

VECTORES DE TERAPIA GÉNICA PARA USO EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

REFERENCIA CRUZADA

5 Esta solicitud reivindica el beneficio a la solicitud provisional de los EE.
UU. núm. 63/443289, presentada el 3 de febrero de 2023, que se incorpora en
la presente descripción como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se relaciona con terapia génica para inhibir,
reducir o retrasar la degeneración o muerte de neuronas en un sujeto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés) es un
trastorno neurodegenerativo progresivo, en el que los síntomas progresan
lentamente desde un deterioro motor menor hasta la discapacidad física grave
que está acompañada por el deterioro cognitivo o la demencia en algunos
pacientes. A pesar de la necesidad apremiante, actualmente no existen
terapias clínicamente aprobadas que ralenticen o curen la PD. En la mayoría
20 de los pacientes se desconoce la causa de la enfermedad, pero probablemente
contribuya una combinación de factores, incluido el estrés mitocondrial. Se ha
demostrado que el estrés mitocondrial induce una multitud de desregulaciones

celulares que pueden causar tanto neurodegeneración como neuroinflamación y está particularmente relacionada a la PD.

Las mutaciones en la quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) y los genes de ubiquitina-proteína ligasa (PARKIN) Parkin RBR E3 estuvieron entre las primeras en estar asociadas con formas familiares de PD. Las mutaciones con pérdida de función homocigotas y heterocigotas compuestas en el gen PINK1 causan PD autosómica recesiva de aparición temprana. La señalización PINK1 es crucial para mantener la homeostasis mitocondrial debido a sus funciones esenciales en la degradación mitocondrial, movilidad, tamaño y mantenimiento de la red. De estas, la mejor función caracterizada de PINK1 es la mitofagia dependiente de PARKIN. En mitocondrias sanas, PINK1, que está ubicada corriente arriba a PARKIN, se importa constitutivamente a las mitocondrias, escindidas por proteasas y posteriormente se degrada más por el sistema de ubiquitina/proteasoma. PARKIN permanece inactiva en el citosol. Tras el daño o disfunción mitocondrial (principalmente debido a la despolarización mitocondrial), PINK1 se acumulará en la membrana mitocondrial externa (OMM, por sus siglas en inglés), lo que conduce al reclutamiento de PARKIN desde el citosol a la OMM donde su actividad de ligasa E3 incubará las proteínas mitocondriales que conducen a la degradación mitocondrial. Más allá de su función esencial en la mitofagia, PINK1 también está involucrada en la regulación de la bioenergética mitocondrial (activación del complejo 1), en la homeostasis del calcio y el control de la calidad mitocondrial (vía de vesícula derivada de la mitocondria). En este momento, existen solo unas pocas

terapias de moléculas pequeñas dirigidas a mitocondrias en la tubería, probablemente debido a efectos secundarios sistémicos no diana asociados con la modulación de las proteínas mitocondriales presentes de forma ubicua. Además, de acuerdo con CiteLine, actualmente existen 3153 ensayos clínicos en curso o completados en todo el mundo para PD. Sin embargo, ninguno de estos se dirige a PINK1.

Permanece la necesidad de desarrollar un agente terapéutico que pueda suministrarse al cuerpo estriado o sustancia negra directamente sin efectos secundarios sistémicos y efectos secundarios en células no dirigidas residentes en el SNC.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente descripción se proporcionan vectores de terapia génica recombinantes que comprenden un polinucleótido enlazado operativamente a un promotor, en donde el vector es un virus adenoasociado (AAV, por sus siglas en inglés) y el polinucleótido codifica la quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) y tiene al menos aproximadamente 90 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

En una modalidad del vector de terapia génica recombinante, el polinucleótido que codifica PINK1 tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

En una modalidad adicional del vector de terapia génica recombinante, el polinucleótido que codifica PINK1 tiene al menos 98 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

5 En aun una modalidad adicional del vector de terapia génica recombinante, el polinucleótido que codifica PINK1 tiene al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

En aun otra modalidad adicional del vector de terapia génica recombinante, el polinucleótido que codifica PINK1 tiene una secuencia de la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

10 En aun otra modalidad adicional del vector de terapia génica, el vector es un virus adenoasociado de serotipo 1 (AAV1).

