2.13e11 vg/g cérebro)	S	S	NS	S	S	+	+
Variante	PRV-2018-005 Faixa de dose de Variante no modelo CBE	8.8e9 vg (5.9e10 vg/g cérebro)	S	N/A	NS	S	S	+	+

Deve ser observado que a biodistribuição positiva é definida como > 100 vg/l µg de DNA genômico.

Abreviaturas: BD = biodistribuição; NS = não significativo; T = tendência; S = significativo; N/A = não aplicável; + = positivo; - = negativo.

Exemplo 9: Análise in vitro de vetores de rAAV

[0160] Construtos de rAAV foram testados *in vitro* e *in vivo*. A FIGURA 18 mostra os dados representativos para a expressão *in vitro* dos construtos de rAAV que codificam a proteína programulina (PGRN). O

painel à esquerda mostra uma curva padrão do ensaio de ELISA da programulina (PGRN). O painel inferior mostra uma resposta à dose da expressão de PGRN medida pelo ensaio ELISA em lisatos de célula de células HEK293T transduzidas com rAAV. MOI = multiplicidade da infecção (genomas de vetor por célula).

[0161] Um estudo piloto foi realizado para avaliar a atividade *in vitro* dos vetores do rAAV que codificam a Prosaposina (PSAP) e SCARB2, sozinhas ou em combinação com GBA1 e/ou um ou mais RNAs inibidores. Um construto que codifica PSAP e a programulina (PGRN) também foi testado. Os vetores testados incluem aqueles mostrados na Tabela 4. "Opt" refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códons para a expressão em células de mamíferos (por exemplo, células humanas). A FIGURA 19 mostra os dados representativos que indicam que a transfecção das células HEK293 com cada um dos construtos resultou na superexpressão do produto de gene correspondente em comparação às células transfetadas de simulacro.

[0162] Um estudo piloto foi realizado para avaliar a atividade *in vitro* dos vetores de rAAV que codificam TREM2, sozinhas ou em combinação com um ou mais RNAs inibidores. Os vetores testados incluem aqueles mostrados na Tabela 4. "Opt" refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos optimizada com códons para a expressão em células de mamíferos (por exemplo, células humanas). As FIGURAS 36A e 36B mostram os dados representativos que indicam que a transfecção de célula HEK293 com cada um dos construtos resultou na superexpressão do produto de gene correspondente em comparação às células transfetadas de simulacro.

Tabela 4

ID	Promotor	RNA inibidor	Promotor	Transgene
I00015	JL_intrônico	SCNA	JetLong	OptPSAP_GBA1
I00039	-	-	JetLong	Opt-PSAP-GRN
I00046	-	-	CBA	Opt-PSAP
I00014	JetLong	SCNA	JetLong	Opt-SCARB2_GBA1
I00040			JL, CD68	opt-GBA1, TREM2

*Exemplo 10: Teste de construtos de shRNA de SCNA e TMEM106B**Células HEK293*

[0163] A linhagem de células do rim embrionárias 293 (HEK293) foi usada neste estudo (# 85120602, Sigma-Aldrich). As células HEK293 foram mantidas no meio de cultura (D-MEM [# 11995065, Thermo Fisher Scientific] suplementado com soro fetal de bovino a 10% [FBS] [# 10082147, Thermo Fisher Scientific]) contendo 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (# 15140122, Thermo Fisher Scientific).

Transfecção de plasmídeo

[0164] A transfecção de plasmídeo foi executada ao usar o reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (# 11668019, Thermo Fisher Scientific) de acordo com a instrução do fabricante. Resumidamente, as células HEK293 (# 12022001, Sigma-Aldrich) foram chapeadas à densidade de 3×10^5 células/ml em um meio de cultura sem antibióticos. No dia seguinte, o plasmídeo e o reagente Lipofectamine 2000 foram combinados em uma solução de Opti-MEM (# 31985062, Thermo Fisher Scientific). Depois de 5 minutos, as misturas foram adicionadas à cultura de HEK293. Depois de 72 horas, as células foram colhidas para a extração do RNA ou de proteína, ou sujeitadas a análises de imagens. Para as análises de imagens, as placas foram pré-revestidas com 0,01% de uma solução de poli-L-Lisina (P8920, Sigma-Aldrich) antes do chapeamento das células.

Análise da expressão do gene por análise PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR)

[0165] Os níveis relativos da expressão do gene foram determinados por meio de análise PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR) ao usar o Kit Power SYBR Green Cells to CT (# 4402955, Thermo Fisher Scientific) de acordo com a instrução do fabricante. Os plasmídeos candidatos foram transfectados de modo transiente nas células HEK293

chapeadas em placas de 48 poços ($7,5 \times 10^4$ células) ao usar o reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (0,5 µg de plasmídeo e 1,5 µl de reagente em 50 µl da solução de Opti-MEM). Depois de 72 horas, o RNA foi extraído das células e usado para a transcrição reversa para sintetizar o DNA de acordo com a instrução do fabricante. Para a análise PCR quantitativa, 2 a 5 µl de produtos de cDNA foram amplificados em duplicatas ao usar pares de iniciadores específicos de genes (concentração final de 250 nM) com a mistura Power SYBR Green PCR Master (# 4367659, Thermo Fisher Scientific). As sequências de iniciadores para os genes de SNCA, TMEM106B e GAPDH eram: 5'- AAG AGG GTG TTC TCT ATG TAG GC -3' (SEQ ID NO: 71), 5'- GCT CCT CCA ACA TTT GTC ACT T -3' (SEQ ID NO: 72) para SNCA, 5'-ACA CAG TAC CTA CCG TTA TAG CA-3' (SEQ ID NO: 73), 5'-TGT TGT CAC AGT AAC TTG CAT CA-3' (SEQ ID NO: 74) para TMEM106B, e 5'- CTG GGC TAC ACT GAG CAC C -3' (SEQ ID NO: 75), 5'- AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG -3' (SEQ ID NO: 76) para GAPDH. A análise PCR quantitativa foi executada em um sistema QuantStudio 3 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Os níveis da expressão foram normalizados pelo gene GAPDH doméstico e calculados ao usar o método de CT comparativa.

Análise de Imagem de Fluorescência

[0166] Os plasmídeos repórteres de EGFP, que contêm 3'-TUR do gene de SNCA humano a jusante da região de codificação de EGFP, foram usados para a validação de plasmídeos de knockdown de SNCA e TMEM106B. Os plasmídeo repórteres de EGFP os plasmídeos de knockdown candidatos foram transfetados simultaneamente nas células HEK293 chapeadas nas placas de 96 poços revestidas com poli-L-Lisina ($3,0 \times 10^4$ células) ao usar o reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (0,04 µg de plasmídeo repórter, 0,06 µg de plasmídeo de knockdown e 0,3 µl de reagente em 10 µl da solução de Opti-MEM).

Depois de 72 horas, as intensidades fluorescentes do sinal de EGFP foram medidas à excitação de 488 nm/emissão de 512 nm ao usar o leitor multimodal Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific). As células foram fixadas com 4% de PFA à temperatura ambiente por 10 minutos, e incubadas com D-PBS contendo 40 µg/ml de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem com D-PBS, as intensidades fluorescentes do sinal de 7-AAD foram medidas à excitação de 546 nm/emissão de 647 nm ao usar o leitor Varioskan para quantificar o número das células. O sinal de EGFP normalizado por níveis de sinal de 7-AAD foi comparado com as amostras de knockdown de controle.

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

[0167] Plasmídeos repórteres de α-Sinucleína, que contêm 3'-UTR de gene de SNCA humano ou de gene de TMEM106B a jusante da região de codificação de SNCA, foram usados para a validação de plasmídeos de knockdown ao nível da proteína. Os níveis da proteína α-Sinucleína foram determinados por meio de ELISA (# KHB0061, Thermo Fisher Scientific) ao usar os lisatos extraídos de células HEK293. Os plasmídeos candidatos foram transfetados de modo transiente nas células HEK293 chapeadas em placas de 48 poços ($7,5 \times 10^4$ células) ao usar o reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (0,1 µg de plasmídeo repórter, 0,15 µg de plasmídeo de knockdown e 0,75 µl de reagente em 25 µl da solução de Opti-MEM). Depois de 72 horas, as células foram lisadas em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) (# 89900, Thermo Fisher Scientific) suplementado com o coquetel de inibidor de protease (# P8340, Sigma-Aldrich), e submetido à sonicação por alguns segundos. Após a incubação em gelo por 30 minutos, os lisatos foram centrifugados a 20.000 x g a 4°C por 15 minutos, e o sobrenadante foi coletado. Os níveis de proteína foram quantificados. As placas

foram lidas em um leitor de placa Varioskan a 450 nm, e as concentrações foram calculadas ao usar o software SoftMax Pro 5. As concentrações de proteína medidas foram normalizadas à concentração de proteína total determinada com um ensaio de ácido bicinconínico (# 23225, Thermo Fisher Scientific).

[0168] A FIGURA 37 e a Tabela 5 mostram os dados representativos que indicam o silenciamento bem sucedido de SCNA em ensaio de repórter de GFP *in vitro* (topo) e ensaio de α-Syn (base). A FIGURA 38 e a Tabela 6 mostram dados representativos que indicam o silenciamento bem sucedido de TMEM106B *in vitro* pelo ensaio de repórter de GFP (topo) e ensaio de α-Syn (base).

Tabela 5

ID	Promotor	Knockdown	Promotor	Superexpressão
I00007	CMV_intrônico	SNCA_mi	CMV	opt-GBA1
I00008	H1	SNCA_sh	CMV	opt-GBA1
I00009	H1	SNCA_Pubsh4	CMV	opt-GBA1
I00014	JL_intrônico	SNCA_mi	JetLong	opt-SCARB2_GBA
I00015	JL_intrônico	SNCA_mi	JetLong	opt-PSAP_GBA
I00016	JL_intrônico	SNCA_mi	JetLong	opt-CTSB_GBA
I00019	JL_intrônico	SNCA_TMEM_mi	JetLong	opt-VPS35
I00023	JL_intrônico	SNCA_mi	JetLong	opt-GBA1_IL34
I00024	JL_intrônico	SNCA_mi	JetLong	opt-GBA2
I00028	intrônico	SNCA_Broadsh	CMV	opt-GBA1
I00029	Intrônico	SNCA_Pubsh4	CMV	opt-GBA1

Tabela 6

ID	Promotor	Knockdown	Promotor	Superexprsão
I00010	H1	TMEM_Pubsh	CMV	opt-GRN
I00011	JL_intrônico	TMEM_mi	JetLong	opt-GBA1_GRN
I00012	H1	TMEM_sh	CMV	opt-GRN
I00019	JL_intrônico	SNCA_TMEM_mi	JetLong	opt-VPS35

Exemplo 11: Colocação da sequência "D" de ITR e transdução de células

[0169] O efeito da colocação da sequência "D" de ITR na transdução de células de vetores de rAAV foi investigado. As células HEK293 foram transduzidas com os rAAVs de codificação de Gcase que têm 1) ITRs do tipo selvagem (por exemplo, sequências de "D" proximais à inserção do transgene e distais ao terminal da ITR) ou 2) ITRs com a sequência "D" localizada na "parte externa" do vetor (por exemplo, a sequência "D" proximal ao terminal da ITR e distal da inserção do transgene), tal como mostrado na FIGURA 20. Surpreendentemente, os dados indicam que os rAAVs que têm a sequência de "D" localizada na posição da "parte externa" retêm a capacidade de serem compactados de transduzir as células eficientemente (FIGURA 40).

Exemplo 12: Teste in vitro de rAAVs de Progranulina

[0170] A FIGURA 39 é um diagrama esquemático que ilustra uma modalidade de um vetor que compreende um construto de expressão que codifica PGRN. A Progranulina é superexpressa no CNS de roedores com déficit de GRN, tanto heterozigóticos quanto homozigóticos para a deleção de GRN, por meio da injeção de um vetor de rAAV que codifica PGRN (por exemplo, PGRN otimizada com códons), pela injeção tanto intraparenquimal quanto intratecal tal como na cisterna magna.

[0171] Os camundongos são injetados a 2 meses ou 6 meses de idade, e envelhecidos até 6 meses ou 12 meses, e analisados quanto a um ou mais do que segue: nível de expressão de GRN aos níveis de RNA e de proteína, ensaios comportamentais (por exemplo, movimento melhorado), ensaios de sobrevivência (por exemplo, sobrevivência melhorada), marcadores de microglia e inflamatórios, gliose, perda neuronal, Lipofuscinose e/ou resgate de acumulação de marcador Lisosomal, tal como LAMP1. Os ensaios em camundongos com déficit de

PGRN são descritos, por exemplo, por Arrant et al. (2017) *Brain* 140: 1477-1465; Arrant et al. (2018) *J. Neuroscience* 38(9):2341 –2358; e Amado et al. (2018) doi:<https://doi.org/10.1101/30869>; cujos teores integrais são incorporados no presente documento a título de referência.

EQUIVALENTES

[0172] Este pedido de patente incorpora a título de referência os conteúdos dos documentos a seguir em sua totalidade: Pedido de Patente PCT Internacional referente ao Documento de Advogado número P1094.70002WO00, depositado em 03 de outubro de 2018; Pedido de Patente PCT Internacional referente ao Documento de Advogado número P1094.70004WO00, depositado em 03 de outubro de 2018; Pedidos de Patente Provisórios Números de Série 62/567.296, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS"; 62/567.311, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS"; 62/567.319, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS"; 62/567.301, depositado em 03 de outubro de 2018, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS"; 62/567.310, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS"; 62/567.303, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSSOMAIS"; 62/567.305, depositado em 03 de outubro de 2017, intitulado "TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LISOSOMAIS".

[0173] Tendo desse modo sido descritos vários aspectos de pelo menos uma modalidade da presente invenção, deve ser apreciado que várias alterações, modificações e melhorias irão ocorrer de imediato aos elementos versados na técnica. Tais alterações, modificações e melhorias devem ser consideradas como parte desta invenção, e devem estar

dentro do caráter e do âmbito da invenção. Por conseguinte, a descrição e os desenhos acima são apenas a título de exemplo.

[0174] Embora várias modalidades da presente invenção tenham sido descritas e ilustradas no presente documento, os elementos normalmente versados no estado da técnica irão vislumbrar de imediato uma variedade de outros meios e/ou estruturas para executar as funções e/ou obter os resultados e/ou uma ou mais das vantagens descritas no presente documento, e cada uma de tais variações e/ou modificações é considerada para estando dentro do âmbito da presente invenção. De modo mais geral, os elementos versados na técnica irão apreciar de imediato que todos os parâmetros, dimensões, materiais e configurações descritos no presente documento devem ser considerados como exemplificadores, e que os parâmetros, as dimensões, os materiais e/ou as configurações reais irão depender da aplicação ou das aplicações específicas para as quais os ensinamentos da presente invenção são usados. Os elementos versados na técnica irão reconhecer, ou poderão verificar ao usar uma experimentação não mais do que rotineira, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descritas no presente documento. Portanto, deve ser compreendido que as modalidades acima são apresentadas apenas a título de exemplo e que, dentro do âmbito das reivindicações e dos equivalentes adicionados à mesma, a invenção pode ser praticada de uma outra maneira que não aquela especificamente descrita e reivindicada. A presente invenção é dirigida a cada característica, sistema, artigo, material e/ou método individuais descritos no presente documento. Além disso, qualquer combinação de dois ou mais de tais características, sistemas, artigos, materiais e/ou métodos, se tais características, sistemas, artigos, materiais e/ou métodos não forem mutuamente inconsistentes, é incluída dentro do âmbito da presente invenção.

[0175] Os artigos indefinidos "um" e "uma", tal como usado no presente documento no relatório descritivo e nas reivindicações, a menos que esteja indicado claramente de alguma outra maneira, devem ser compreendidos como se referindo a "pelo menos um".

[0176] A expressão "e/ou", tal como usada no presente documento no relatório descritivo e nas reivindicações, deve ser compreendida como se referindo a "qualquer um ou ambos" elementos assim unidos, isto é, os elementos que estão presentes em conjunto em alguns casos e presentes não conjuntamente em outros casos. Outros elementos podem estar opcionalmente presentes além dos elementos identificados especificamente pela cláusula "e/ou", quer estejam relacionados ou não relacionados aos elementos identificados especificamente a menos que esteja indicado claramente de alguma outra maneira. Desse modo, como um exemplo não limitador, uma referência a "A e/ou B," quando usada em conjunto com a linguagem de sentido aberto tal como "compreende" pode se referir, em uma modalidade, a A sem B (opcionalmente incluindo elementos que não B); em uma outra modalidade, a B sem A (opcionalmente incluindo elementos que não A); em ainda uma outra modalidade, a A e a B (opcionalmente incluindo outros elementos); etc.

[0177] Tal como usado no presente documento no relatório descritivo e nas reivindicações, "ou" deve ser compreendido como tendo o mesmo significado que "e/ou" tal como definido acima. Por exemplo, quando itens são separados em uma lista, "ou" ou "e/ou" será interpretado como sendo inclusivo, isto é, a inclusão de pelo menos um, mas também incluindo mais de um, de um número ou de uma lista de elementos e, opcionalmente, itens não listados adicionais. Somente os termos indicados claramente de alguma outra maneira, tais como "sómente um de" ou "exatamente um de" ou, quando usados nas reivindi-

cações, "consiste", irão de referir à inclusão de exatamente um elemento de um número ou uma lista de elementos. De modo geral, o termo "ou", tal como usado no presente documento, será interpretado somente como indicando alternativas exclusivas (isto é "uma ou a outra, mas não ambas") quando precedido por termos de exclusividade tais como "qualquer um de", "um de", "somente um de" ou "exatamente um de". "Consiste essencialmente em", quando usado nas reivindicações, terá o seu significado comum tal como usado no campo da lei de patentes.

[0178] Tal como usado no presente documento no relatório descriptivo e nas reivindicações, a expressão "pelo menos um", em referência a uma lista de um ou mais elementos, deve ser compreendido como se referindo a pelo menos um elemento selecionado de qualquer um ou mais dos elementos na lista de elementos, mas não incluindo necessariamente pelo menos um de cada elemento listado especificamente dentro da lista de elementos e não excluindo quaisquer combinações dos elementos na lista de elementos. Esta definição também permite que elementos possam estar opcionalmente presentes além dos elementos identificados especificamente dentro da lista de elementos aos quais a expressão "pelo menos um" se refere, quer esteja relacionado ou não aos elementos identificados especificamente. Desse modo, como um exemplo não limitador, "pelo menos um de A e B" (ou, de modo equivalente, "pelo menos um de A ou B," ou, de modo equivalente "pelo menos um de A e/ou B") pode se referir, em uma modalidade, a pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, A, sem nenhum B presente (e incluindo opcionalmente elementos que não B); em uma outra modalidade, a pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, B, sem nenhum A presente (e incluindo opcionalmente elementos que não A); em ainda uma outra modalidade, a pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, A, e pelo menos um, opcionalmente incluindo mais de um, B (e opcionalmente incluindo outros elementos); etc.

[0179] Nas reivindicações, assim como no relatório descritivo acima, todas as expressões de transição tais como "compreende", "inclui", "porta", "tem", "contém", "envolve", "mantém", e outras ainda devem ser compreendidas como de sentido aberto, isto é, significando que incluem mas sem ficar limitados a. Somente as expressões de transição "que consiste em" e "que consiste essencialmente em" serão expressões de transição de sentido fechado ou semifechado, respectivamente, tal como determinado United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, seção 2111.03.

[0180] O uso de expressões ordinais tais como "primeiro", "segundo", "terceiro", etc., nas reivindicações para modificar um elemento da reivindicação não conota em si nenhuma prioridade, precedência ou ordem de um elemento da reivindicação em relação a um outro ou a ordem temporal em que os atos de um método são executados, mas são usadas meramente como etiquetas para distinguir um elemento da reivindicação que tem um determinado nome de um outro elemento que tem um mesmo nome (mas para o uso do termo ordinal) para distinguir os elementos da reivindicação.

[0181] Também deve ser compreendido que, a menos que esteja indicado claramente de alguma outra maneira, em todos os métodos reivindicados no presente documento que incluem mais de uma etapa ou ato, a ordem das etapas ou dos atos do método não são limitados necessariamente à ordem em que as etapas ou os atos do método são recitados.

SEQUÊNCIAS

[0182] Em algumas modalidades, um cassete de expressão que codifica um ou mais produtos de genes (por exemplo, um primeiro, segundo e/ou terceiro produtos de genes) compreende ou consiste em (ou codifica um peptídeo que tem) em uma sequência indicada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-78. Em algumas modalidades, um produto de

gene é codificado por uma porção (por exemplo, fragmento) de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-78.

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína Gcase flanqueada por duas repetições de terminal invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV) (ITRs), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína Gcase é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

2. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína Gcase compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 14 ou uma porção da mesma.

3. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a proteína Gcase é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon, opcionalmente a sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 15.

4. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

5. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

6. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

7. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de

expressão que codifica uma proteína prosaposina flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs comprehende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína prosaposina é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

8. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a proteína prosaposina comprehende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 16 ou uma porção da mesma.

9. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que a proteína prosaposina é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon, opcionalmente a sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 17.

10. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

11. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, caracterizado pelo fato de que a ITR que comprehende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

12. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 11, caracterizado pelo fato de que comprehende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

13. Ácido nucleico isolado que comprehende um construto de expressão que codifica uma proteína SCARB2 flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV),

caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs comprehende uma região “D” modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína SCARB2 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

14. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a proteína SCARB2 comprehende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 18 ou uma porção da mesma.

15. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que a proteína SCARB2 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 19.

16. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, caracterizado pelo fato de que a região “D” modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

17. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, caracterizado pelo fato de que a ITR que comprehende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

18. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 17, caracterizado pelo fato de que comprehende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

19. Ácido nucleico isolado que comprehende um construto de expressão que codifica uma proteína GBA2 flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs comprehende uma região “D”

modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína GBA2 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

20. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a proteína GBA2 compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 30 ou uma porção da mesma.

21. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que a proteína GBA2 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 31.

22. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 21, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

23. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 22, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

24. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 23, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

25. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína GALC flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína GALC é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

26. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a proteína GALC compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 33 ou uma porção da mesma.

27. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 25 ou 26, caracterizado pelo fato de que a proteína GALC é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 34.

28. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 27, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

29. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 28, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

30. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 29, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

31. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína CTSB flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína CTSB é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

32. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a proteína CTSB compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 30 ou uma porção da mesma.

33. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que a proteína CTSB é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 36.

34. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 33, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

35. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 34, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

36. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 35, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

37. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína SMPD1 flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína SMPD1 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

38. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a proteína SMPD1 compreende a sequência

de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 37 ou uma porção da mesma.

39. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que a proteína SMPD1 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 38.

40. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 39, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

41. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 40, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

42. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 41, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

43. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína GCH1 flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína GCH1 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

44. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a proteína GCH1 compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 45 ou uma porção da mesma.

45. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 43

ou 44, caracterizado pelo fato de que a proteína GCH1 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 46.

46. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 45, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

47. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 46, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

48. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 47, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

49. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína RAB7L flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína RAB7L é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

50. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que a proteína RAB7L compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 47 ou uma porção da mesma.

51. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 49 ou 50, caracterizado pelo fato de que a proteína RAB7L é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de

ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 48.

52. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 51, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

53. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 52, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

54. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 53, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

55. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína VPS35 flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína VPS35 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

56. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que a proteína VPS35 compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 49 ou uma porção da mesma.

57. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizado pelo fato de que a proteína VPS35 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 50.

58. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das

reivindicações 55 a 57, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

59. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 58, caracterizado pelo fato de que a ITR que comprehende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

60. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 59, caracterizado pelo fato de que comprehende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

61. Ácido nucleico isolado que comprehende um construto de expressão que codifica uma proteína II-34 flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs comprehende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína II-34 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

62. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a proteína II-34 comprehende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 55 ou uma porção da mesma.

63. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 61 ou 62, caracterizado pelo fato de que a proteína II-34 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 56.

64. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 63, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

65. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 64, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

66. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 65, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

67. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína TREM2 flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína TREM2 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

68. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que a proteína TREM2 compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 57 ou uma porção da mesma.

69. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 67 ou 68, caracterizado pelo fato de que a proteína TREM2 é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 58.

70. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

71. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 70, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende

a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

72. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 71, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

73. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína TMEM106B flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

(i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou

(ii) a proteína TMEM106B é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

74. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a proteína TMEM106B compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 63 ou uma porção da mesma.

75. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 73 ou 74, caracterizado pelo fato de que a proteína TMEM106B é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 64.

76. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 75, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

77. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 76, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

78. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das

reivindicações 73 a 77, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

79. Ácido nucleico isolado que compreende um construto de expressão que codifica uma proteína Programulin (PGRN) flanqueada por duas repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV), caracterizado pelo fato de que

- (i) pelo menos uma das ITRs compreende uma região “D” modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO: 29); e/ou
- (ii) a proteína PGRN é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon.

80. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que a proteína PGRN compreende a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 67 ou uma porção da mesma.

81. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 79 ou 80, caracterizado pelo fato de que a proteína PGRN é codificada por uma sequência de ácidos nucleicos otimizada com códon ou pela sequência de ácidos nucleicos indicada na SEQ ID NO: 68.

82. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 81, caracterizado pelo fato de que a região “D” modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

83. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 82, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

84. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 83, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente

indicada na SEQ ID NO: 28.

85. Ácido nucleico isolado, o qual compreende um construto de expressão que codifica um primeiro produto de gene e um segundo produto de gene, caracterizado pelo fato de que cada produto de gene é selecionado independentemente dos produtos de gene, ou de porções dos mesmos, indicados na Tabela 1.

86. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o primeiro produto de gene é uma proteína Gcase, ou uma porção da mesma.

87. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que o segundo produto de gene é LIMP2 ou uma porção da mesma, ou Prosaposina ou uma porção da mesma.

88. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 87, caracterizado pelo fato de que também codifica um ácido nucleico intermediário (por exemplo, shRNA, miRNA, dsRNA, etc.), opcionalmente em que o ácido nucleico intermediário inibe a expressão de α-Syn ou TMEM106B.

89. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 88, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um ou mais promotores, opcionalmente em que cada um de um ou mais promotores é independentemente um promotor de beta actina de galinha (CBA), um promotor de CAG, um promotor de CD68, ou um promoter de JeT.

90. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 89, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um sítio de entrada ribossomal interno (IRES), em que o IRES fica localizado opcionalmente entre o primeiro produto de gene e o segundo produto de gene.

91. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das

reivindicações 85 a 90, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência de codificação de peptídeo de autoclivagem, opcionalmente em que o peptídeo de autoclivagem é T2A.

92. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 91, caracterizado pelo fato de que o construto de expressão compreende duas sequências de repetições terminais invertidas (ITRs) de vírus adeno-associado (AAV) que flanqueiam o primeiro produto de gene e o segundo produto de gene, opcionalmente em que uma das sequências de ITR não contém um sítio de resolução terminal funcional.

93. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das ITRs compreende uma região "D" modificada em relação a uma AAV2 ITR do tipo selvagem (SEQ ID NO:29).

94. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que a região "D" modificada é uma sequência de "D" situada na parte externa da ITR em relação ao construto de expressão.

95. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 93 ou 94, caracterizado pelo fato de que a ITR que compreende a sequência modificada de "D" é uma 3' ITR.

96. Ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 95, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência TRY, em que a sequência TRY é opcionalmente indicada na SEQ ID NO: 28.

97. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que tem a sequência determinada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 78.

98. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 97.

99. Vetor de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que o vetor é um plasmídeo.

100. Vetor de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor viral, opcionalmente em que o vetor viral é um vetor de AAV recombinante (rAAV) ou um vetor de Baculovirus.

101. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o ácido nucleico isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 97 ou o vetor como definido em qualquer uma das reivindicações 98 a 100.

102. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o ácido nucleico isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 97 ou o vetor como definido em qualquer uma das reivindicações 98 a 100.

103. Vírus adeno-associado recombinante (rAAV), caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) uma proteína de capsídeo; e

(ii) o ácido nucleico isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 97, ou o vetor como definido em qualquer uma das reivindicações 98 a 100.

104. rAAV de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que a proteína de capsídeo é capaz de cruzar a barreira de sangue-cérebro, opcionalmente em que a proteína de capsídeo é uma proteína de capsídeo AAV9 ou uma proteína de capsídeo AAVrh.10.

105. rAAV de acordo com a reivindicação 103 ou a 104, caracterizado pelo fato de que o rAAV transdiz as células neurais e as células não neurais do sistema nervoso central (CNS).

106. Método para tratamento de um indivíduo que tem ou é suspeito que tem mal de Parkinson, caracterizado pelo fato de que o método compreende a administração ao indivíduo de um ácido nucleico

isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 97, o vetor como definido em qualquer uma das reivindicações 98 a 100, a composição como definida na reivindicação 101, ou o rAAV como definido em qualquer uma das reivindicações 103 a 105.

107. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que a administração compreende a injeção direta ao CNS do indivíduo, opcionalmente em que a injeção direta é a injeção intracerebral, a injeção intraparenquimal, a injeção intratecal, a injeção intra-cisterna magna, ou qualquer combinação destas.

108. Método de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de que a injeção direta ao CNS do indivíduo compreende a aplicação realçada por convecção (CED).

109. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 108, caracterizado pelo fato de que a administração compreende a injeção periférica, opcionalmente em que a injeção periférica é a injeção intravenosa.