En aun otra modalidad adicional del vector de terapia génica, el promotor se selecciona del grupo que consiste en hSYNI (sinapsina humana), JNA (alfa-internexina), NES (nestina), hTH (tirosina hidroxilasa humana), FOXA2 (caja Forkhead A2), CaMKII (proteína quinasa dependiente de calmodulina II), NSE (enolasa específica neuronal), CMV, CAG, UBC, PGK, EFl-alfa, GAPDH, SV40, HBV, beta-actina de pollo y promotores de beta-actina humana.

15

En aun otra modalidad adicional del vector de terapia génica, el vector comprende además uno o más elementos reguladores. En ciertas modalidades, el uno o más elementos reguladores se seleccionan del grupo que consiste en potenciadores, intrones, secuencia de señal poli-A y elementos estabilizantes de transcripción. En ciertas modalidades, los potenciadores se seleccionan del grupo que consiste en el potenciador de CMV, potenciador

20

GAPDH, potenciador de β -actina y potenciador de EF1- α . En ciertas modalidades, los elementos estabilizadores de la transcripción se seleccionan del grupo que consiste en una secuencia WPRE (elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota), una secuencia HPRE (elemento regulador postranscripcional de la hepatitis), una región de unión de supercóntigo, una UTR 3' y una UTR 5'.

En aun otra modalidad adicional del vector de terapia génica, el vector comprende un casete de expresión que comprende en orden de 5' a 3': a) promotor CAG y polinucleótido que codifica PINK1; b) promotor CAG, polinucleótido que codifica PINK1 y WPRE; c) promotor hTH y polinucleótido que codifica PINK1; d) promotor EF1a y polinucleótido que codifica PINK1; e) promotor EF1a, polinucleótido que codifica PINK1 y WPRE; f) promotor CBA y polinucleótido que codifica PINK1; o g) promotor CBA, polinucleótido que codifica PINK1 y WPRE.

En la presente descripción se proporcionan además células huésped que comprenden el vector de terapia génica proporcionado anteriormente.

En una modalidad de la célula huésped, las células huésped se seleccionan del grupo que consiste en células HEK293, 293T, HeLa, Vero y Sf9.

Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para aumentar la expresión de PINK1 en células en un sujeto al poner en contacto las células con el vector de terapia génica recombinante proporcionado anteriormente.

En una modalidad del método, las células son neuronas. En ciertas modalidades, las neuronas son neuronas positivas para tirosina hidroxilasa primaria.

En una modalidad adicional del método, el sujeto es un ser humano. En ciertas modalidades, el sujeto humano comprende una mutación en el gen PINK1. En ciertas modalidades, el sujeto humano padece o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés). En ciertas modalidades, la PD es una PD de aparición temprana. En ciertas modalidades, la PD es una PD autosómica recesiva de aparición temprana.

Además, en la presente descripción se proporcionan métodos para inhibir, reducir o retrasar la degeneración o muerte de neuronas de un sujeto al poner en contacto las neuronas con el vector de terapia génica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, lo que aumenta el nivel de expresión de PINK1 en las neuronas e inhibe, reduce, o retrasa la disfunción/degeneración o muerte de las neuronas. En ciertas modalidades, el sujeto es un sujeto humano. En ciertas modalidades, las neuronas son una neurona positiva de tirosina hidroxilasa primaria.

En una modalidad del método, la neurodegeneración inducida por MPP+ (1-metil-4-fenilpiridinio) se atenúa en el sujeto.

En una modalidad adicional de los métodos, se evita la pérdida de neuronas inducida por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) en el sujeto.

En aun otra modalidad adicional de los métodos, el sujeto humano comprende una mutación en el gen PINK1.

En aun otra modalidad adicional de los métodos, el sujeto humano padece o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson (PD). En ciertas modalidades, la PD es una PD de aparición temprana. En ciertas modalidades, la PD es una PD autosómica recesiva de aparición temprana.