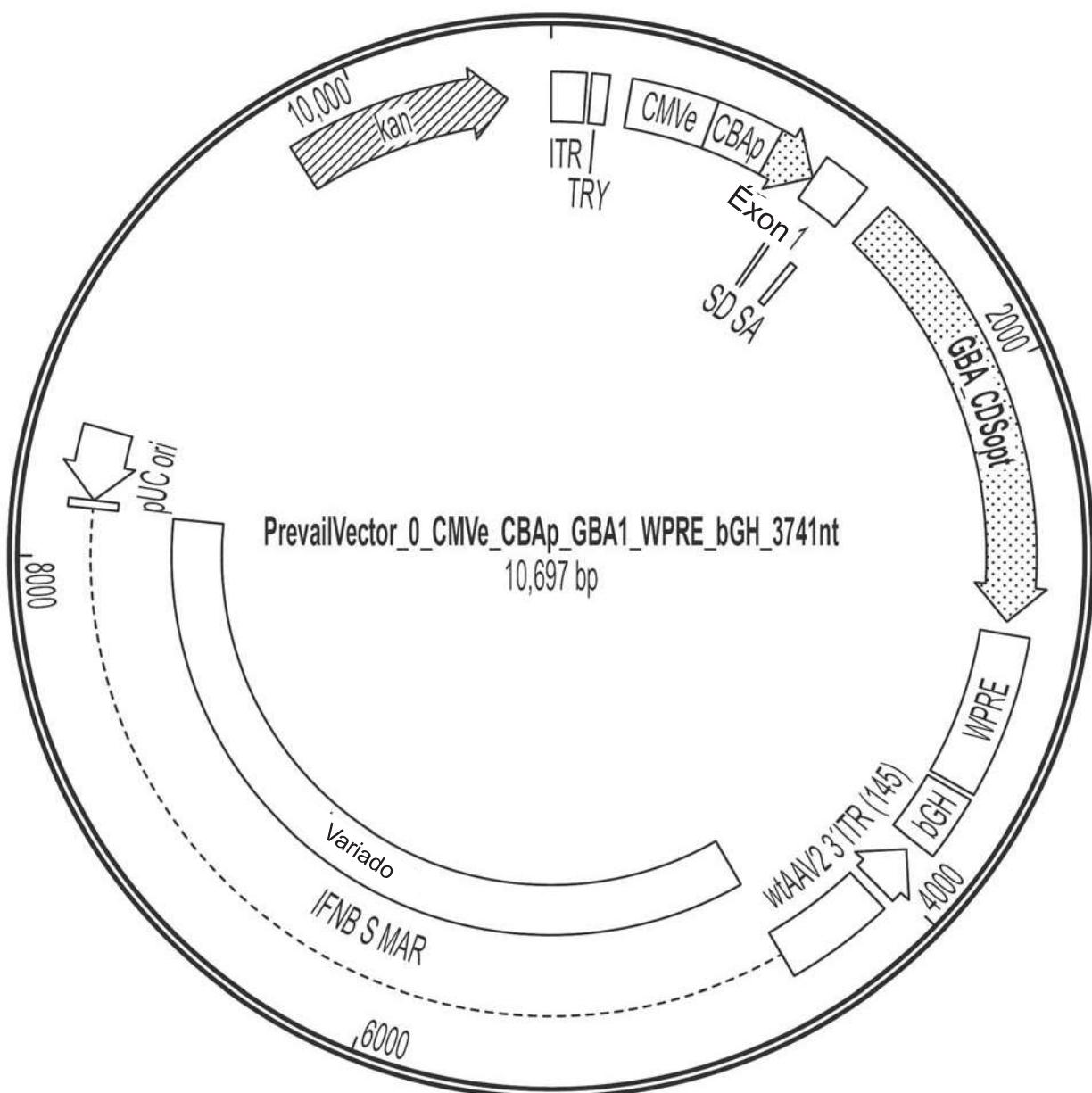


FIG. 1

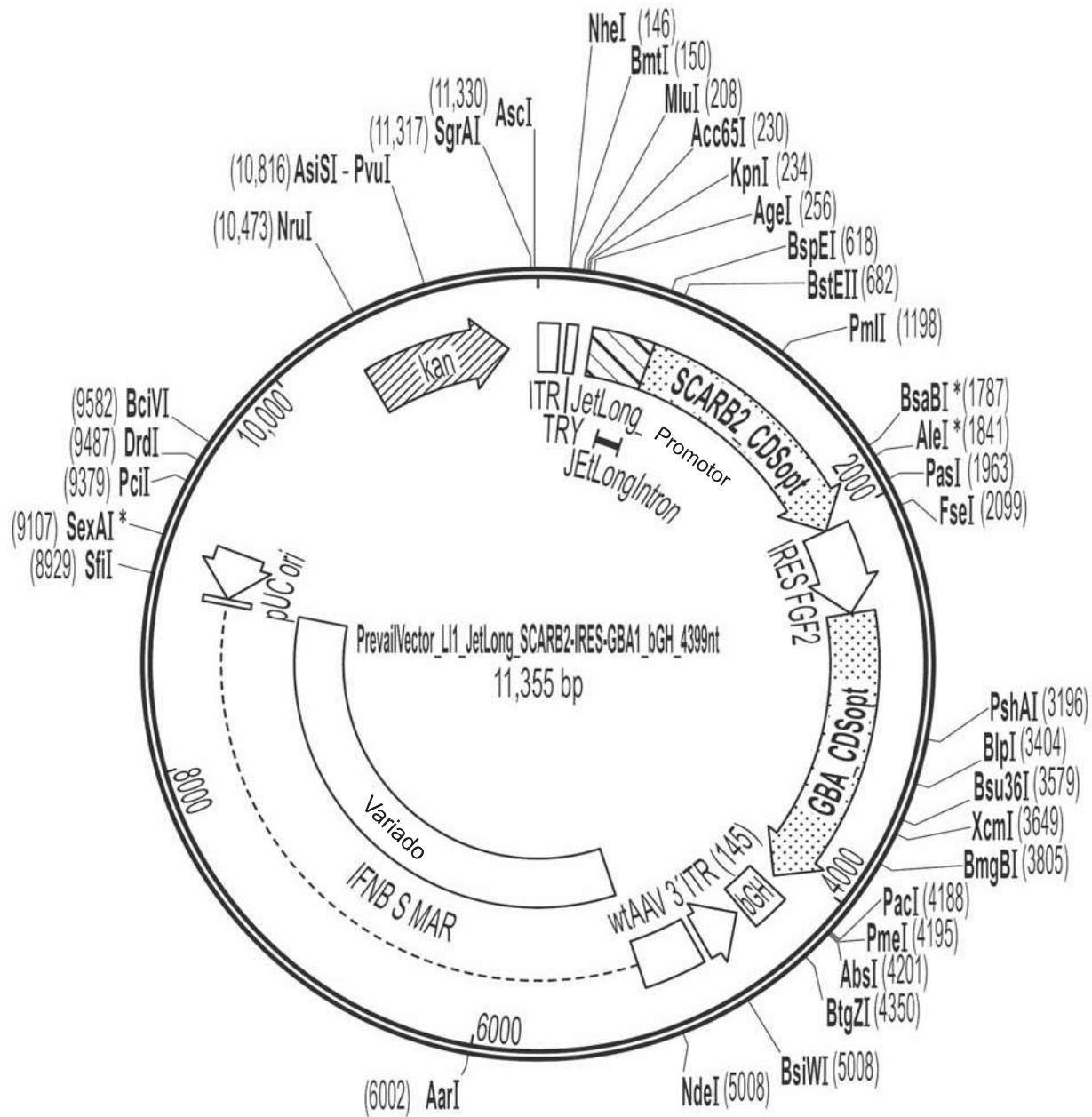


FIG. 2

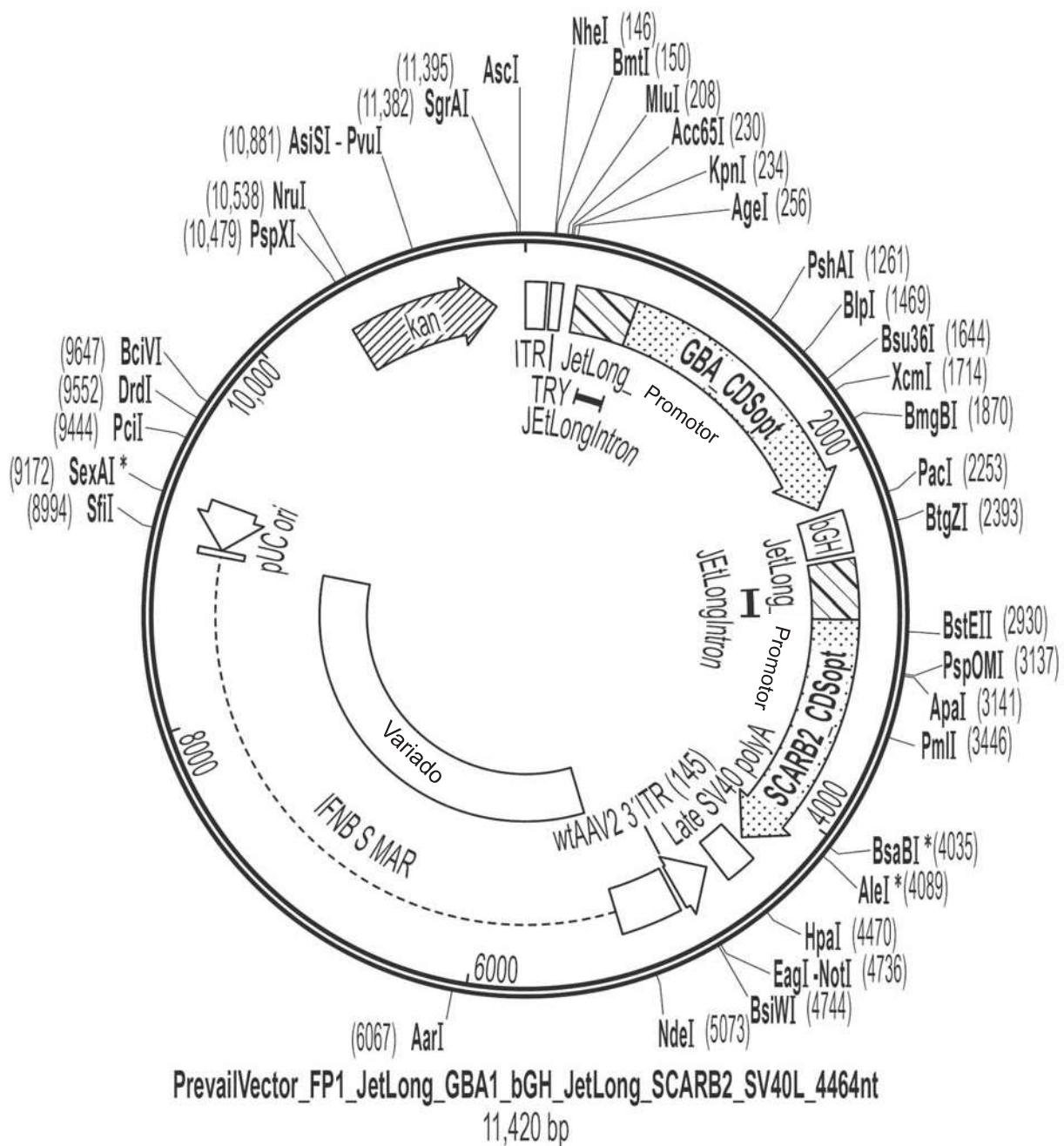


FIG. 3

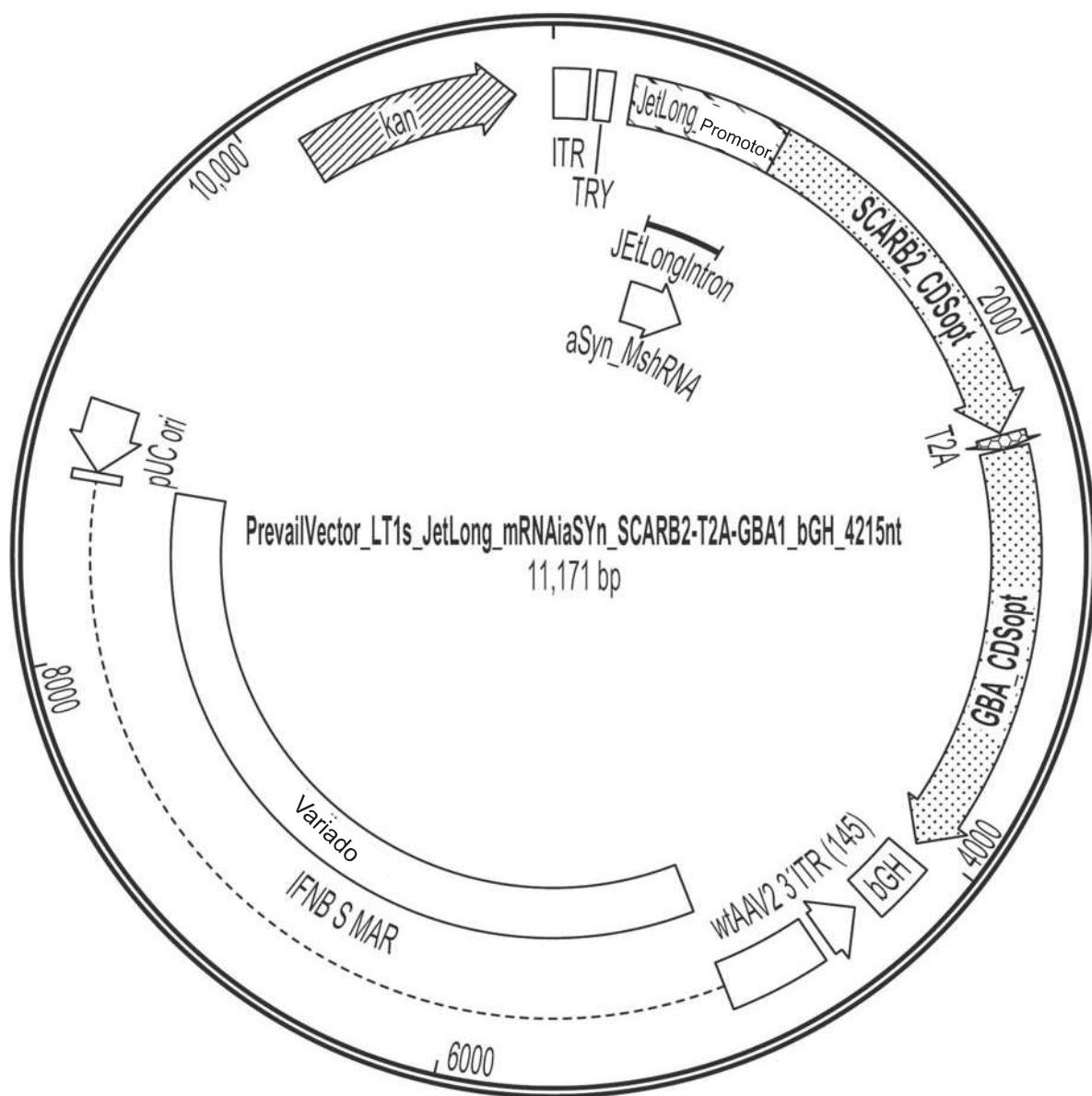


FIG. 4

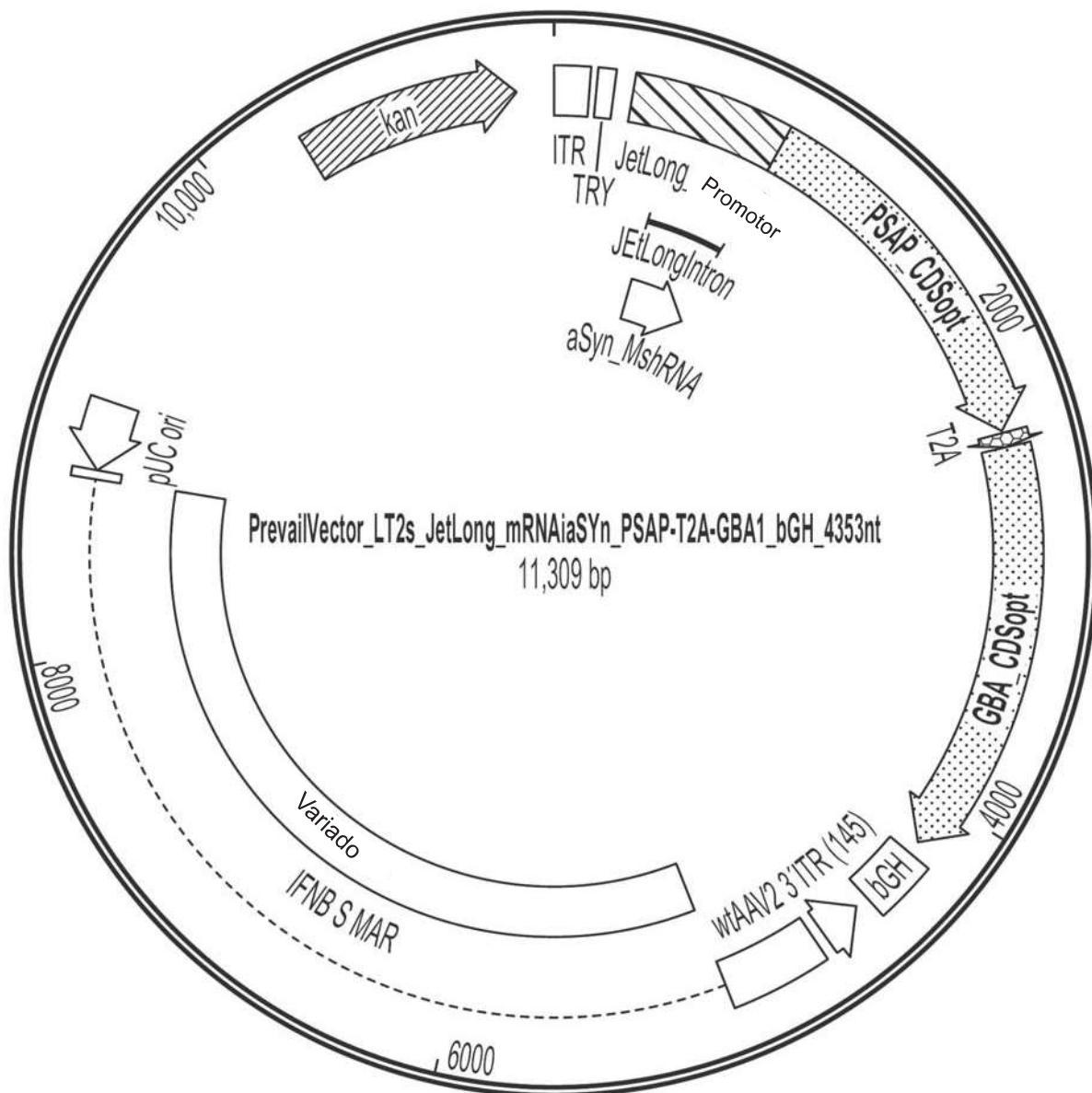


FIG. 5

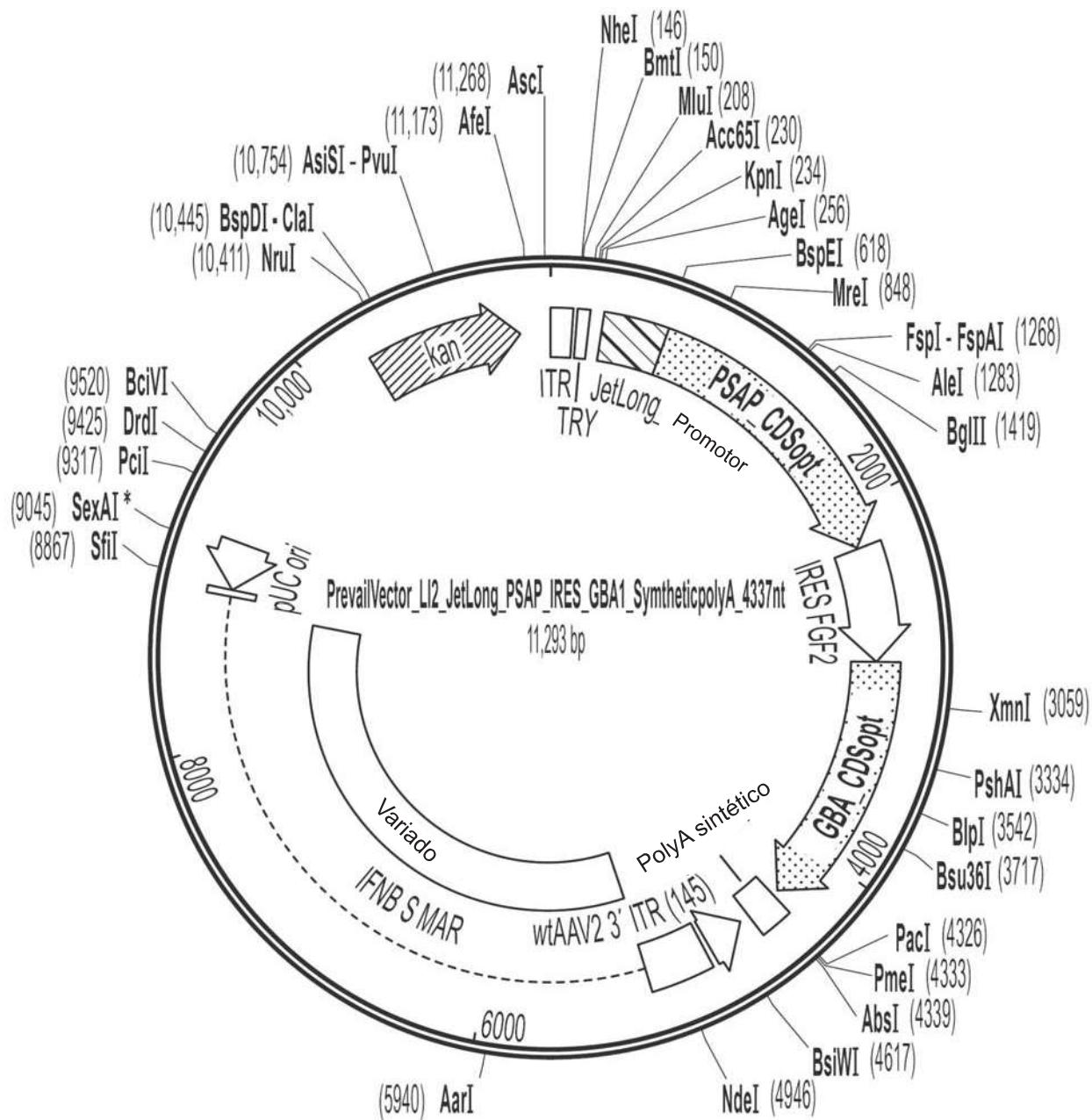


FIG. 6

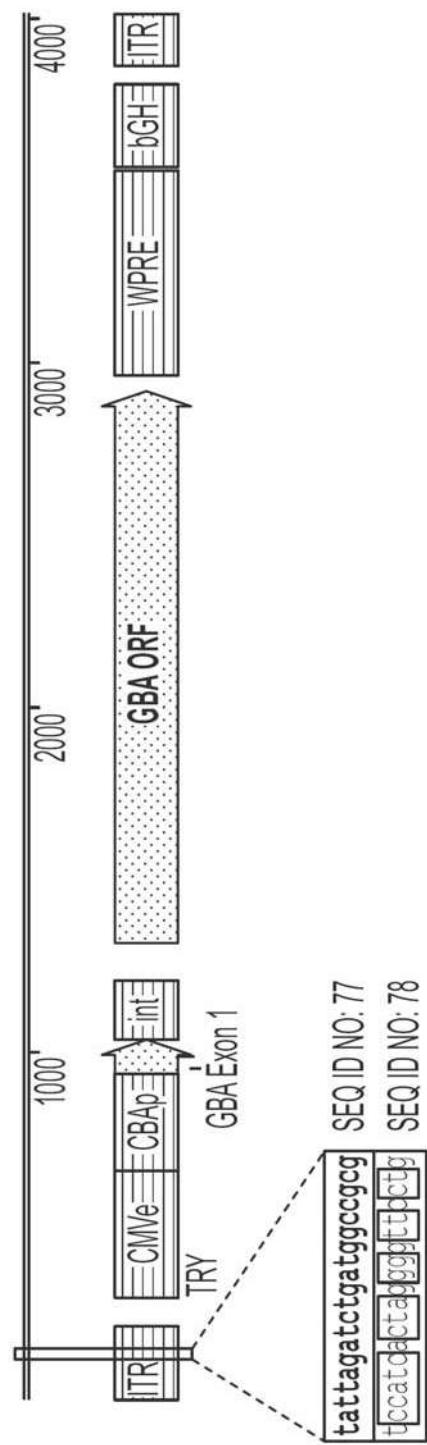


FIG. 7

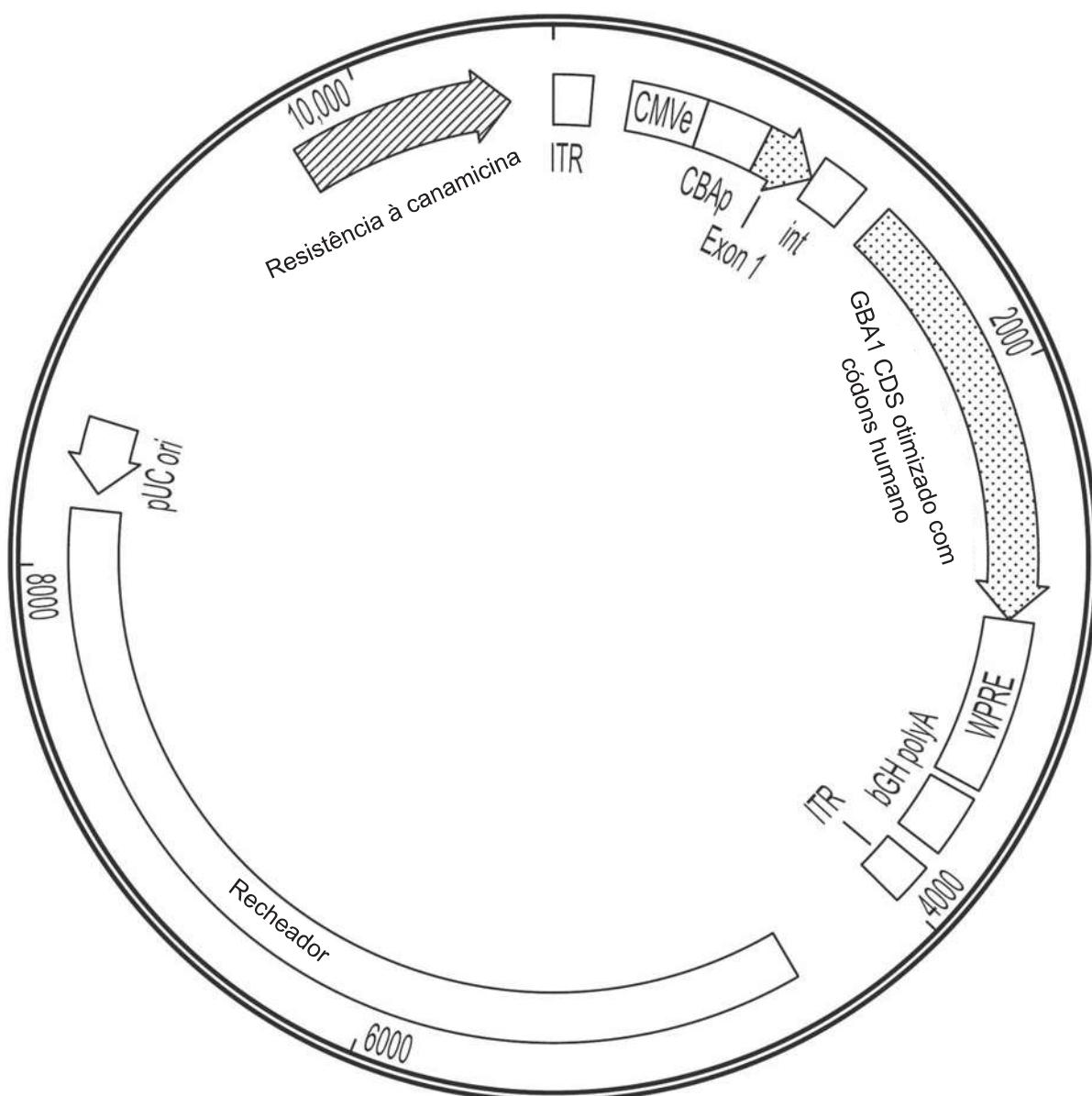


FIG. 8

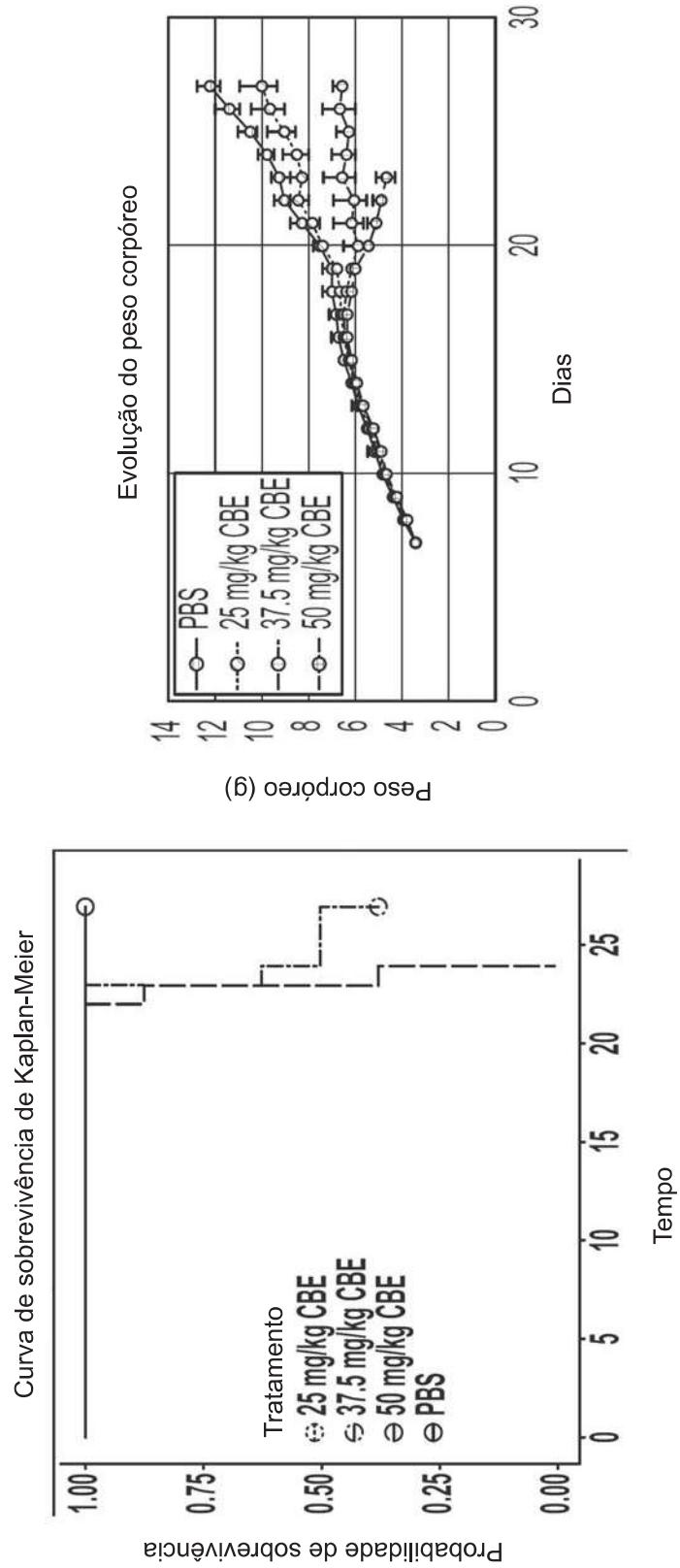


FIG. 9

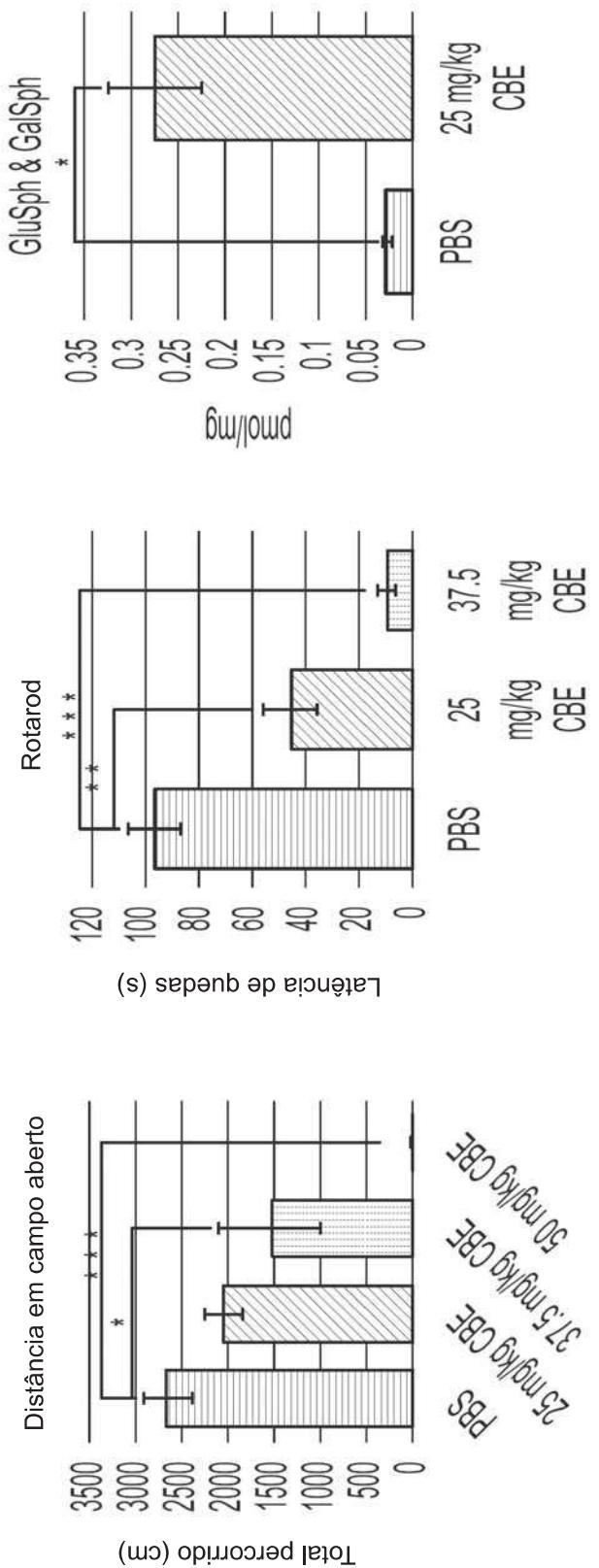


FIG. 9
CONTINUAÇÃO

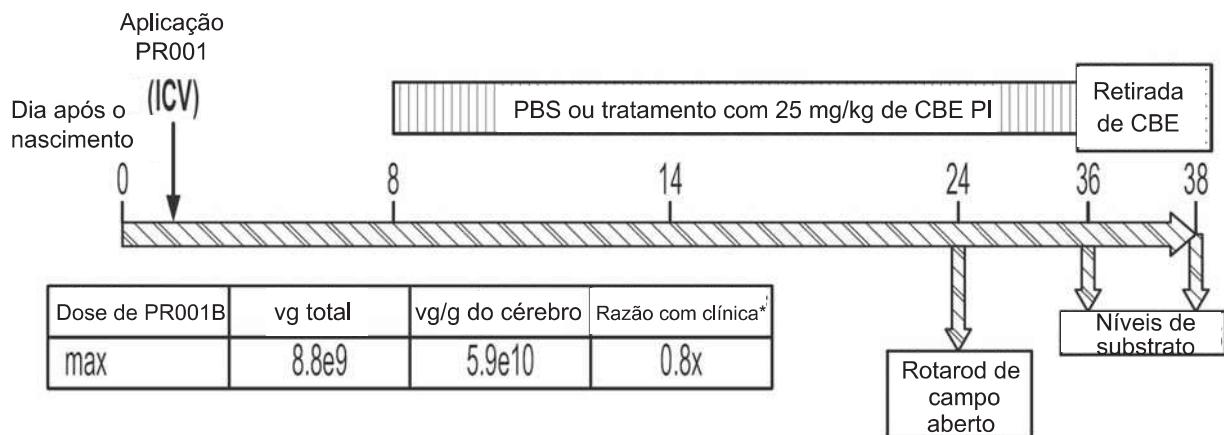


FIG. 10

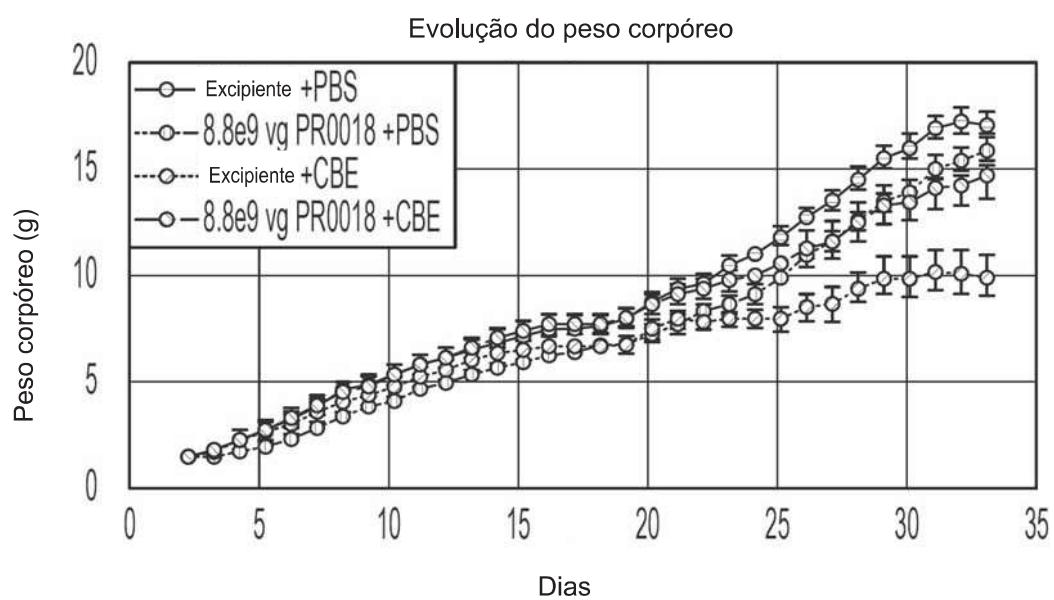


FIG. 11

12/48

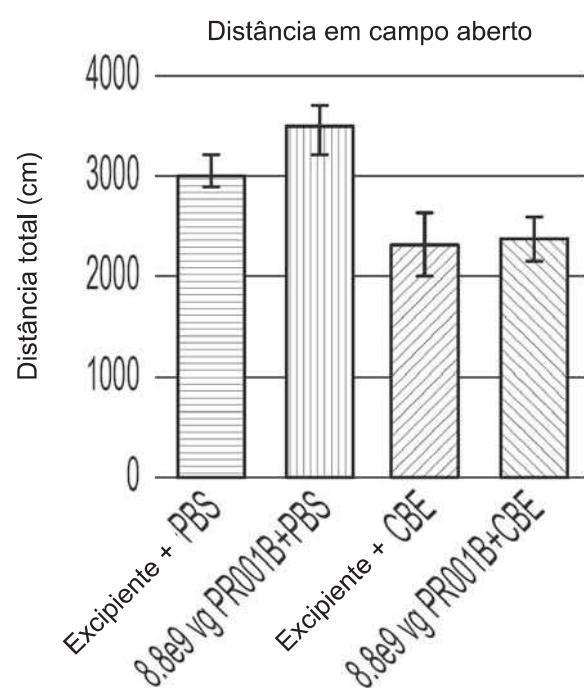
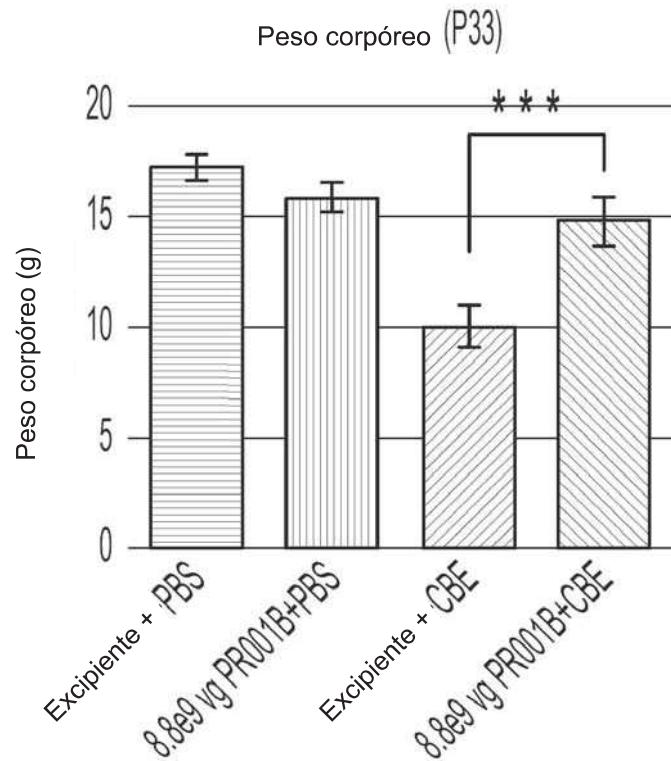


FIG. 11
CONTINUAÇÃO

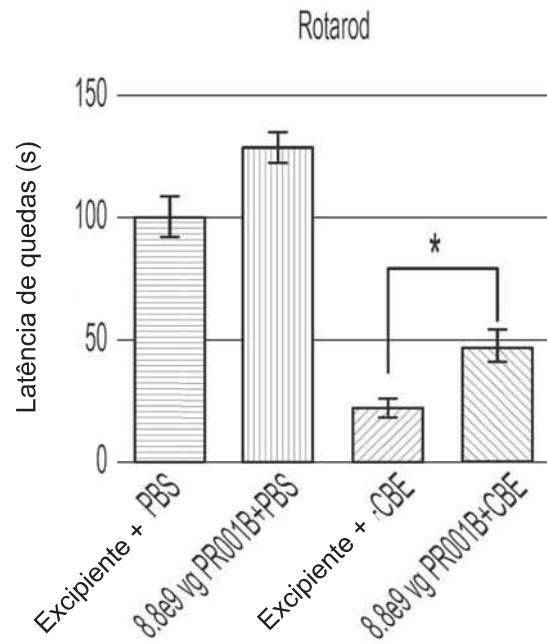


FIG. 11
CONTINUAÇÃO

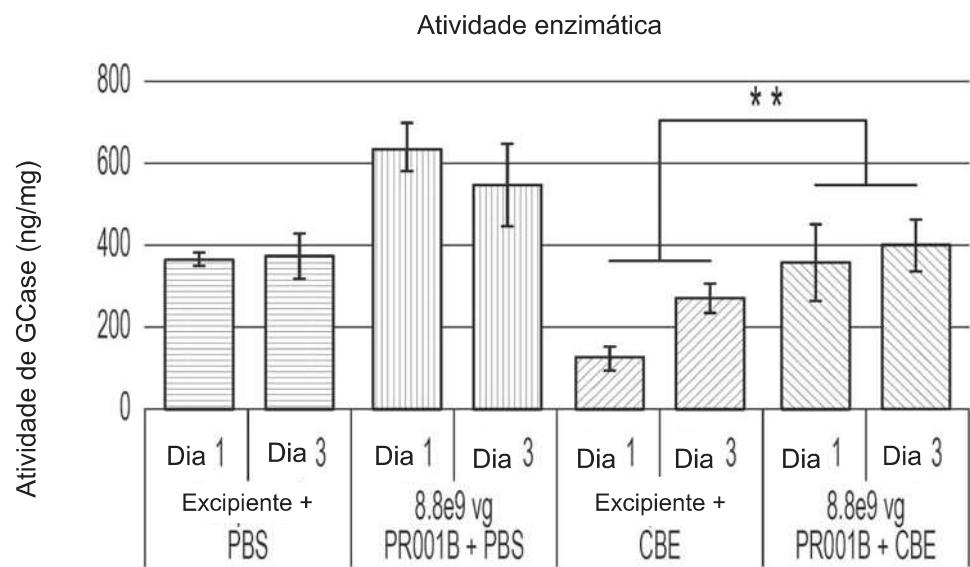


FIG. 12

14/48

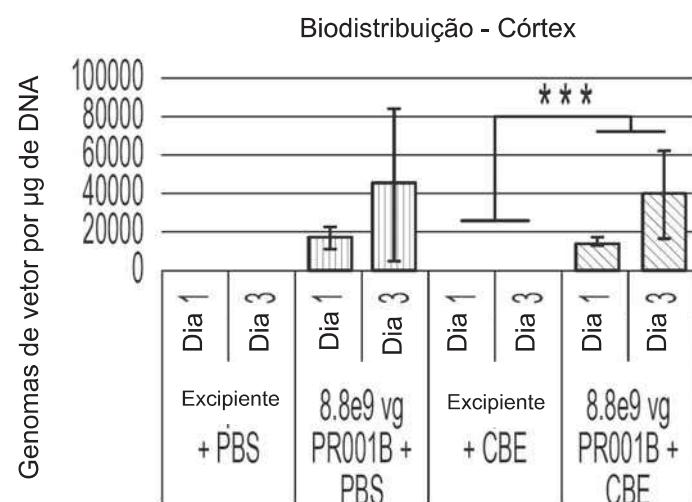
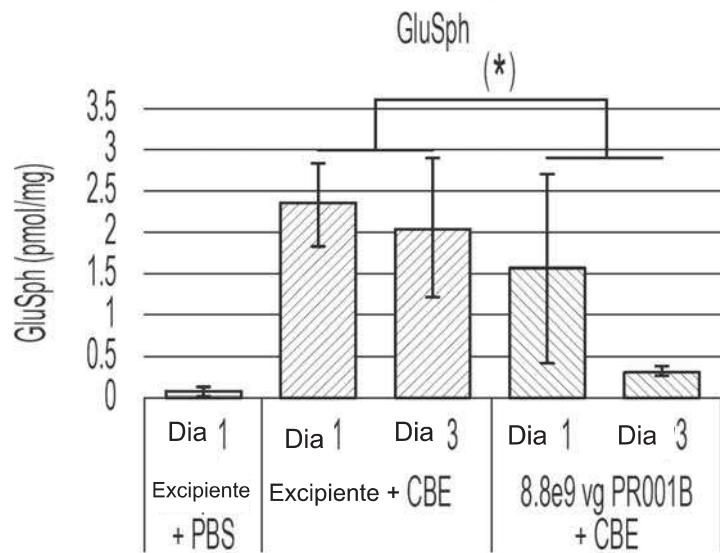
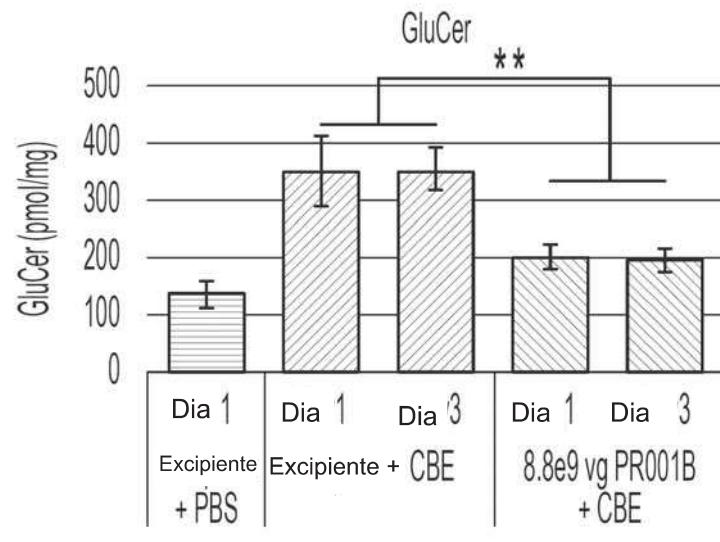