5 Más aún, en la presente descripción se proporcionan polinucleótidos que codifican PINK1 y tienen al menos aproximadamente 90 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

En una modalidad, el polinucleótido tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

10 En una modalidad adicional, el polinucleótido tiene al menos 98 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

En aun otra modalidad adicional del polinucleótido, el polinucleótido que codifica PINK1 tiene al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

15 En aun otra modalidad adicional del polinucleótido, el polinucleótido que codifica PINK1 tiene una secuencia de la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

Más aún, en la presente descripción se proporcionan plásmidos que comprenden el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 32-36.

20 Más aún, en la presente descripción se proporcionan vectores de terapia génica recombinantes que comprenden un polinucleótido variante que codifica PINK1, en donde una célula transducida con el vector expresa PINK1 a un nivel más alto en comparación con el nivel de PINK1 expresado en una célula

del mismo tipo que se transduce con un vector del mismo tipo que comprende un polinucleótido silvestre que codifica PINK1.

Más aún, en la presente descripción se proporcionan métodos para aumentar la expresión de PINK1 en células en un sujeto, el método comprende poner en contacto las células con un vector de terapia génica recombinante que comprende un polinucleótido variante que codifica PINK1, en donde la expresión de PINK1 en las células aumenta en relación con la expresión de PINK1 en células del mismo tipo que se ponen en contacto en las mismas condiciones con la misma cantidad de un vector del mismo tipo que comprende un polinucleótido silvestre que codifica PINK1.

Más aún, en la presente descripción se proporcionan métodos para inhibir, reducir o retrasar la disfunción/degeneración o la muerte de neuronas en un sujeto, el método comprende poner en contacto las neuronas con un vector de terapia génica recombinante que comprende un polinucleótido variante que codifica PINK1, en donde la expresión de PINK1 en las neuronas aumenta en relación con la expresión de PINK1 en neuronas del mismo tipo que se ponen en contacto en las mismas condiciones con la misma cantidad de un vector del mismo tipo que comprende un polinucleótido silvestre que codifica PINK1.

En una modalidad de los vectores o métodos proporcionados anteriormente, el polinucleótido variante está enlazado operativamente a un promotor.

En una modalidad adicional del vector o método proporcionado anteriormente, cada uno de los polinucleótidos variantes y el polinucleótido silvestre está enlazado operativamente a un promotor del mismo tipo.

5 En aun otra modalidad del vector o método proporcionado anteriormente, el vector es un virus adenoasociado (AAV).

En aún otra modalidad adicional del vector o método proporcionado anteriormente, PINK1 se expresa al menos aproximadamente 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2 veces más por células o neuronas en contacto o transducidas con el vector que comprende el polinucleótido variante que codifica PINK1 en
10 comparación con células o neuronas puestas en contacto o transducidas con el vector que comprende el polinucleótido silvestre que codifica PINK1.

En aun otra modalidad adicional del vector o método proporcionado anteriormente, el polinucleótido variante que codifica PINK1 tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos
15 aproximadamente 85 % o al menos aproximadamente 90 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

En aun otra modalidad adicional del vector o método proporcionado anteriormente, la célula es una neurona.

En aún otra modalidad adicional del vector o método proporcionado anteriormente, la neurona se selecciona del grupo que consiste en neuronas
20 corticales, células ependimales, neuronas glutamatérgica, neuronas gabaérgicas, neuronas dopaminérgicas, oligodendrocitos, astrocitos y células microgliales.

Más aún, en la presente descripción se proporcionan métodos para inhibir, reducir o retrasar la degeneración o muerte de neuronas en un sujeto, el método comprende poner en contacto las neuronas con una cantidad de vector de terapia génica recombinante que comprende un polinucleótido que codifica PINK1, en donde la cantidad de vector es una cantidad efectiva para inhibir, reducir o retrasar la degeneración o muerte de neuronas en el sujeto.

En una modalidad del método, las neuronas se ponen en contacto con una cantidad de vector correspondiente a una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10^5 .

En una modalidad adicional del método, las neuronas se ponen en contacto con una cantidad de vector correspondiente a una MOI de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 10^4 .

En aun otra modalidad adicional del método, las neuronas se ponen en contacto con una cantidad de vector correspondiente a una MOI de aproximadamente 1, aproximadamente 10, aproximadamente 10^1 , aproximadamente 10^2 , aproximadamente 10^3 , aproximadamente 10^4 o aproximadamente 10^5 .