FIG. 12
CONTINUAÇÃO

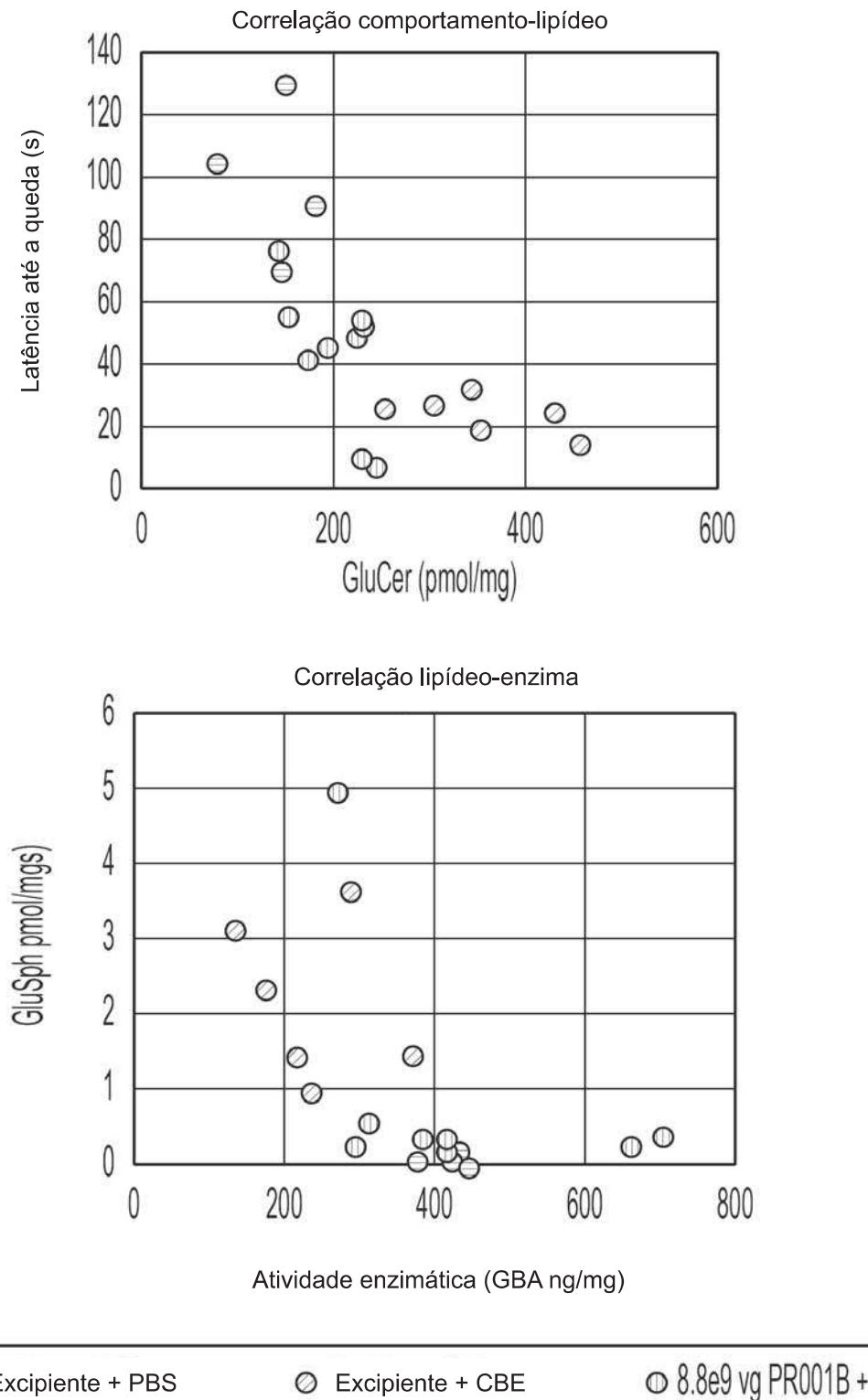


FIG. 13

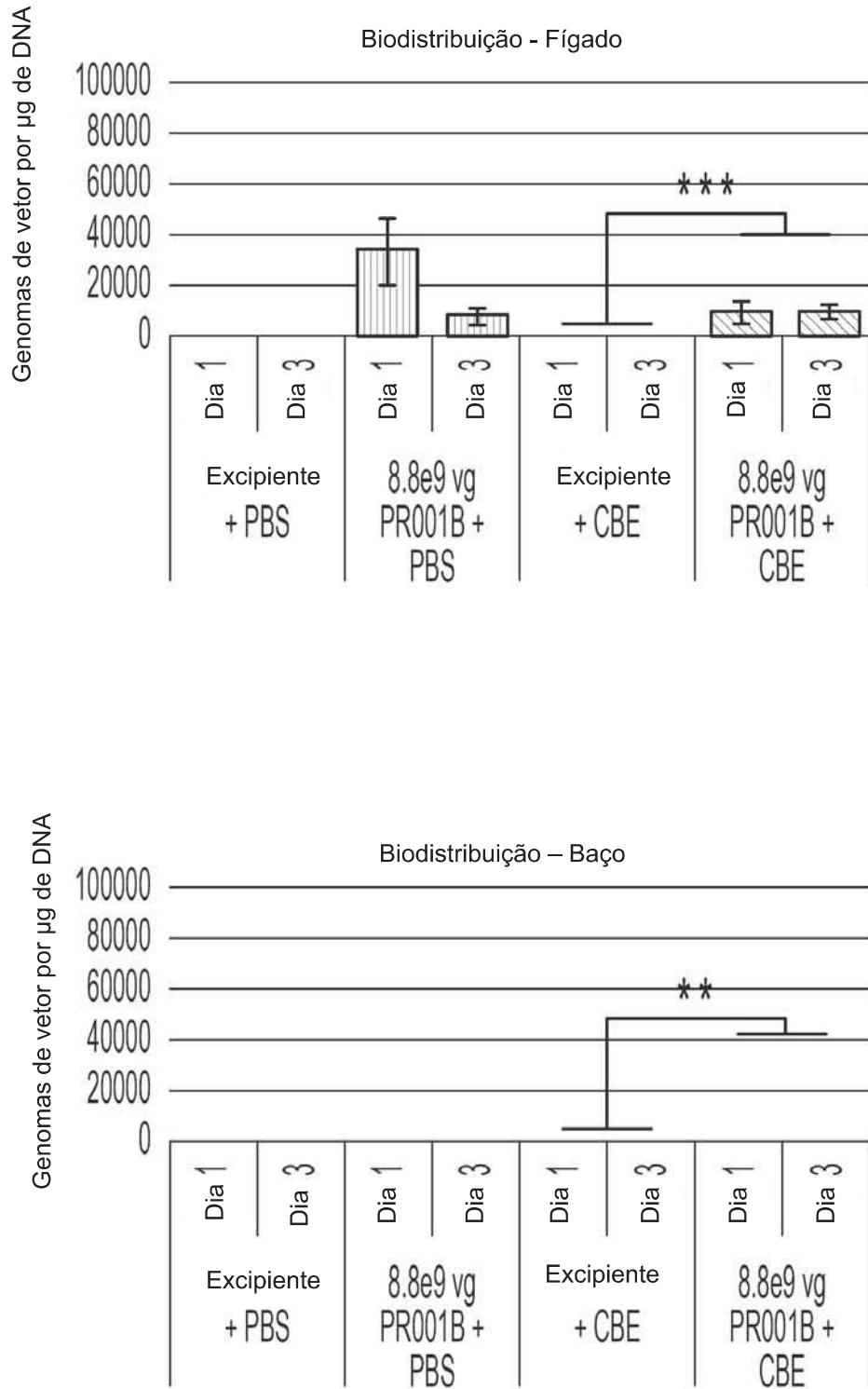


FIG. 14

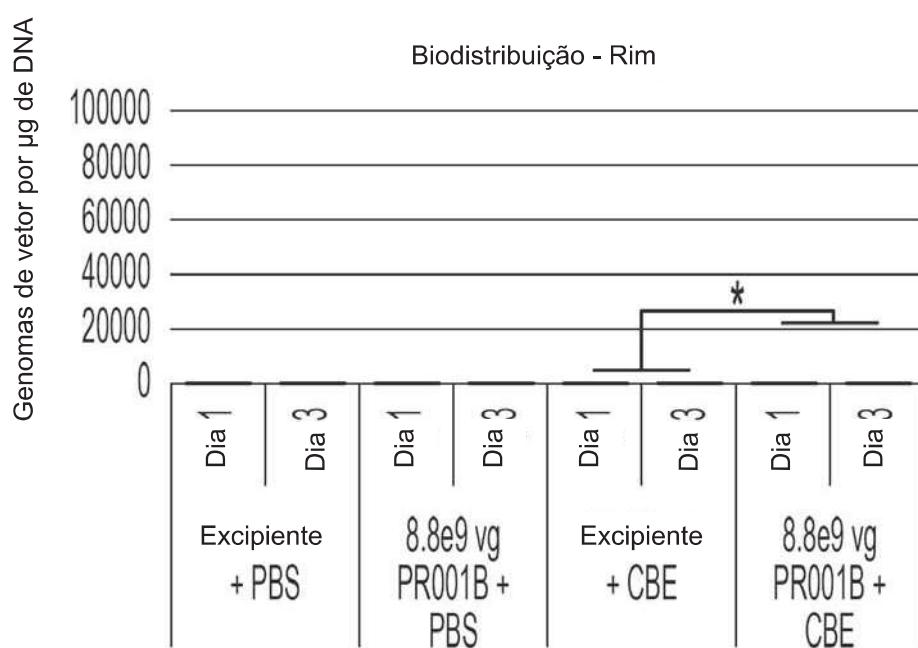
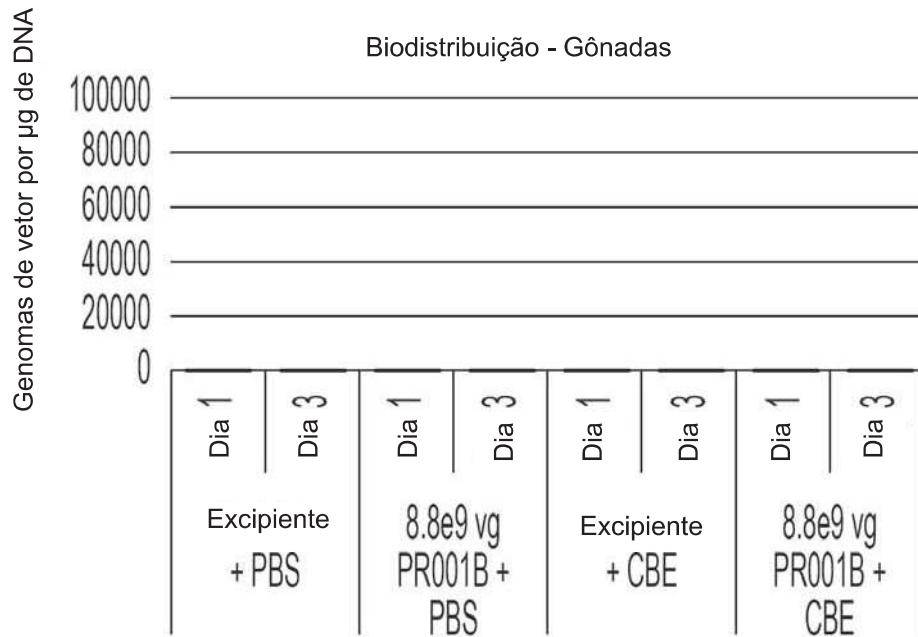