En aun otra modalidad adicional del método, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

En aun otra modalidad adicional del método, el polinucleótido es un polinucleótido variante.

En aun otra modalidad adicional del método, el vector es un virus adenoasociado (AAV).

En aun otra modalidad adicional del método, el polinucleótido variante que codifica PINK1 tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 % o al menos aproximadamente 90 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

5 En aun otra modalidad adicional del método, la neurona se selecciona del grupo que consiste en neuronas corticales, células endodiales, neuronas glutamatérgica, neuronas gabaérgicas, neuronas dopaminérgicas, oligodendrocitos, astrocitos y células microgliales.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1A es una transferencia Western que muestra el nivel de expresión de ARNm DE PINK1 en células HEK293T con inactivación de PINK1 transducidas con plásmidos de AAV1 CIS que contienen PINK1 silvestre (GT65) o variantes de PINK1 (GT66, TG69, GT72, GT73, GT74 o GT75).

15 La Figura 1B es un gráfico que muestra el nivel relativo de proteína PINK1 en células HEK293T con inactivación de PINK1 transducidas con plásmidos de AAV1 CIS que contienen PINK1 silvestre (GT65) o variantes de PINK1.

Las Figuras 2A-2B muestran imágenes representativas de células HEK293T silvestres y con inactivación de PINK1 que se trataron con el vehículo DMSO o fármaco de Valinomicina antes y después de sobreexpresar AAV1-PINK1. La
20 Figura 2A es una inmunocitoquímica de pS65-Ub en células HEK293T con inactivación de PINK1 y PINK1 silvestre tratadas con el vehículo DMSO o valinomicina. La Figura 2B es un gráfico que muestra lecturas de pS65-Ub en

células HEK293T con inactivación de PINK1 y PINK1 silvestre que sobreexpresan PINK1 silvestre o variantes de PINK1 con o sin tratamiento con valinomicina.

Las Figuras 3A-3E son gráficos que muestran la cantidad de LDH liberada en neuronas corticales primarias transducidas con vectores AAV1 que contienen variantes PINK1 GT67 (Figura 3A), GT69 (Figura 3B), GT74 (Figura 3C), GT77 (Figura 3D) o GT79 (Figura 3E).

La Figura 4 es un gráfico que muestra la cantidad de LDH liberada en neuronas corticales primarias transducidas con vectores AAV1 que contienen GT69 o GT74 en las MOI indicadas, en comparación con neuronas no transducidas.

La Figura 5 muestra la expresión in vivo del PINK1 humano en ratas transducidas con vectores de AAV que contienen PINK1 silvestre (Panel A), variante de PINK1 GT69 (Panel B) o variante de PINK1 GT74 (Panel C). El Panel D muestra el nivel de ARNm de PINK1 humano en rata no transducida. Las Figuras 6 y 7 muestran las transferencia western y los resultados de qPCR, respectivamente, de muestras de cuerpo estriado.

La Figura 8A muestra los niveles de dopamina (DA) en el cuerpo estriado de roedores con PINK1 silvestre y con inactivación de PINK1 tratados con cantidades variables de un control y GT65. La Figura 8B muestra niveles de dopamina (DA) en el cuerpo estriado de roedores con PINK1 silvestre y con inactivación de PINK1 tratados con cantidades variables de un control y GT69.

Las Figuras 9A-9B muestran niveles de tirosina hidroxilasa (TH, por sus siglas en inglés) en el mesencéfalo de roedores con inactivación de PINK1

tratados con cantidades variables de GT65 y GT69, según lo medido por espectrometría de masas (Figura 9A) y por transferencia western (Figura 9B).

Las Figuras 10A-10D son mapas de trayectoria de ratas silvestres, ratas con inactivación de PINK1 o ratas con inactivación de PINK1 transducida con AAV que contienen el gen PINK1 silvestre (GT65) o gen PINK1 variante (GT69).

Las Figuras 10E-10G son gráficos que muestran cambios de la capacidad motora para ratas con inactivación de PINK1 después de la transducción con AAV que contiene el gen PINK1 silvestre (GT65) o gen PINK1 variante (GT69).

La Figura 11 muestra hibridación (ISH) in situ e inmunohistoquímica (IHC) para ARNm y proteínas de hPINK1 y tirosina hidroxilasa (TH) canina en el cerebro de un perro que recibió una sola inyección en la sustancia negra del vector AAV1 que contenía GT69.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se describe y se reivindica aquí a continuación. Y está bien establecido que el objeto descrito y reivindicado en la presente descripción debe verse e interpretarse al momento de presentar esta solicitud de patente.

5 Diversas publicaciones, artículos y patentes se citan o se describen en los antecedentes y a lo largo de la especificación; cada una de estas referencias se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. La descripción de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o lo similar, que se han incluido en la presente descripción, es para el
10 propósito de proporcionar el contexto para la invención. Tal descripción no es una admisión de que cualquiera o todos estos asuntos formen parte de la técnica anterior con respecto a cualquier invención descrita o reivindicada.

A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado
15 como lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que se dirige la invención. De cualquier otra manera, ciertos términos usados en la presente descripción tienen los significados tal como se exponen en la descripción.

Debe destacarse que, como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen
20 los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se indique lo contrario, cualquier valor numérico, como en una concentración o rango de concentraciones descrito en la presente descripción, debe entenderse como que está modificado en todos los casos por el

término “aproximadamente”. Por lo tanto, un valor numérico incluye típicamente $\pm$ 10 % del valor recitado. Por ejemplo, una concentración de 1 mg/ml incluye 0,9 mg/ml a 1,1 mg/ml. De la misma manera, un rango de concentración de 1 % a 10 % (p/v) incluye de 0,9 % (p/v) a 11 % (p/v). Como se usa en la presente descripción, el uso de un rango numérico incluye expresamente todos los subrangos posibles, todos los valores numéricos individuales dentro de ese rango, incluidos los enteros dentro de tales rangos y fracciones de los valores a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera.

A menos que se indique de cualquier otra manera, el término “al menos” que precede a una serie de elementos se entenderá como que se refiere a cada elemento en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, usando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en la presente descripción. Tales equivalentes se consideran incluidos en la invención.

Como se usan en la presente descripción, se entenderá que los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”, “que tiene”, “contiene” o “que contiene”, o cualquier otra variante de estos, implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros mencionados, más no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros, y pretenden ser no excluyentes o limitados de antemano. Por ejemplo, una composición, una mezcla, un proceso, un método, un artículo o un aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente solo a esos elementos, sino que puede incluir otros que no estén expresamente listados o

sean inherentes a tal composición, mezcla, proceso, método, artículo o aparato. Además, a menos que se especifique de cualquier otra manera, “o” se refiere a un “o” inclusivo y no a un “o” exclusivo. Por ejemplo, una condición A o B se satisface mediante cualquiera de los siguientes criterios: A es verdadero (o
5 actual) y B es falso (o no actual), A es falso (o no actual) y B es verdadero (o actual) y tanto A como B son verdaderos (o actuales).

Como se usa en la presente descripción, el término conjuntivo “y/o” entre múltiples elementos mencionados se entiende que abarca tanto las opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, donde se unen dos elementos con
10 “y/o”, una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y el segundo elementos juntos. Se entiende que cualquiera de estas opciones cae dentro del significado, y por lo tanto satisfacen el requisito del término “y/o”
15 como se usa en la presente descripción. También se entiende que la aplicabilidad simultánea de más de una de las opciones cae dentro del significado, y por lo tanto satisface el requisito del término “y/o”.

Como se usa en la presente descripción, el término “consiste en”, o variaciones tales como “consisten en” o “que consiste en”, como se usan a lo
20 largo de la especificación y reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier número entero o grupo de números enteros mencionados, pero que no puede agregarse ningún entero o grupo de enteros al método, estructura o composición especificados.

Como se usa en la presente descripción, el término “consiste esencialmente en” o variaciones tales como “consisten esencialmente en” o “que consiste esencialmente en”, como se usan a lo largo de la especificación y reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier número entero o grupo de números enteros mencionados, y la inclusión opcional de cualquier número entero o grupo de números enteros mencionados que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del método, estructura o composición especificados. Ver M.P.E.P. § 2 111.03.