FIG. 14
CONTINUAÇÃO

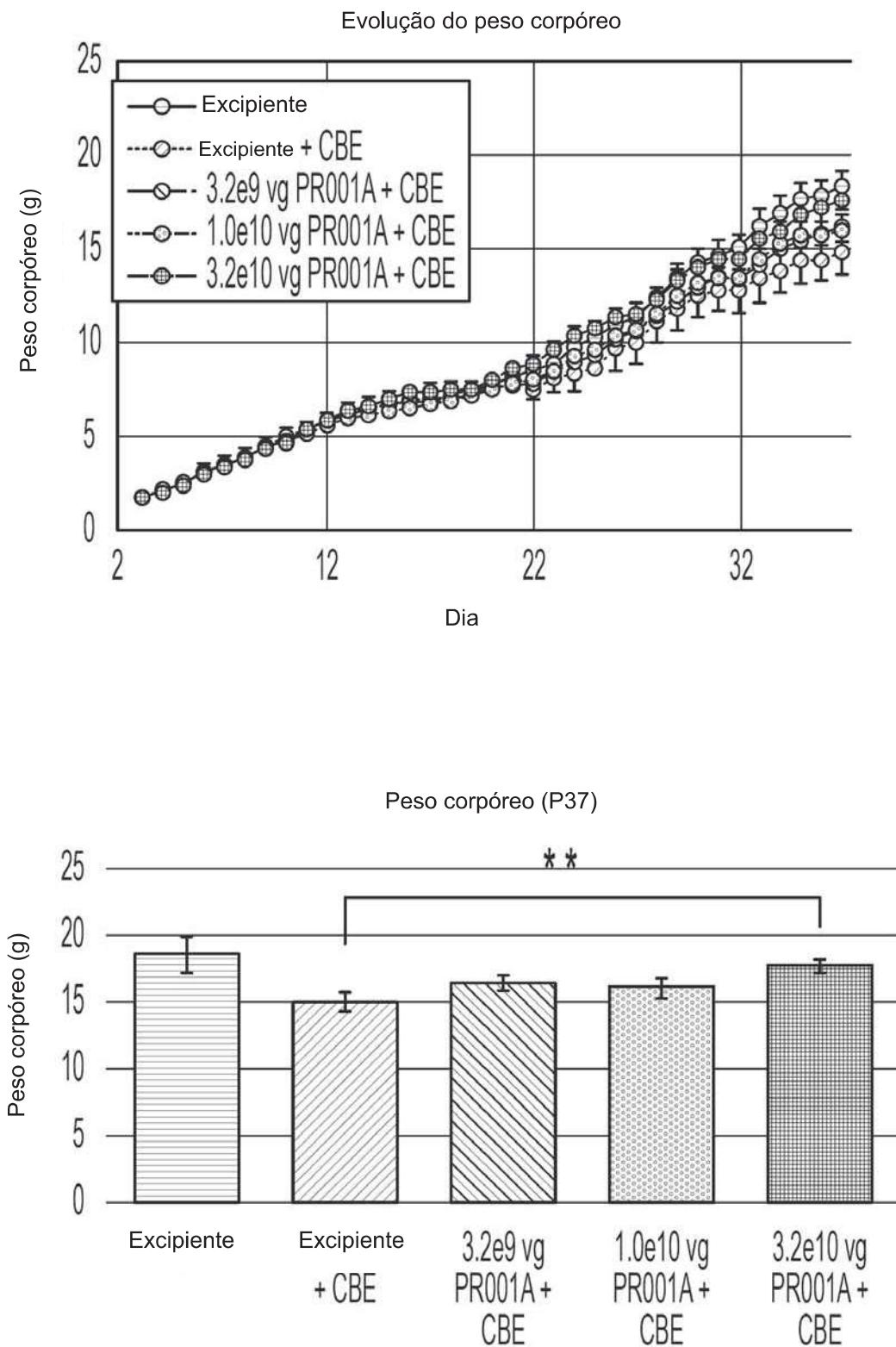


FIG. 15

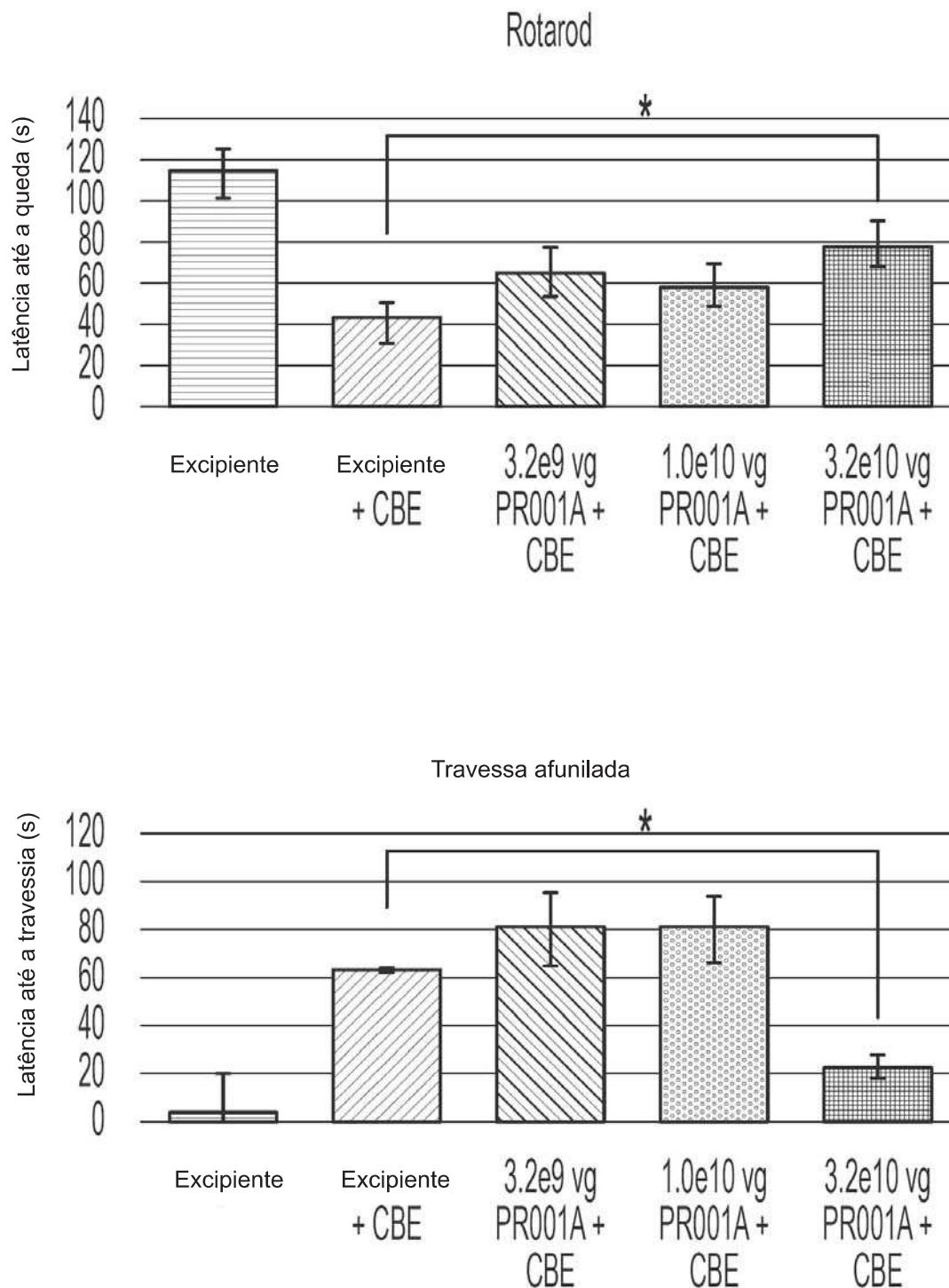


FIG. 15
CONTINUAÇÃO

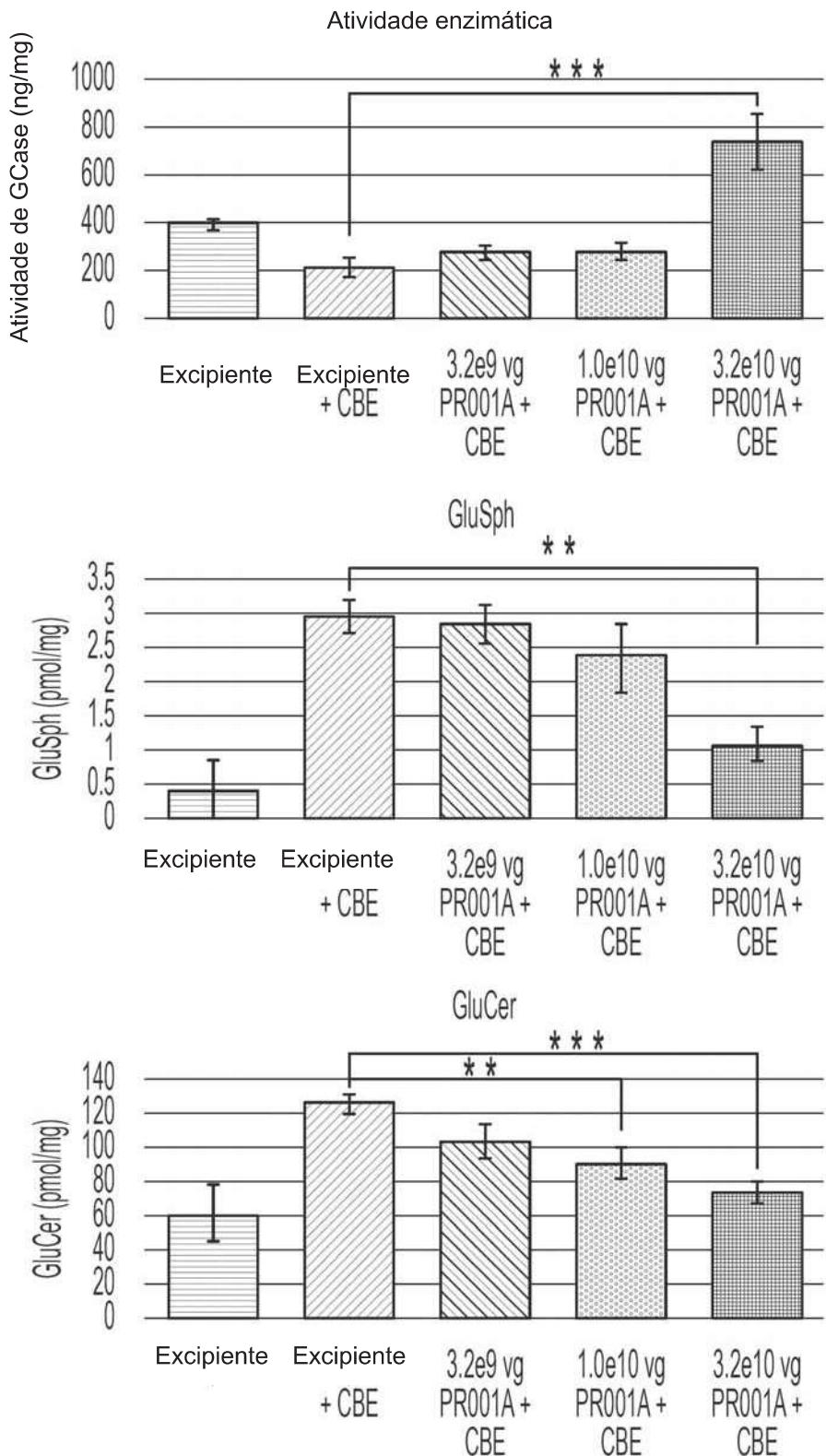


FIG. 16

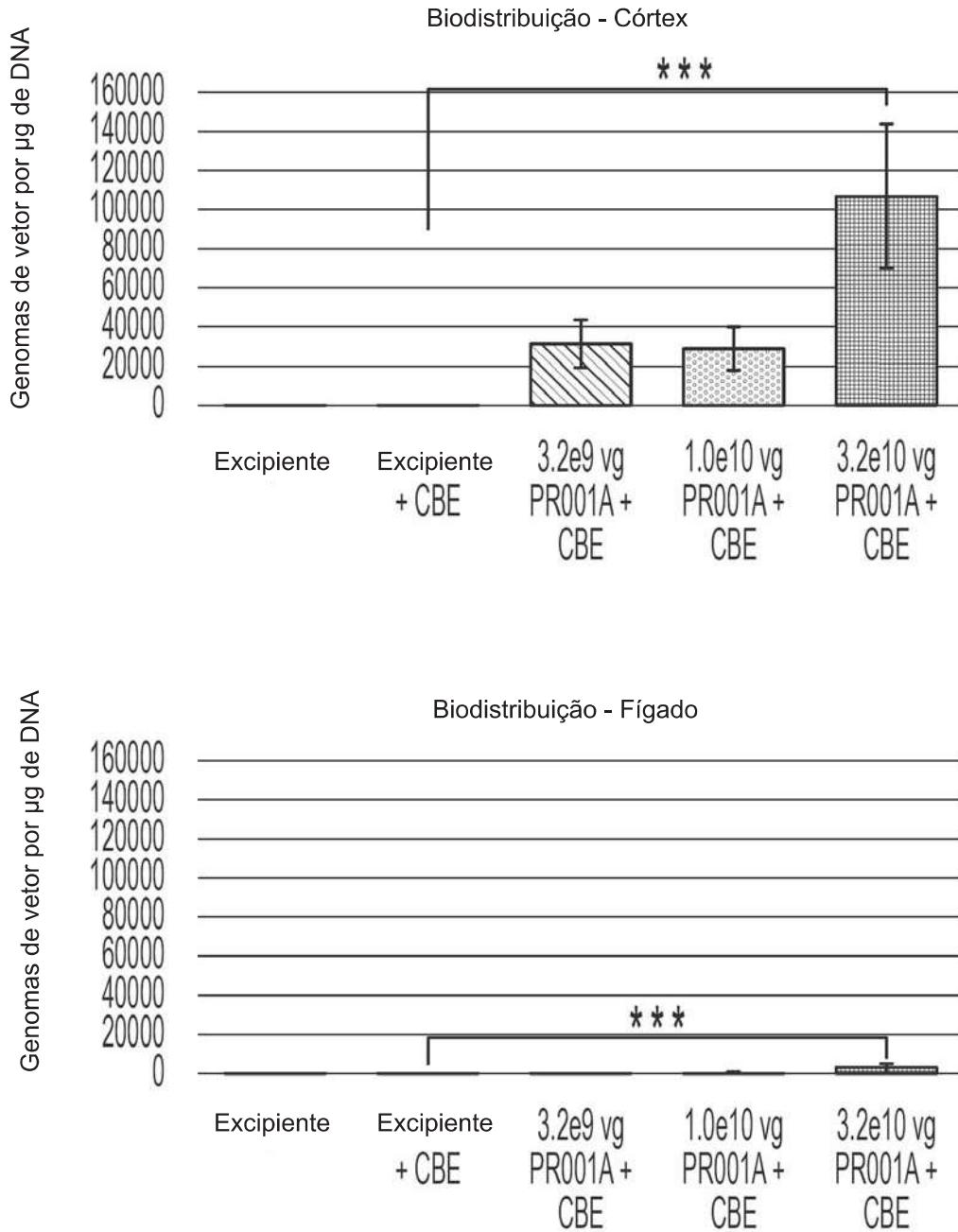
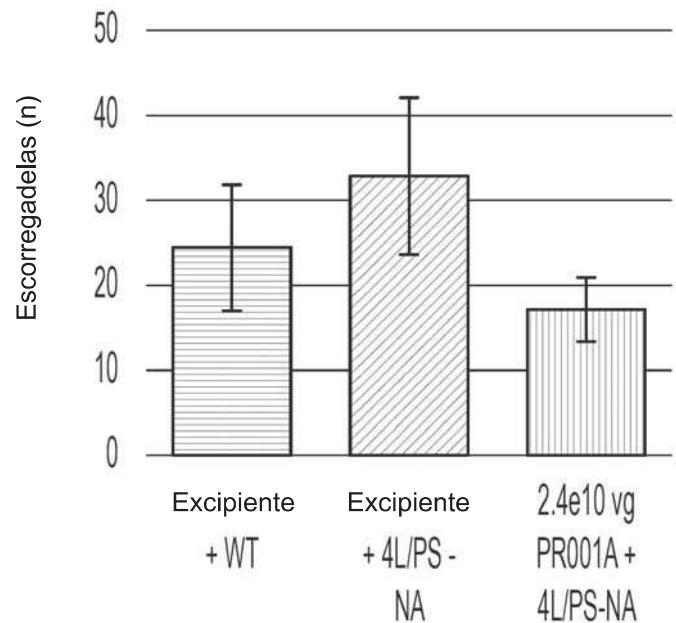


FIG. 16

CONTINUAÇÃO

Caminhar na travessa = Total de escorregadelas



Caminhar na Travessa = Tempo ativo

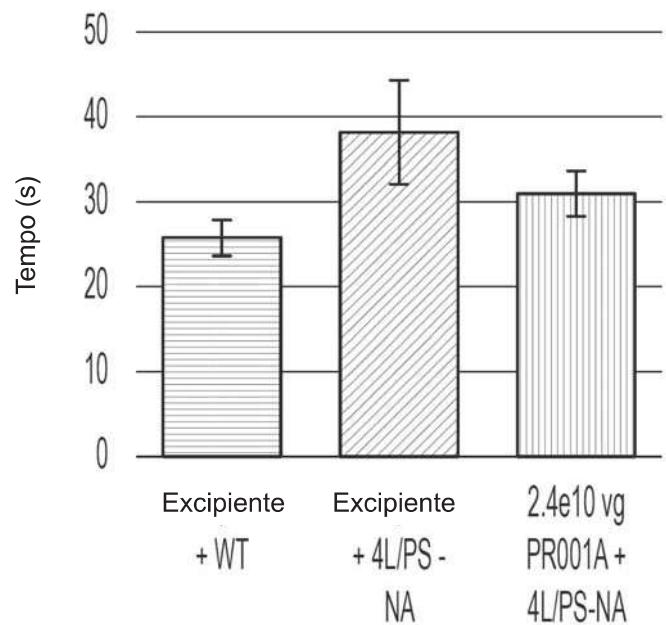


FIG. 17

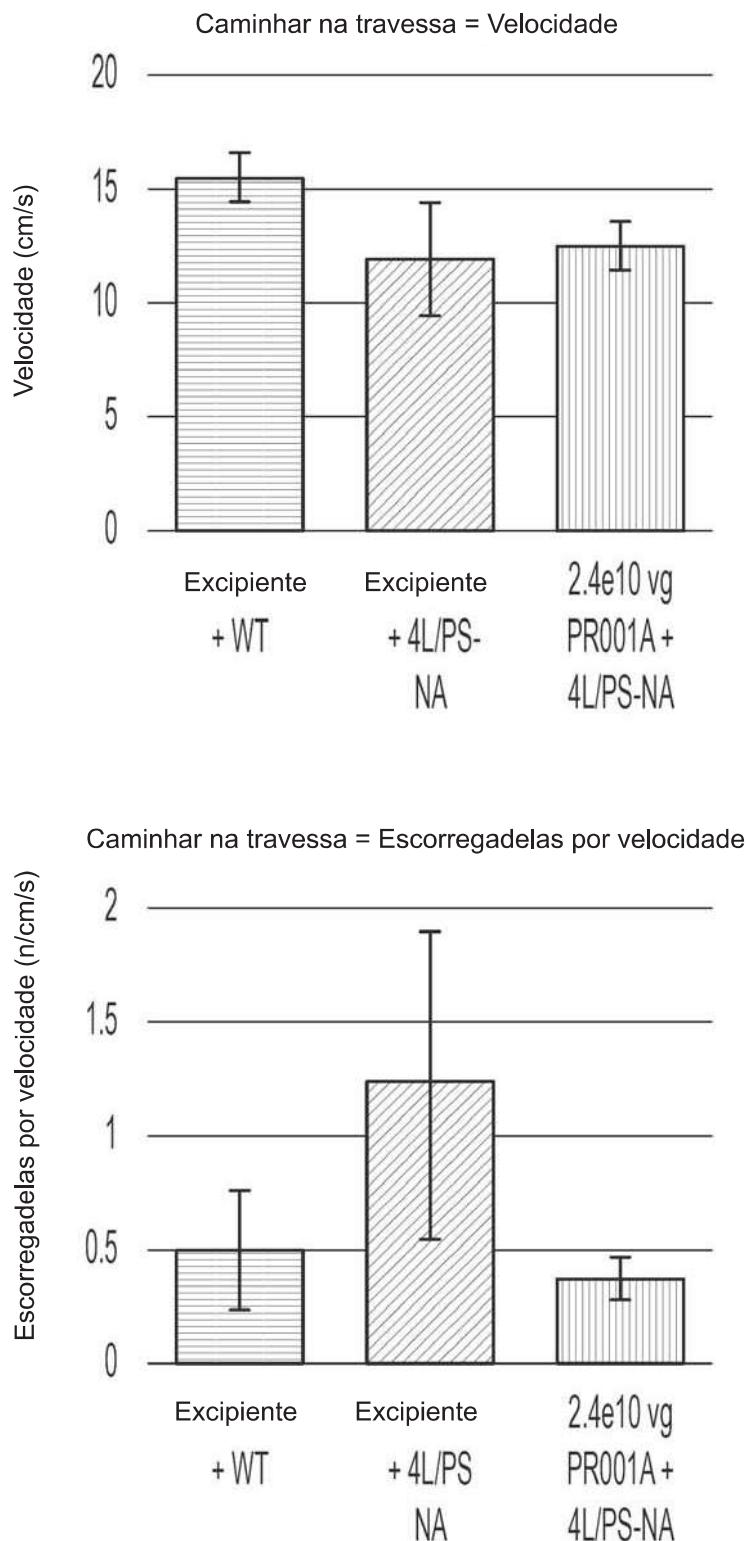


FIG. 17

CONTINUAÇÃO

24/48

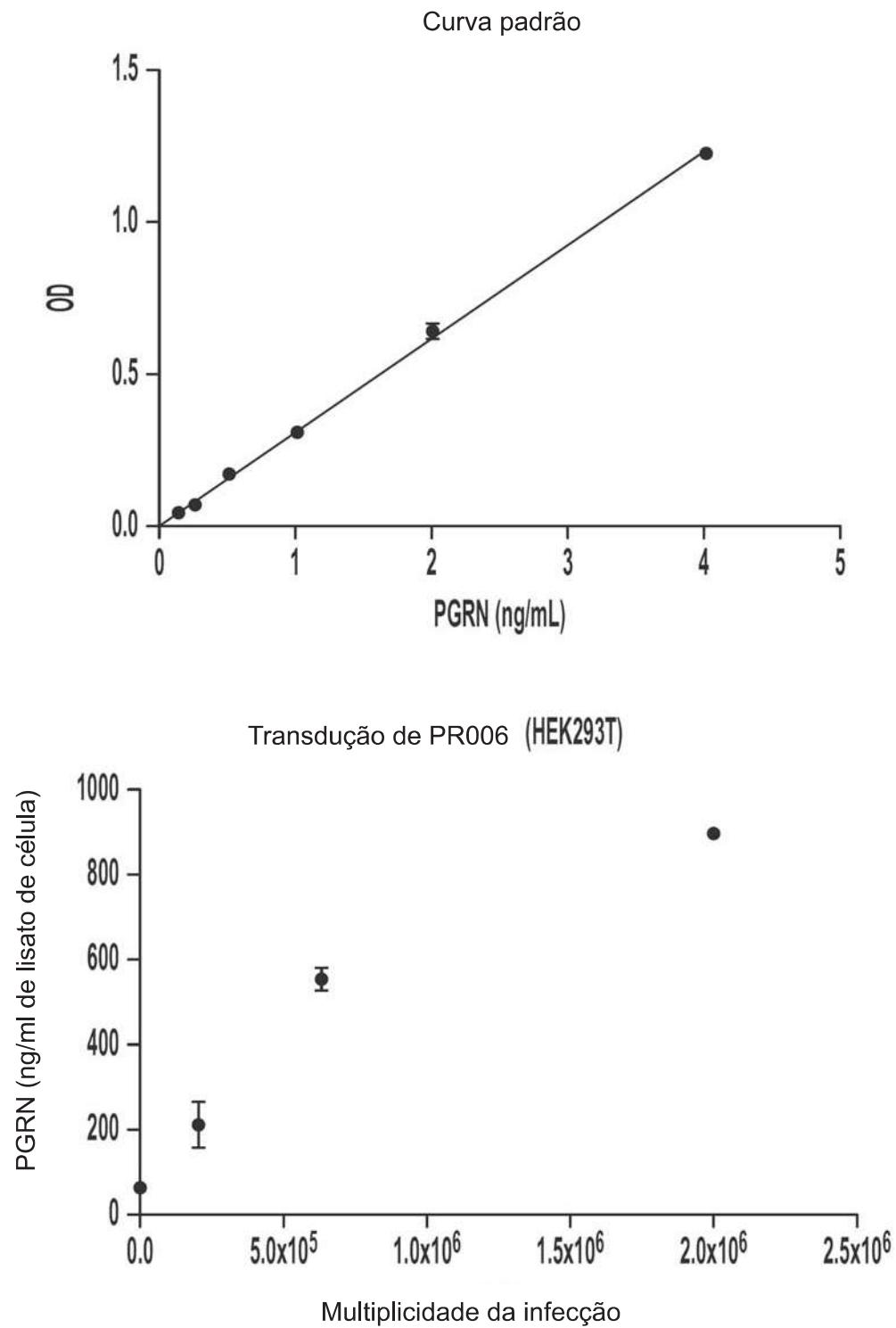


FIG. 18

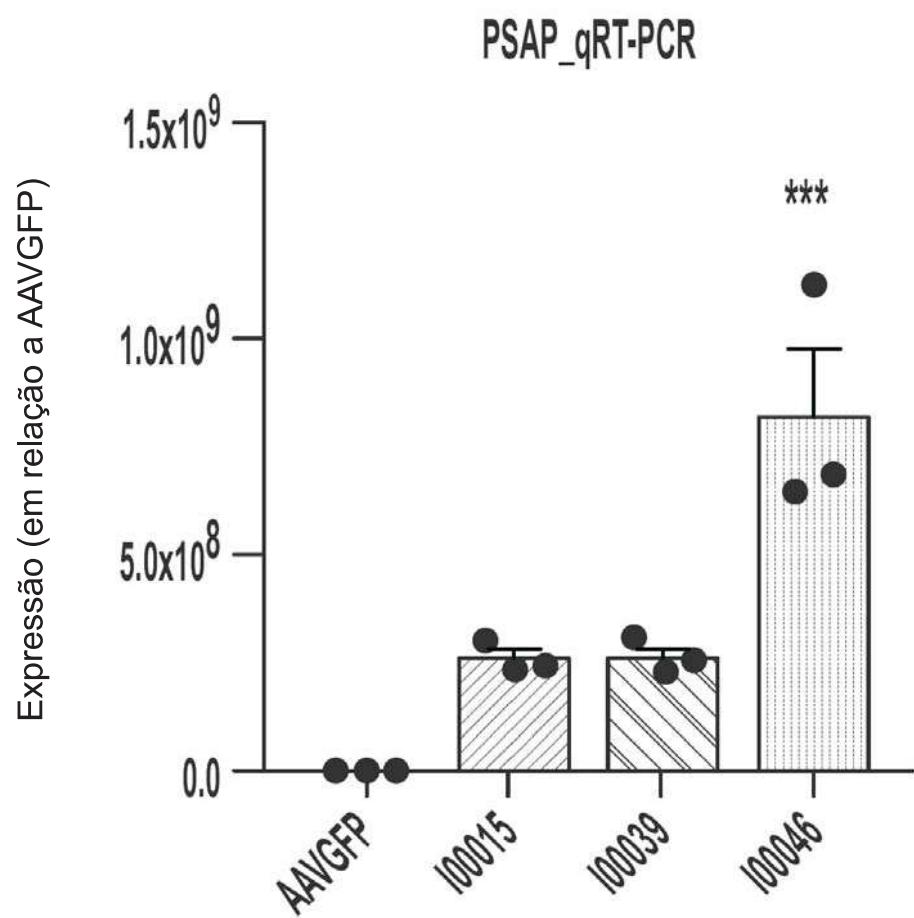
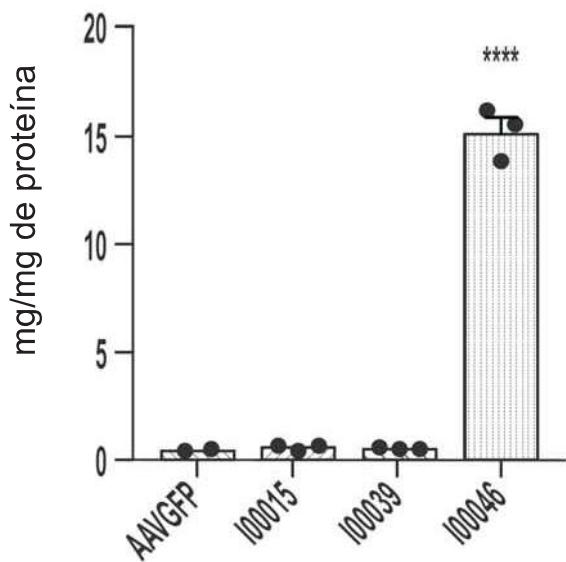