También debe comprenderse que los términos “aproximadamente”, “generalmente”, “sustancialmente” y términos similares, usados en la presente descripción cuando se refieren a una dimensión o característica de un componente de la invención preferida, indican que la dimensión/característica descrita no es un límite o parámetro estricto y no excluye variaciones menores de estos que son funcionalmente iguales o similares, tal como entendería una persona con experiencia en la técnica. Como mínimo, tales referencias que incluyen un parámetro numérico incluirían variaciones que, usando principios matemáticos e industriales aceptados en la técnica (p. ej., redondeo, medición u otros errores sistemáticos, tolerancias de fabricación, etc.), no variarían el dígito menos significativo.

Los términos “idénticos” o “identidad” porcentual, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales, cuando

se comparan y alinean para una máxima correspondencia, como se midió usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Para la comparación de secuencias, típicamente, una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con respecto a la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de referencia y prueba se ingresan en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmos de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias después calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, basado en los parámetros del programa designados.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Solic. Math. 2:482 (1981), el algoritmo de homología de alineación de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), la búsqueda para el método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), las implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o la inspección visual (ver, generalmente, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al. eds., Current Protocols, un proyecto conjunto entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplemento de 1995) (Ausubel)).

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, respectivamente.

5 El software para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica en primer lugar la identificación de pares de secuencia de alto puntaje (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coincide con o satisfacer algunos valores de puntuación de umbral

10 T positivos cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una base de datos de secuencias. T se denomina umbral de puntaje de palabras locales (Altschul et al., supra). Estos aciertos iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para búsquedas iniciales para encontrar HSP más largos que las contienen. Después, los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a

15 lo largo de cada secuencia para aumentar el puntaje de alineamiento acumulativo.

Los puntajes acumulativos se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalidad para residuos no coincidentes; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz

20 de puntuación para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el puntaje de alineación acumulativo cae por la cantidad X a partir de su valor máximo alcanzado; el puntaje acumulativo va a cero o menor, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de

residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como defectos una longitud de palabras (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, p. ej., Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)).

Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, con mayor preferencia, menor que aproximadamente 0,01 y, con la máxima preferencia, menor que aproximadamente 0,001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente de reactividad cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por

lo tanto, un polipéptido es, típicamente, sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren únicamente por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas.

Como se usa en la presente descripción, el término “polinucleótido”, que se denomina sinónimo de “molécula de ácido nucleico”, “nucleótidos” o “ácidos nucleicos”, se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Los “polinucleótidos” incluyen, sin limitarse a, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, “polinucleótido” se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido incluye, además, los ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y los ADN o ARN con cadenas principales modificadas para estabilidad o por otras razones. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Pueden realizarse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por lo tanto, “polinucleótido” abarca formas de polinucleótidos química, enzimática o metabólicamente modificadas como se encuentran, típicamente, en la

naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. “Polinucleótido” abarca, además, cadenas de ácido nucleico relativamente cortas, denominadas, frecuentemente, oligonucleótidos.

Como se usa en la presente descripción, los términos “péptido”,
5 “polipéptido” o “proteína” pueden referirse a una molécula compuesta de aminoácidos y puede ser reconocida como una proteína por los expertos en la técnica. En la presente descripción se usa el código convencional de una letra o tres letras para los residuos de aminoácidos. Los términos “péptido”,
“polipéptido” y “proteína” pueden usarse indistintamente en la presente
10 descripción para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede ser interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se modificó naturalmente o por intervención; por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro, glicosilación,
15 lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcado. Dentro de la definición también se incluyen, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

20 Las secuencias de péptidos descritas en la presente descripción se escriben de acuerdo con la convención habitual por la cual la región N-terminal del péptido se encuentra a la izquierda y la región C-terminal se encuentra a la derecha.