FIG. 19

26/48

PSAP_Elisa



Superexpressão de SCARB2

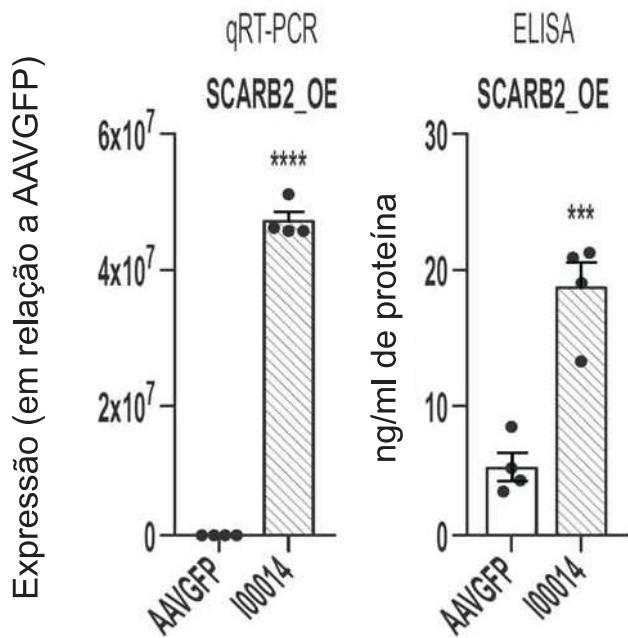


FIG. 19

CONTINUAÇÃO

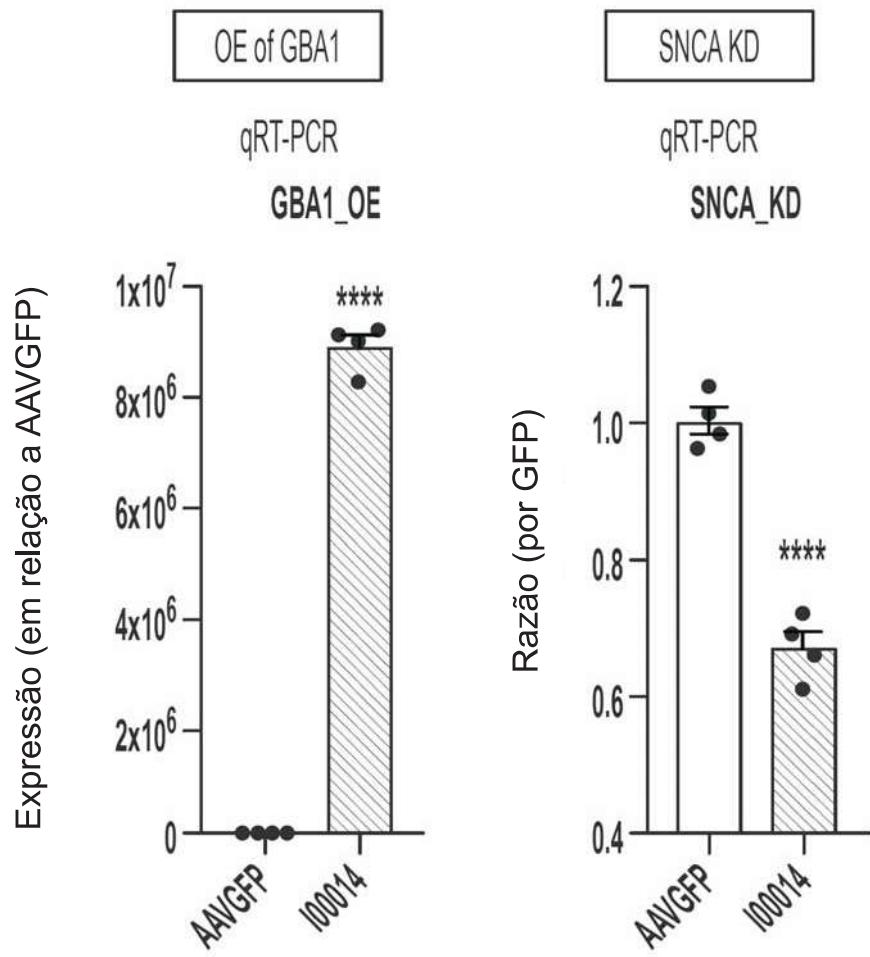


FIG. 19
CONTINUAÇÃO

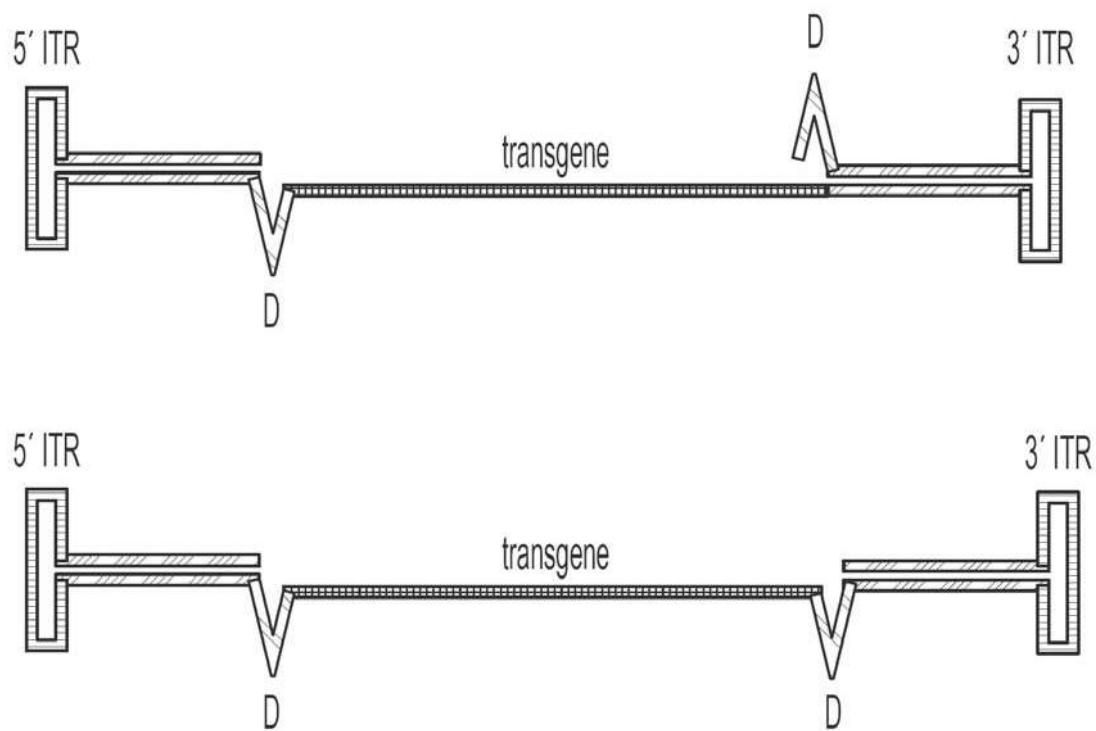


FIG. 20

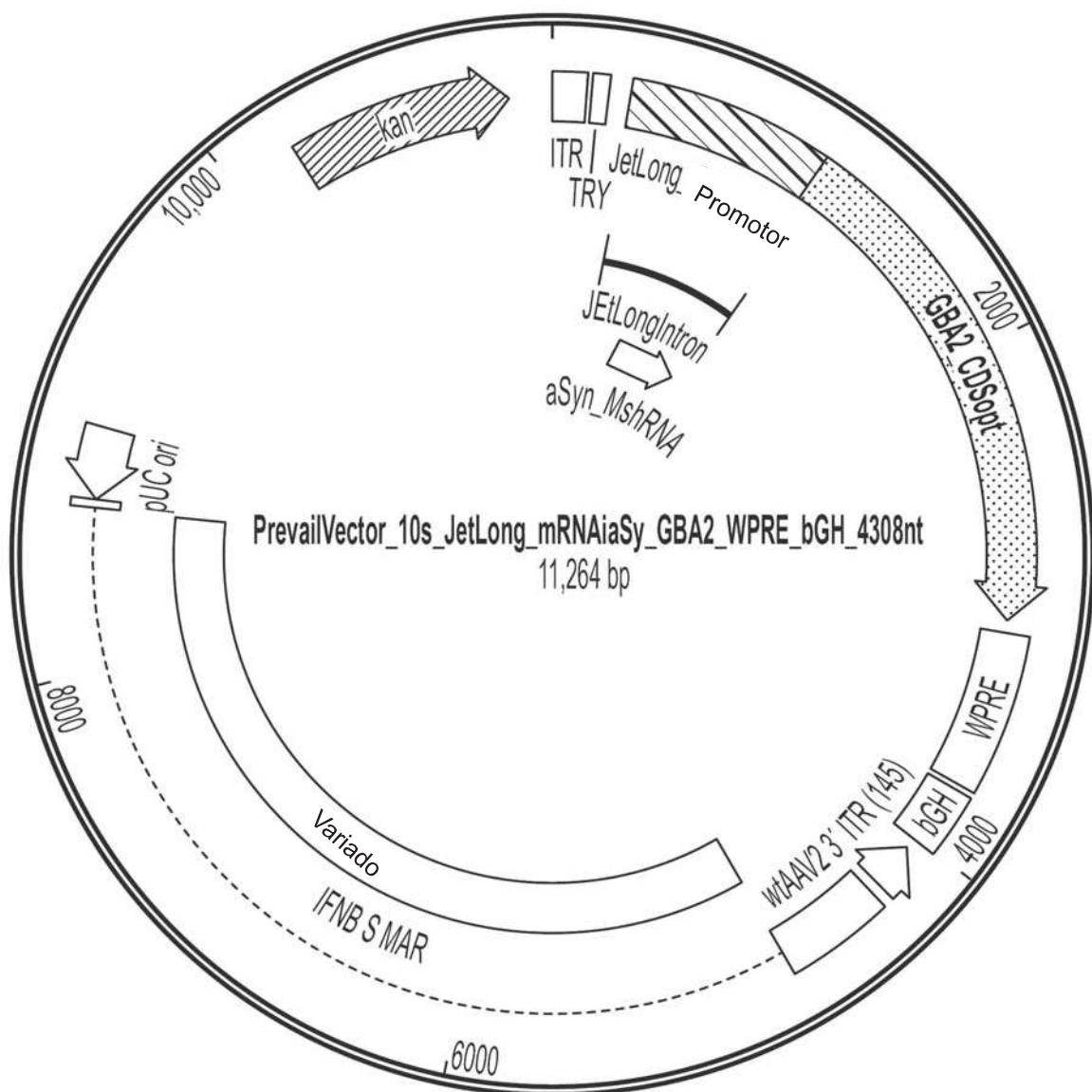


FIG. 21

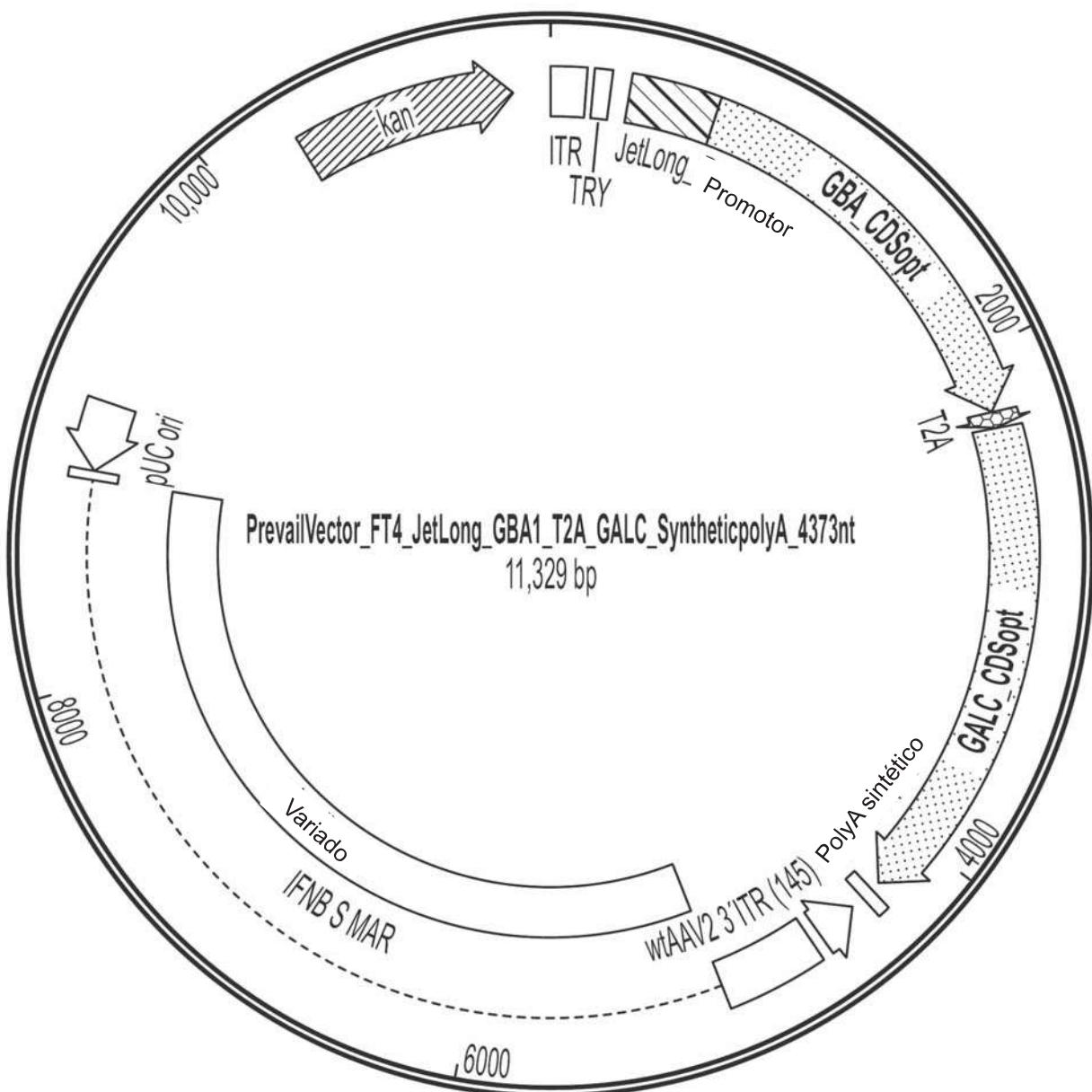


FIG. 22

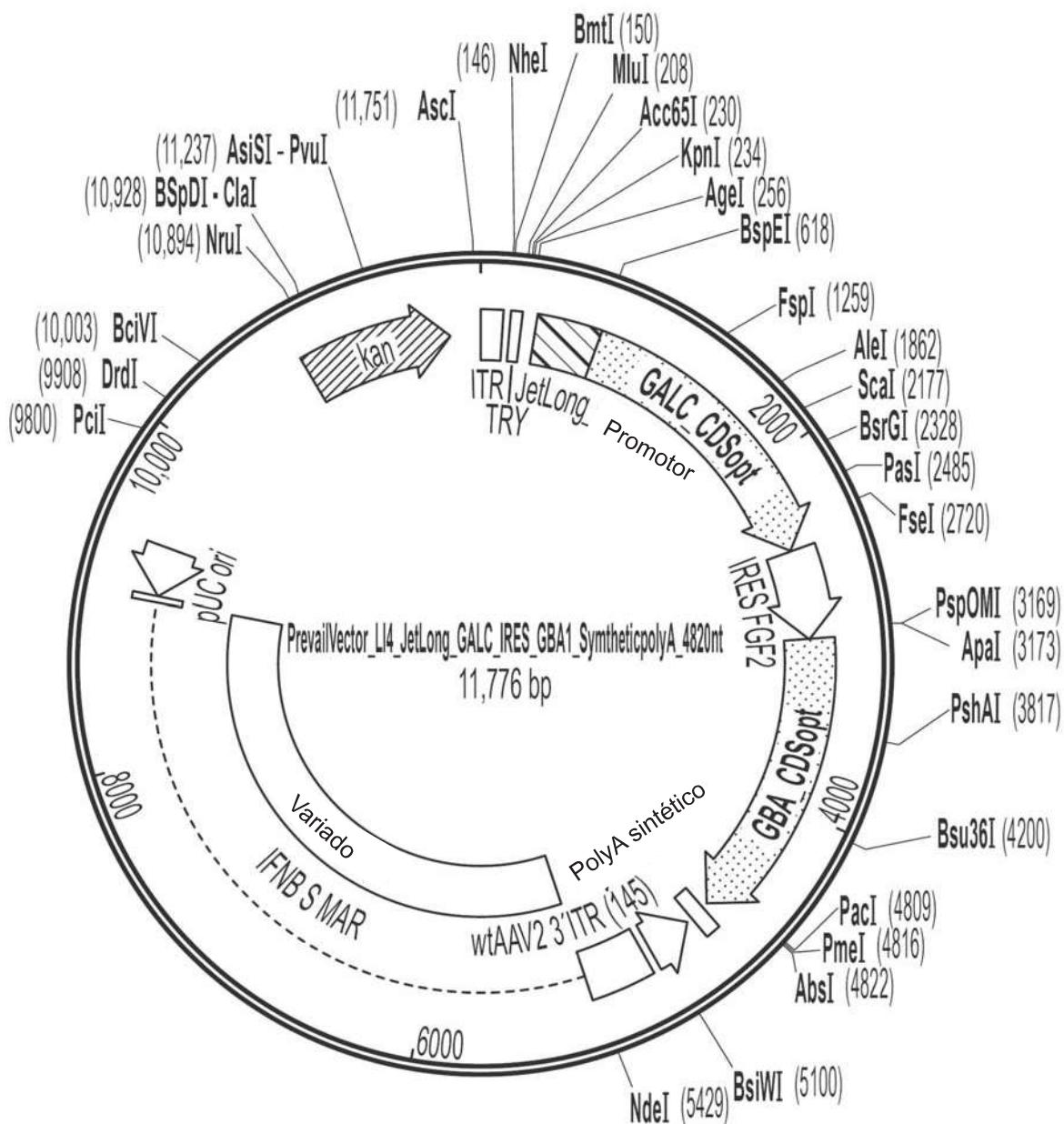


FIG. 23

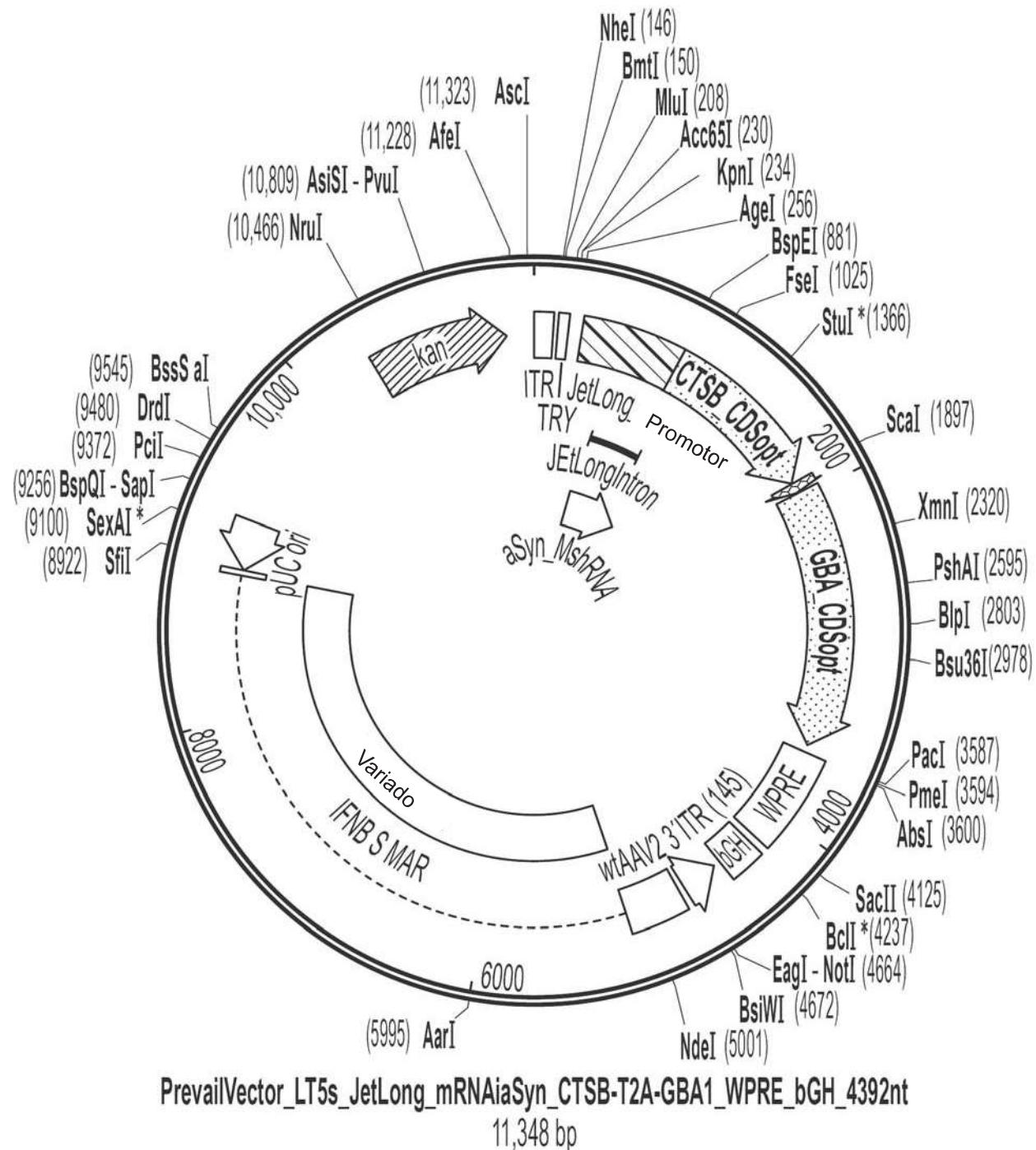


FIG. 24

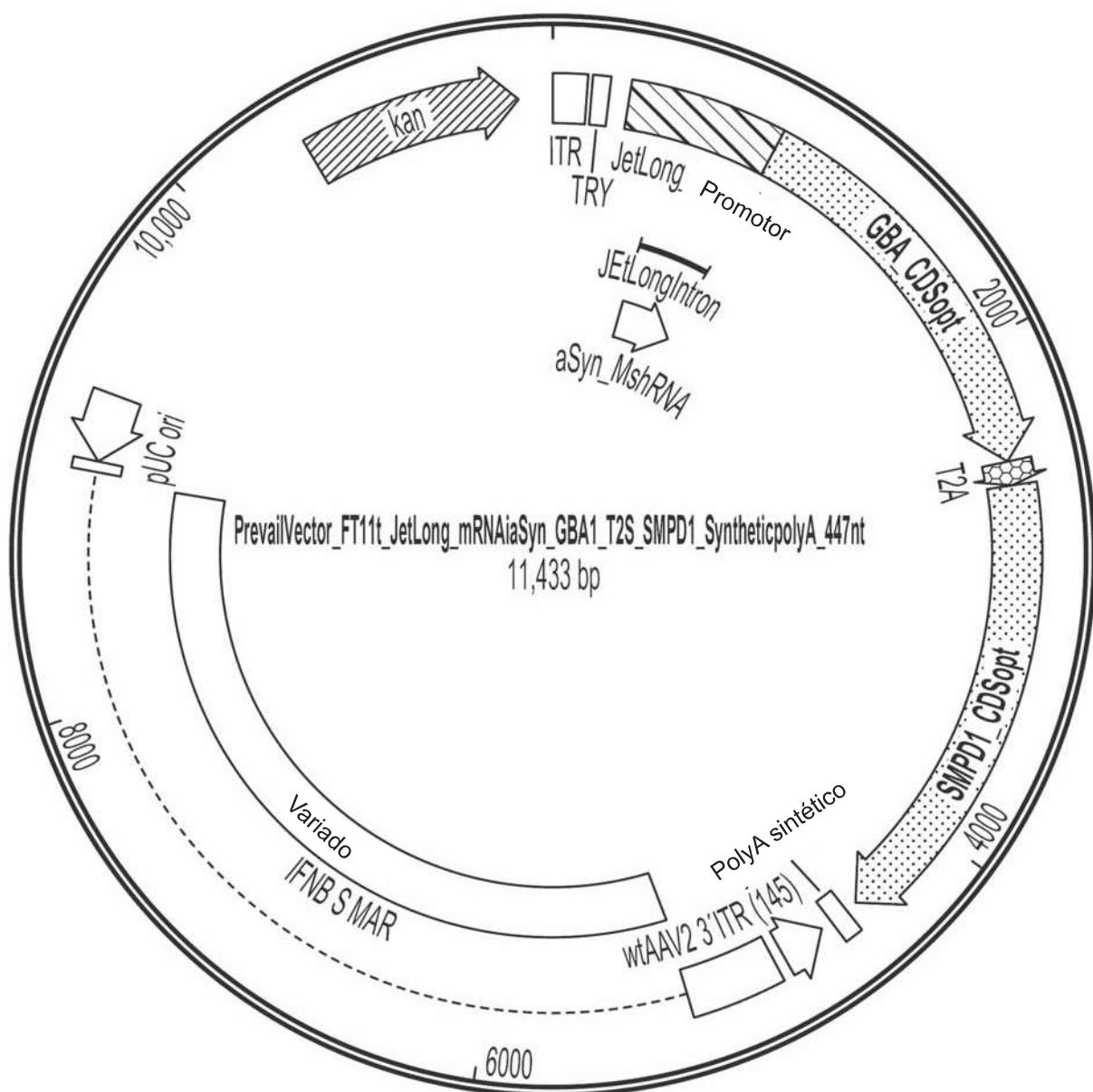


FIG. 25

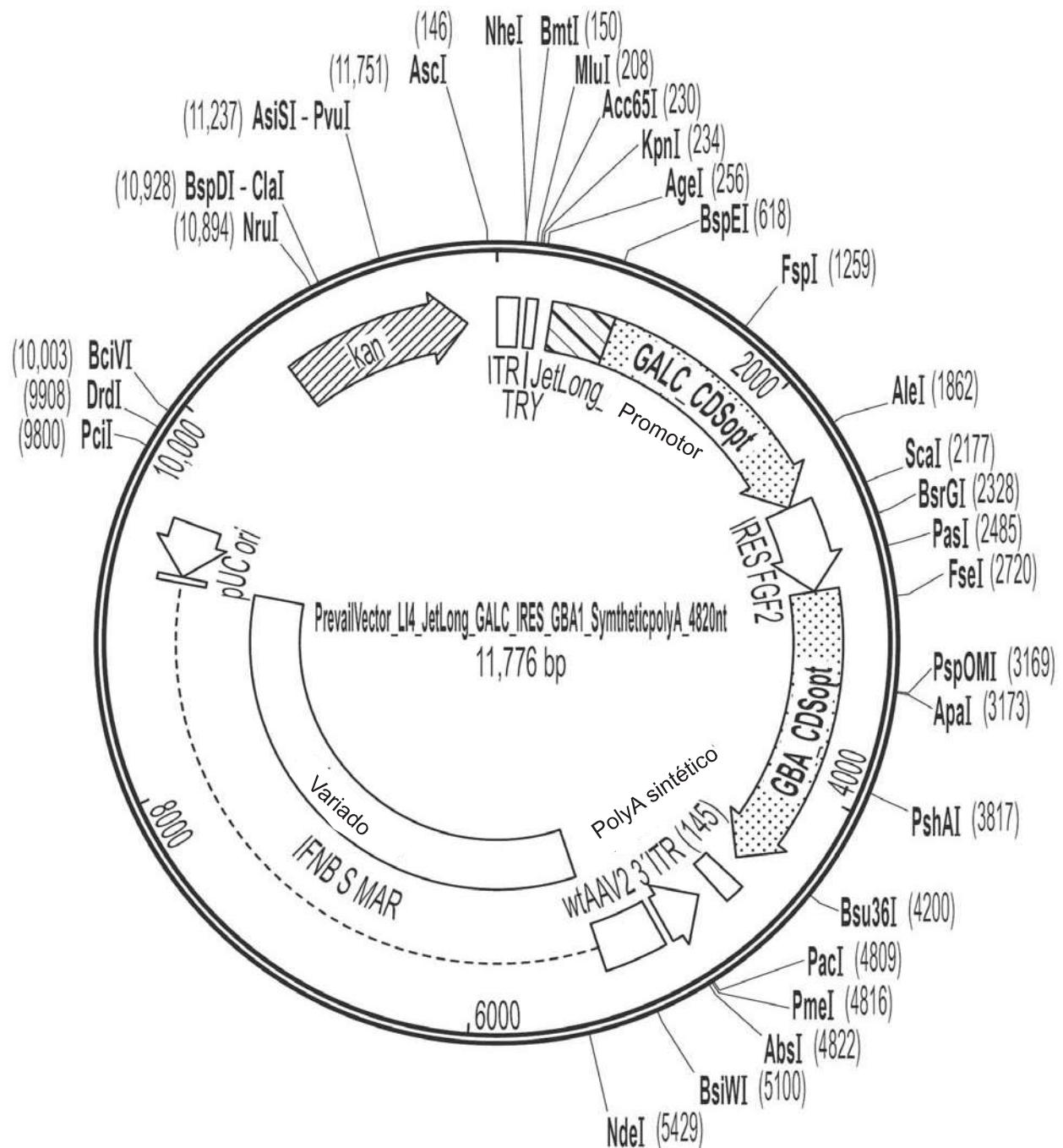


FIG. 26

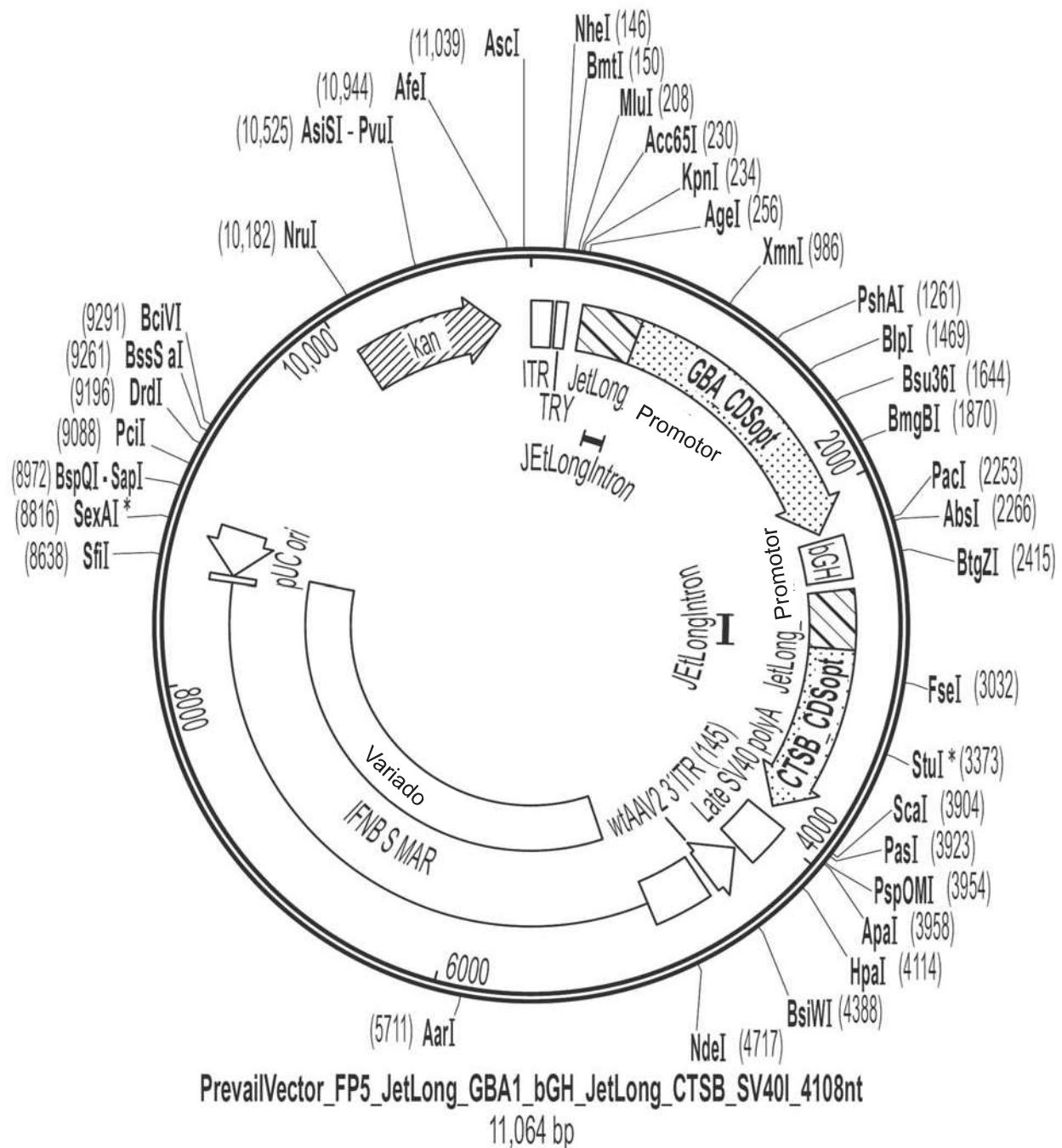


FIG. 27

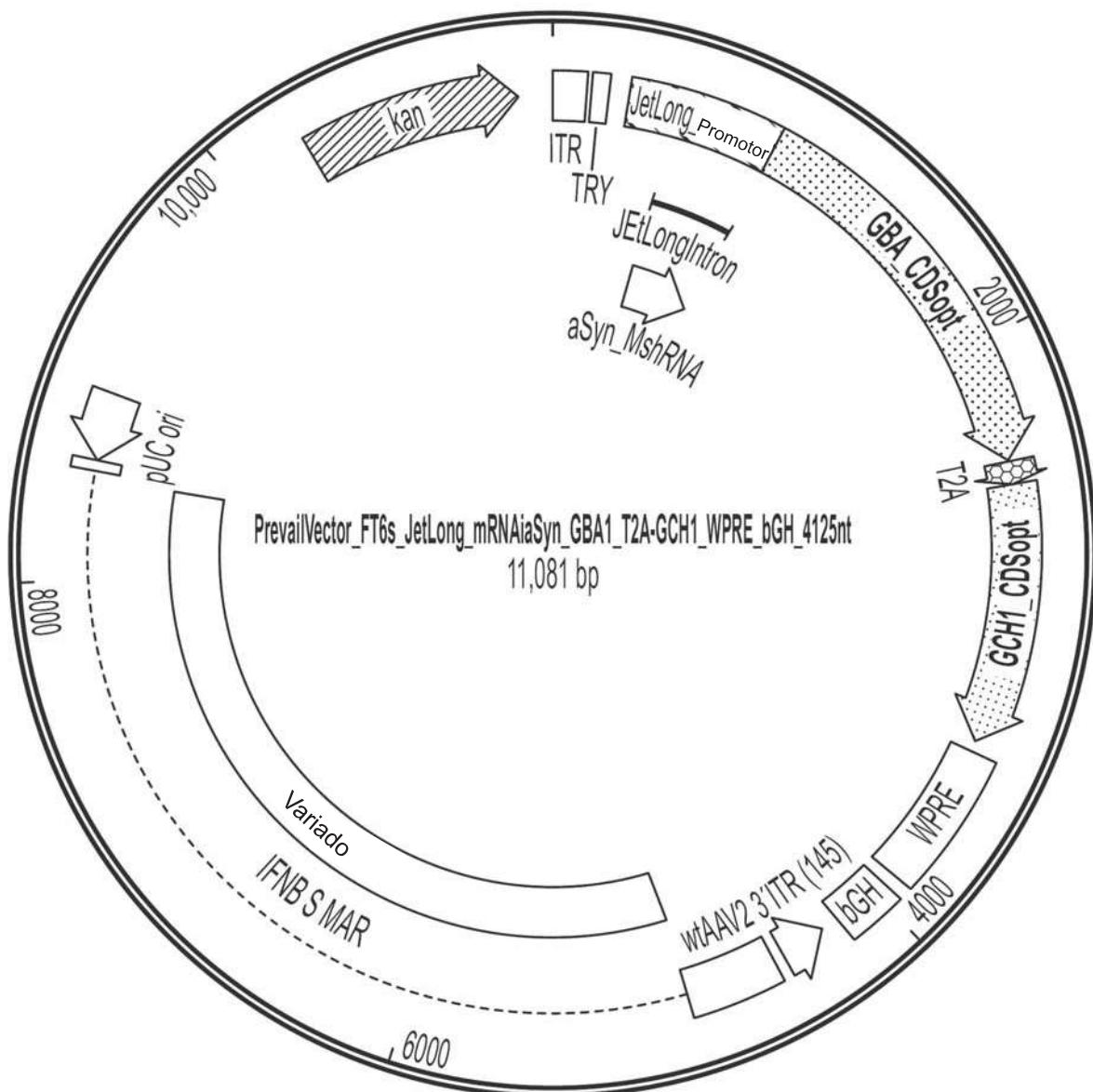


FIG. 28

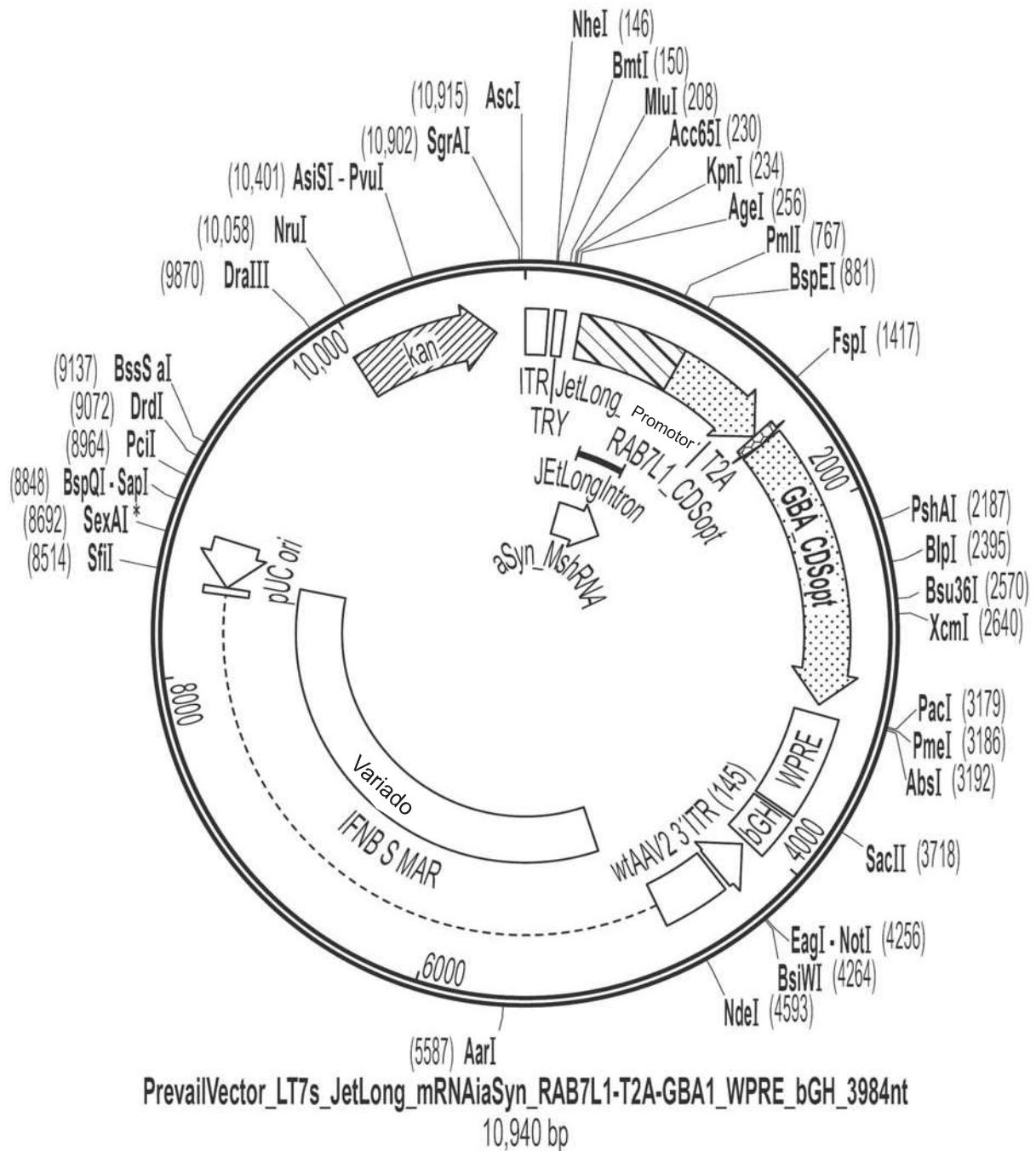


FIG. 29

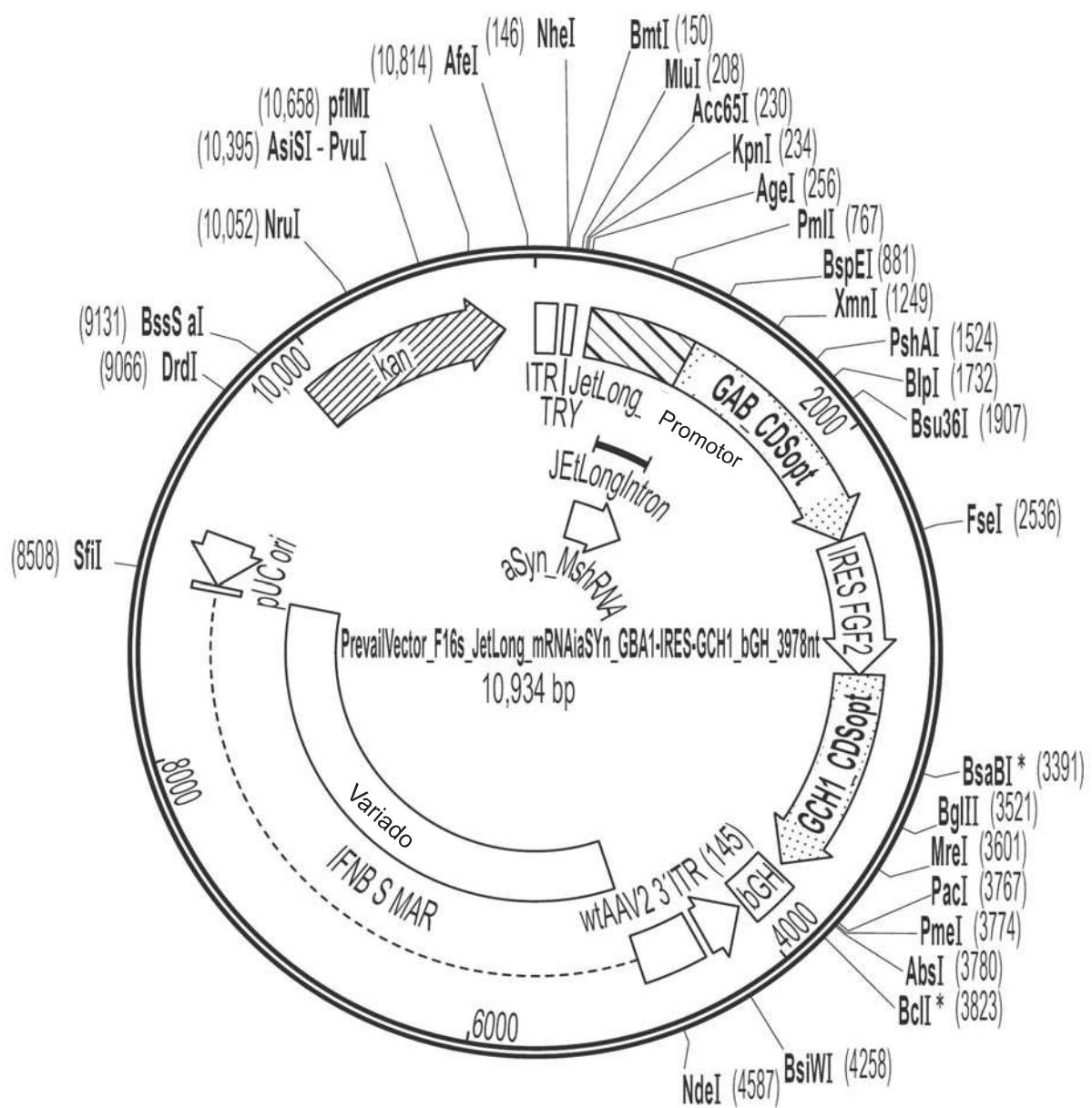


FIG. 30

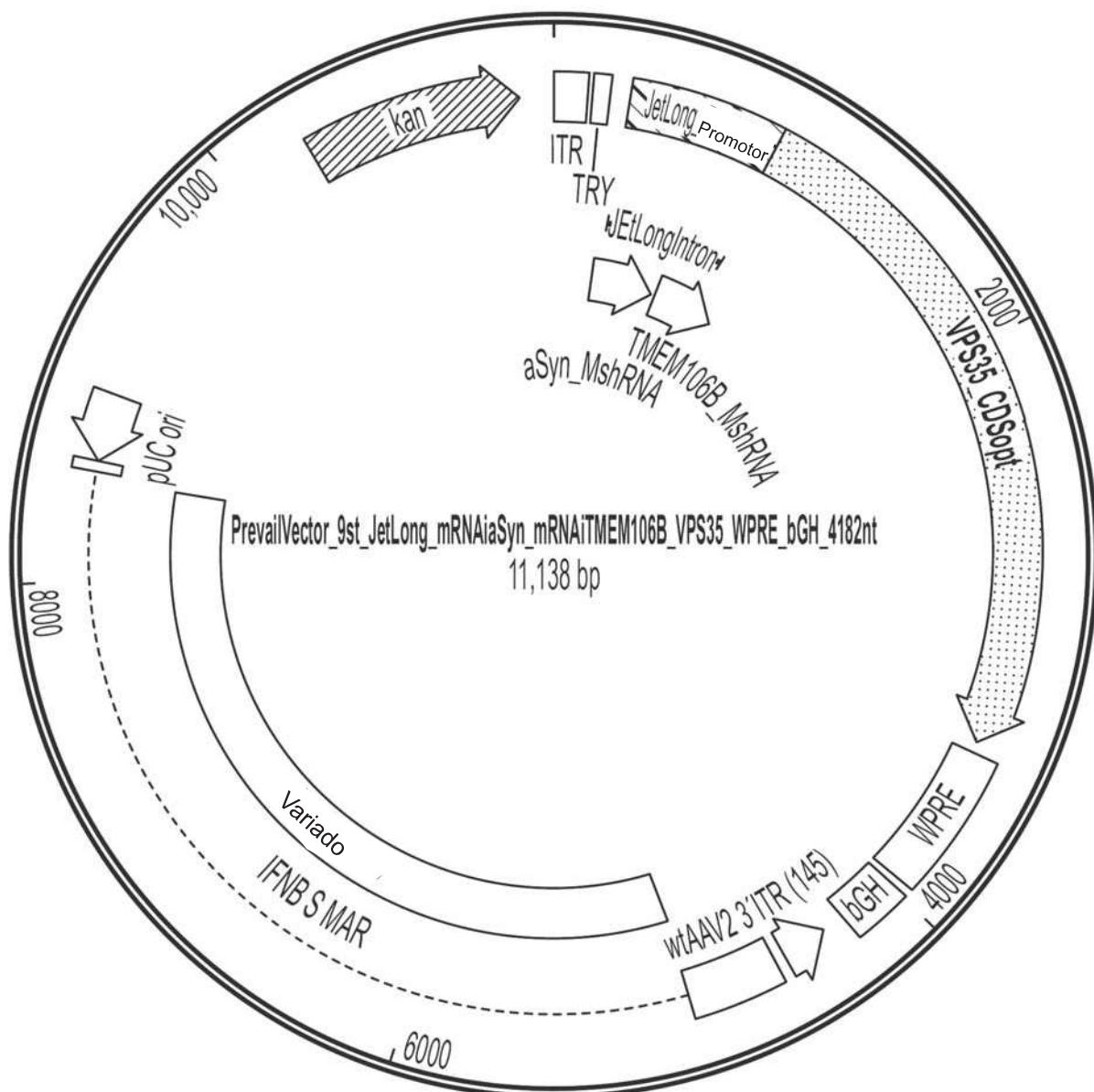


FIG. 31

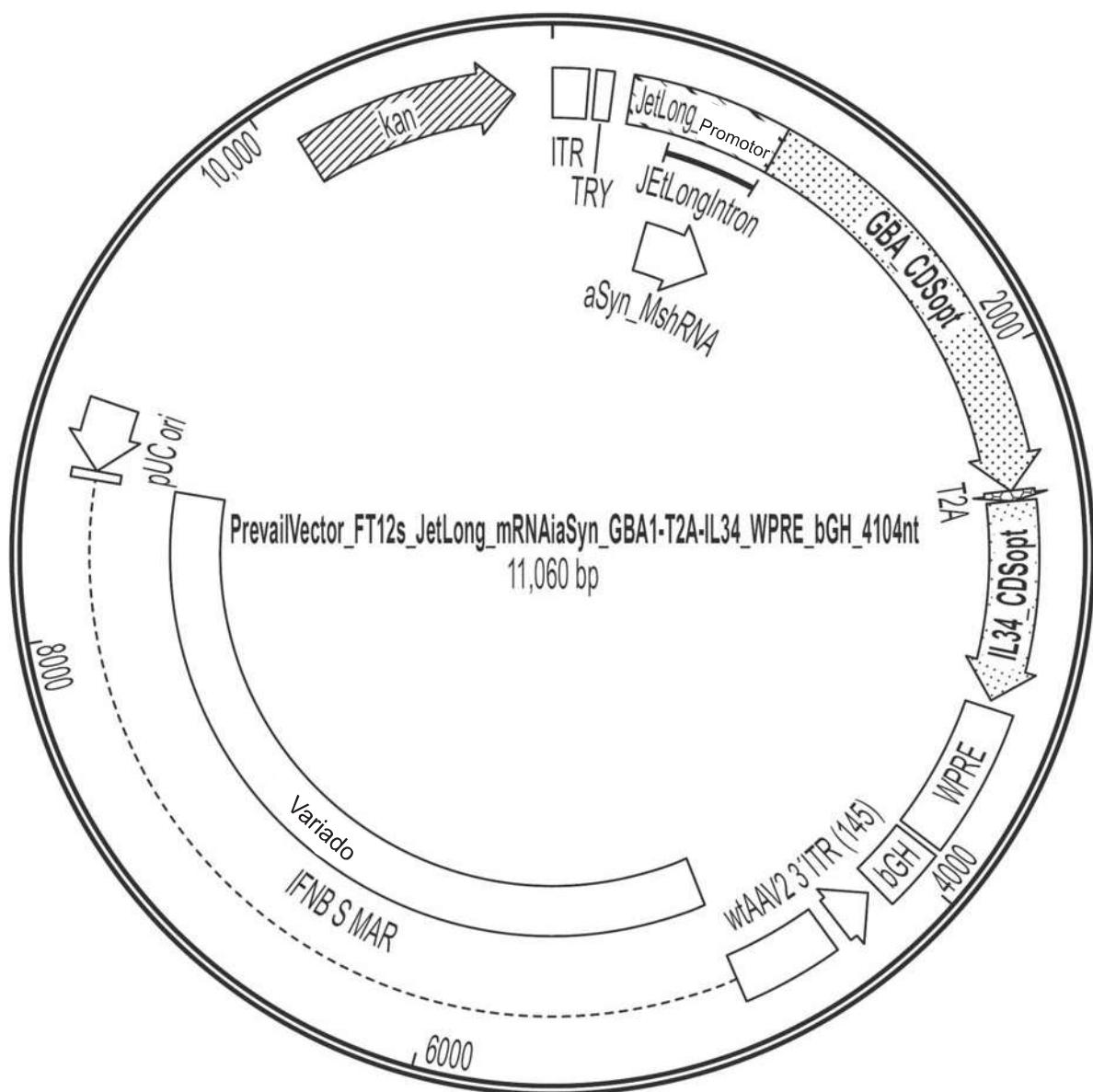
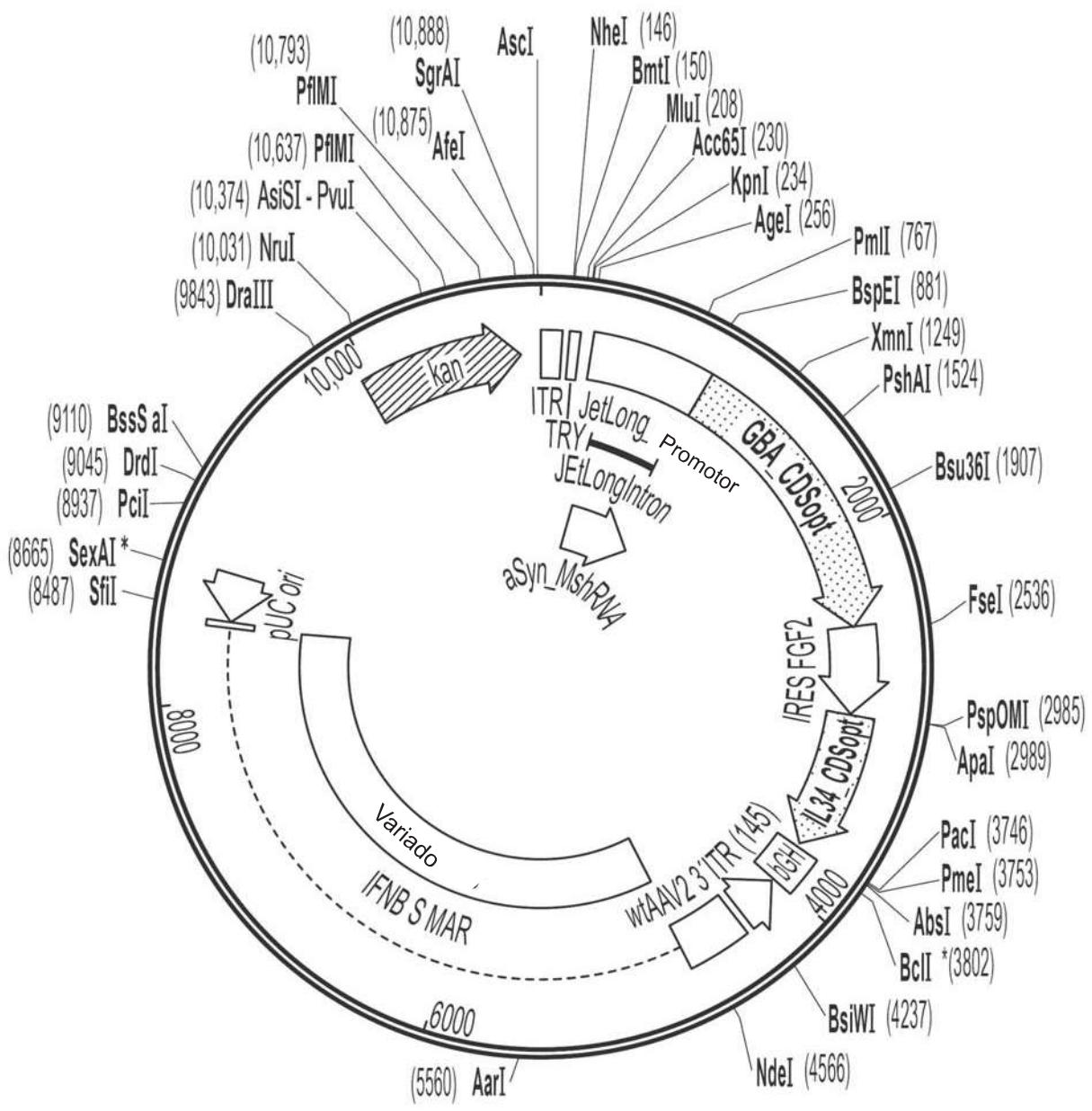


FIG. 32



PrevailVector_Fl12s_JetLong_mRNAiaSYn_GBA1-IRES-IL34_bGH_3957nt

FIG. 33

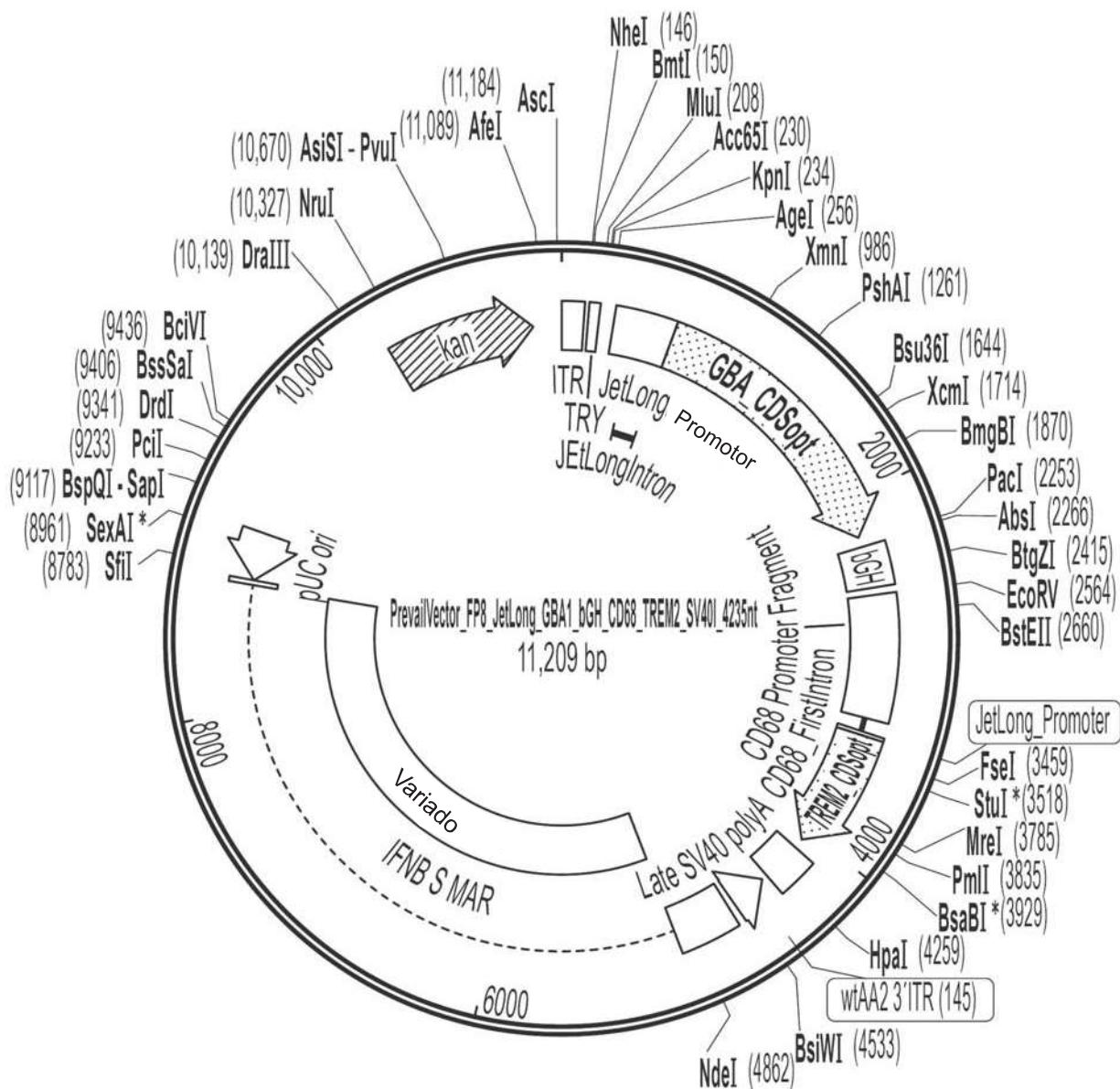


FIG. 34

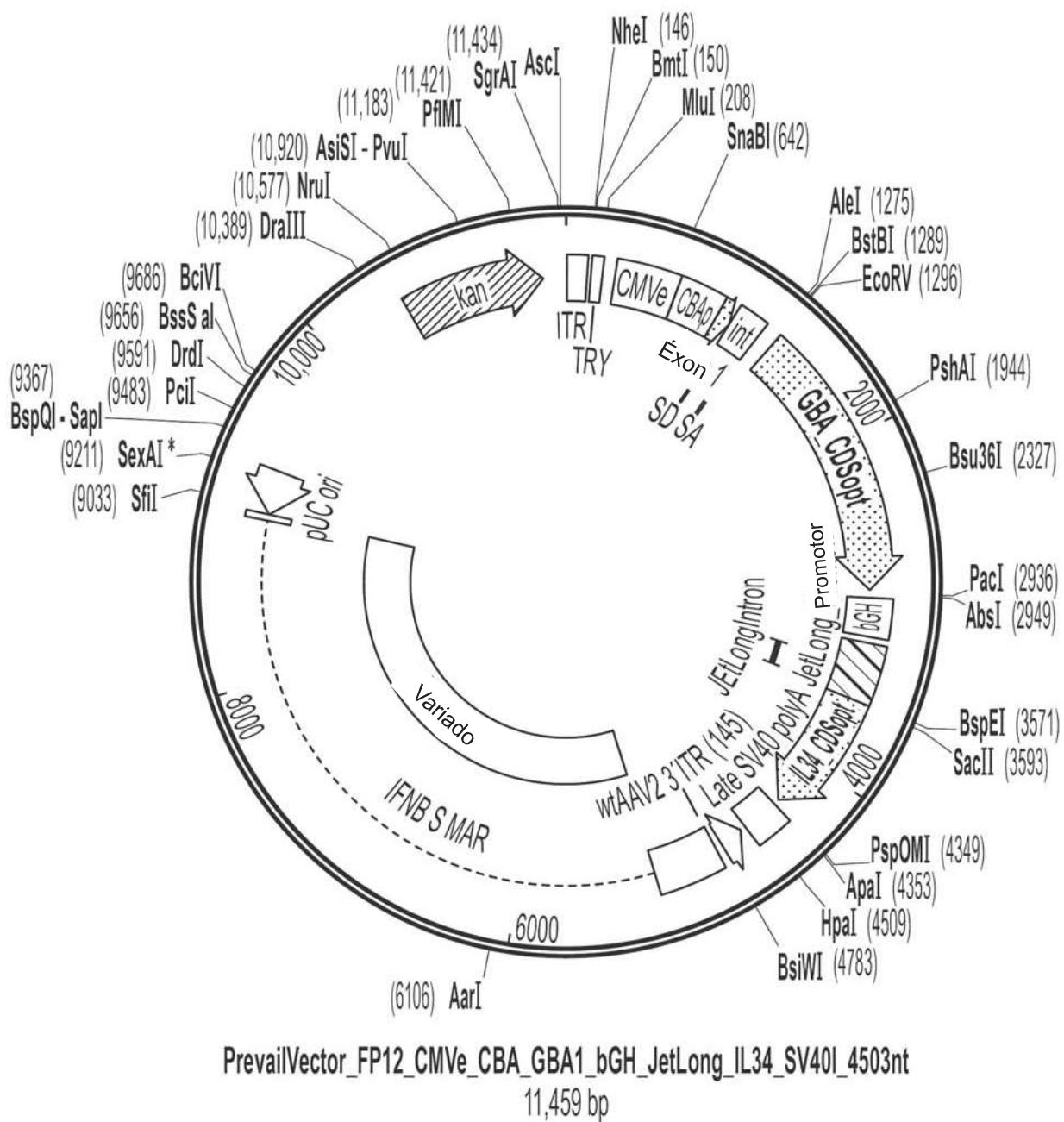


FIG. 35

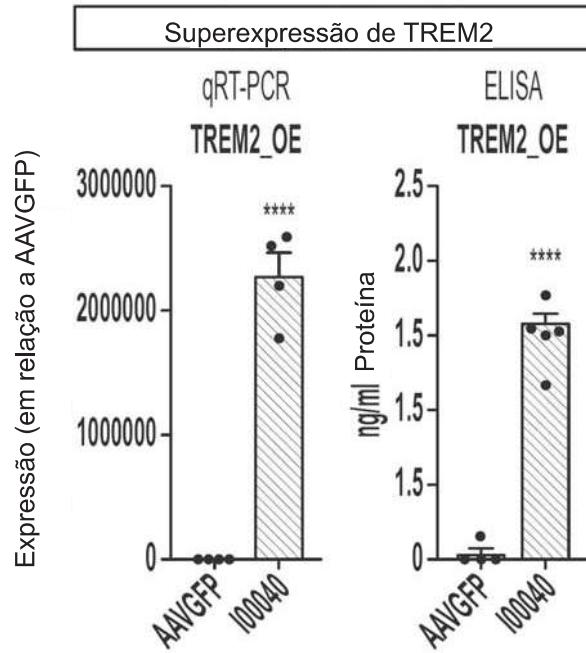


FIG. 36A

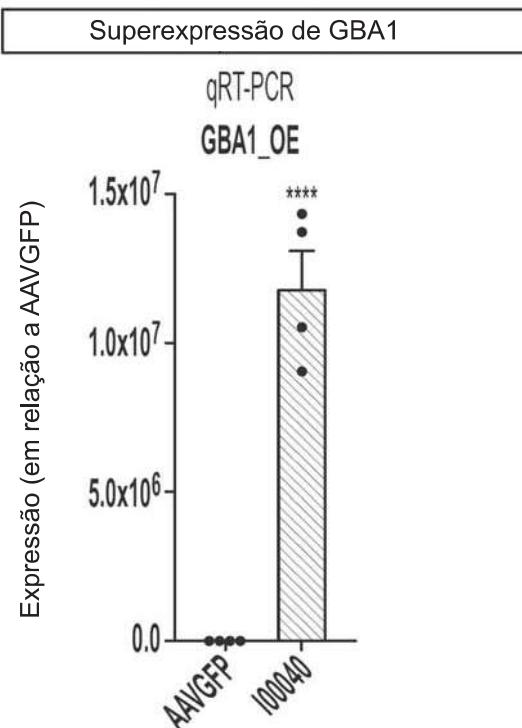


FIG. 36B

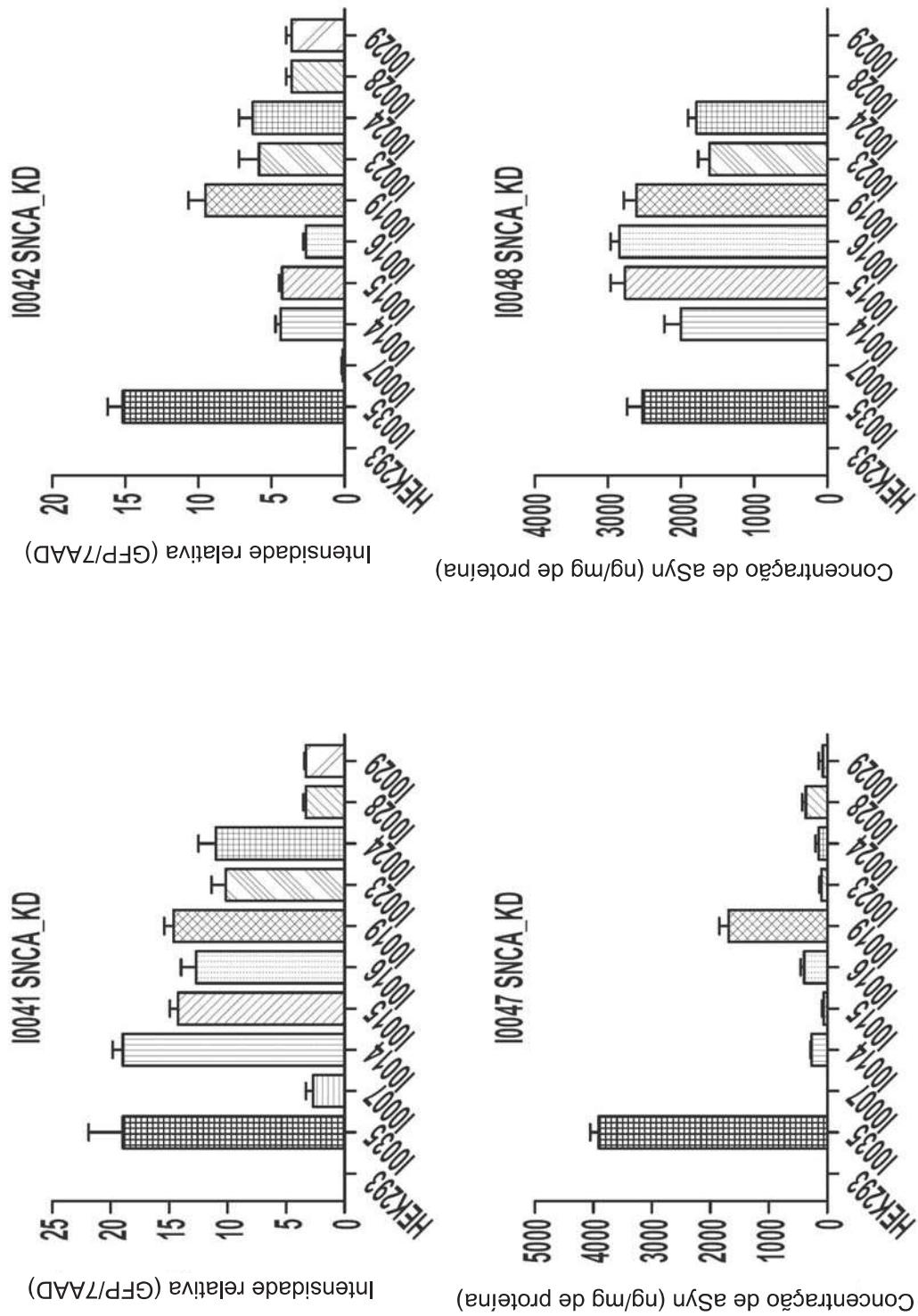
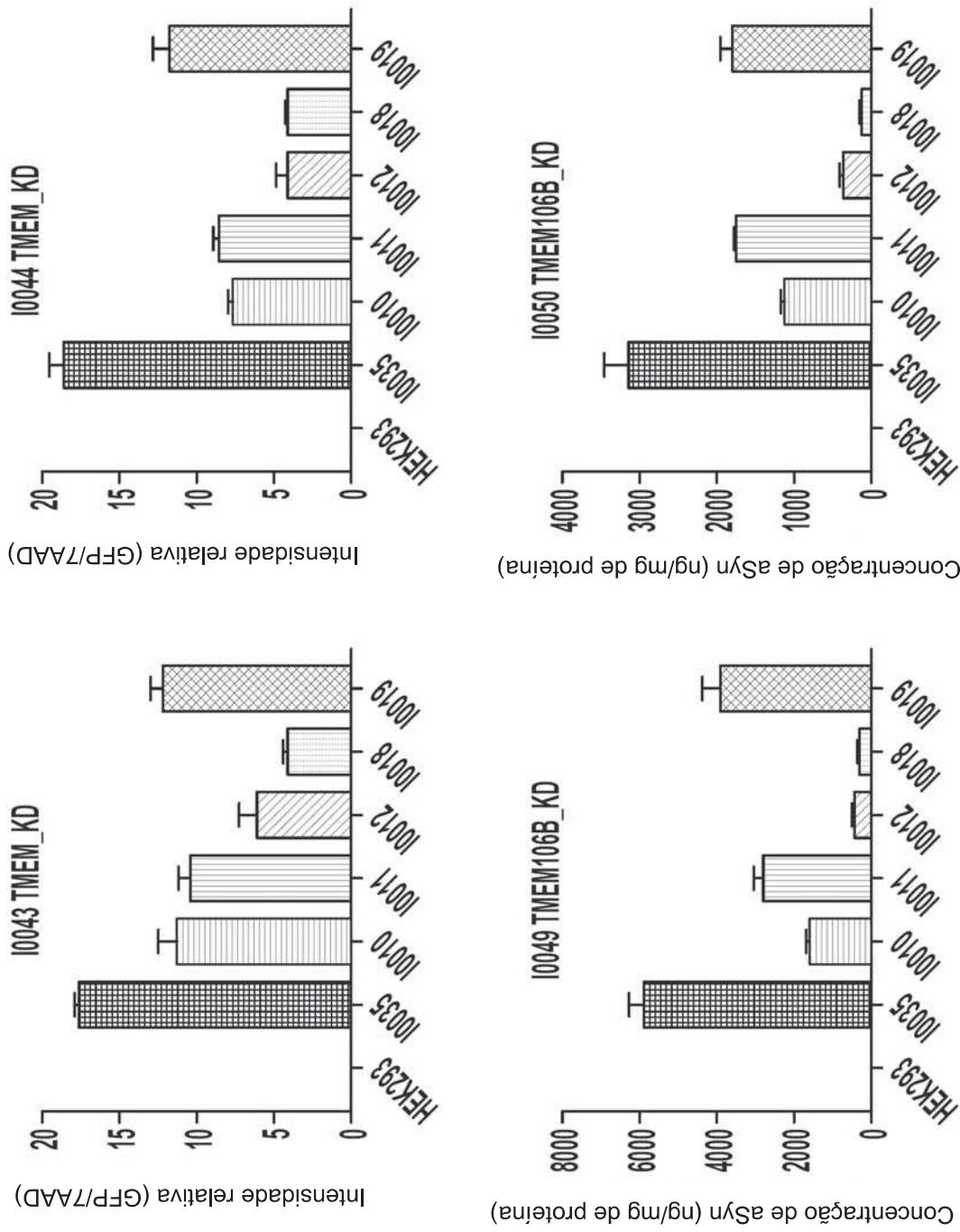


FIG. 37



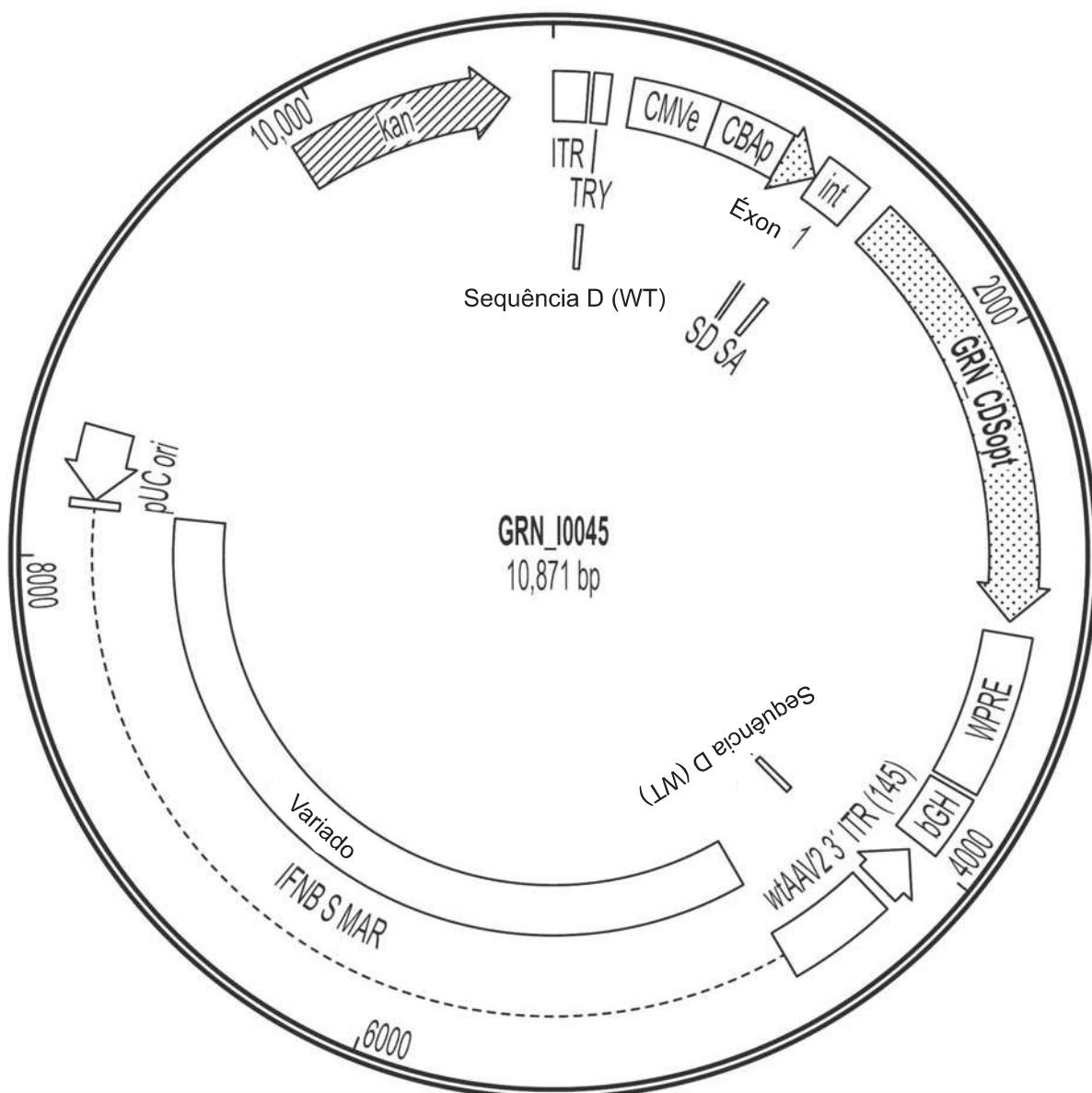


FIG. 39

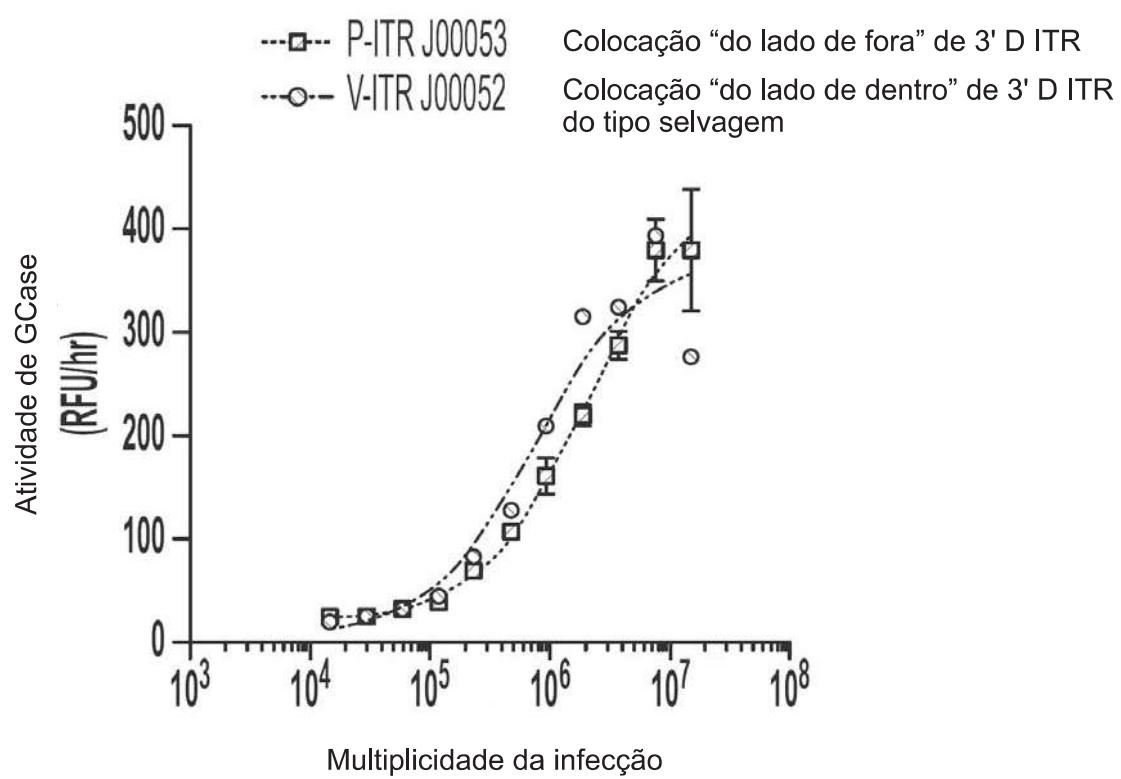


FIG. 40

RESUMO

Patente de Invenção: "**TERAPIAS DE GENES PARA DISTÚRBIOS LI- POSSOMAIS**".

A presente invenção refere-se, em alguns aspectos, a composições e métodos para o tratamento de doenças associadas com a função lisossomal aberrante, por exemplo, o mal de Parkinson (PD) e a doença de Gaucher. Em algumas modalidades, a invenção provê construtos de expressão que compreendem um transgene que codifica a beta-Glucocerebrosidase (GBA) ou uma porção da mesma sozinho ou em combinação com um ou mais genes associados ao PD. Em algumas modalidades, a invenção provê métodos de mal de Parkinson mediante a administração de tais construtos de expressão a um indivíduo com necessidade dos mesmos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA DE TRADUÇÃO 30 OU 60
- Data de Geração do Código: 08/05/2020
- Hora de Geração do Código: 17:23:46
- Código de Controle:
 - Campo 1: 10328FD82EDB9423
 - Campo 2: 0145129ADDCEA09D