Aunque se conocen formas isoméricas de los aminoácidos, se representa la forma L del aminoácido salvo que se indique expresamente lo contrario.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un vector de terapia génica recombinante que comprende un casete de expresión para expresar proteína quinasa putativa inducida por PTEN 1 (PINK1) (SEQ ID NO.: 9, como se enumera a continuación) y el vector es un vector adenoasociado (AAV). En algunas modalidades, el casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica PINK1 y está operativamente enlazado a un promotor.

El polinucleótido que codifica PINK1 puede comprender una secuencia que tiene al menos aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de identidad con la SEQ ID NO.: 1 (que corresponde a los nucleótidos 92-1834 del gen PINK1 humano silvestre humano (NM_032409.3). En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica PINK1 también puede ser un polinucleótido variante derivado del gen PINK1 humano silvestre modificado. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica PINK1 puede comprender una secuencia que tiene al menos aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de identidad con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO.: 2-3. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica PINK1 puede comprender

una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO.: 2-3. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica PINK1 puede comprender una secuencia de la SEQ ID NO.: 2. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica PINK1 puede comprender una secuencia de la SEQ ID NO.: 3.

5 Como se usa en la presente descripción, “polinucleótido variante que codifica PINK1”, “gen variante PINK1” y “variante PINK1” se usan indistintamente y se refieren a una secuencia polinucleotídica derivada del gen PINK1 humano silvestre modificado. En otras palabras, el “polinucleótido variante que codifica PINK1”, “gen variante PINK1” o “variante PINK1” contiene al menos un cambio de
10 nucleótido en comparación con el gen PINK1 humano silvestre (SEQ ID NO.: 1) y codifica la proteína PINK1 (SEQ ID NO.: 9).

SEQ ID NO.: 1

ATGGCGGTGCGACAGGCGCTGGGCCGCGGCCTGCAGCTGGGTGCGAG
CGCTGCTGCTGCGCTTCACGGGCAAGCCCGGCCGGGCCTACGGCTTG
15 GGGCGGCCGGGCCCCGGCGGCGGGCTGTGTCCGCGGGGAGCGTCCA
GGCTGGGCCGCGAGGACCGGGCGCGGAGCCTCGCAGGGTCTGGGCTC
GGGCTCCCTAACCGTCTCCGCTTCTTCCGCCAGTCGGTGGCCGGGCT
GGCGGCGCGGTTGCAGCGGCAGTTCGTGGTGCGGGCCTGGGGCTGC
GCGGGCCCTTGCGGCCGGGCAGTCTTTCTGGCCTTCGGGCTAGGGCT
20 GGGCCTCATCGAGGAAAAACAGGCGGAGAGCCGGCGGGCGGTCTCG
GCCTGTCAGGAGATCCAGGCAATTTTTACCCAGAAAAGCAAGCCGGGG
CCTGACCCGTTGGACACGAGACGCTTGCAGGGCTTTCGGCTGGAGGA
GTATCTGATAGGGCAGTCCATTGGTAAGGGCTGCAGTGCTGCTGTGTA

TGAAGCCACCATGCCTACATTGCCCCAGAACCTGGAGGTGACAAAGAG
CACCGGGTTGCTTCCAGGGAGAGGCCAGGTACCAGTGCACCAGGAG
AAGGGCAGGAGCGAGCTCCGGGGGGCCCCTGCCTTCCCCTTGGCCATC
AAGATGATGTGGAACATCTCGGCAGGTTCTCCAGCGAAGCCATCTTG
5 AACACAATGAGCCAGGAGCTGGTCCCAGCGAGCCGAGTGGCCTTGGC
TGGGGAGTATGGAGCAGTCACTTACAGAAAATCCAAGAGAGGTCCCAA
GCAACTAGCCCCTCACCCCAACATCATCCGGGTTCTCCGCGCCTTCAC
CTCTTCCGTGCCGCTGCTGCCAGGGGGCCCTGGTCGACTACCCTGATG
TGCTGCCCTCACGCCTCCACCCTGAAGGCCTGGGCCATGGCCGGACG
10 CTGTTCCCTCGTTATGAAGAACTATCCCTGTACCCTGCGCCAGTACCTTT
GTGTGAACACACCCAGCCCCCGCCTCGCCGCCATGATGCTGCTGCAG
CTGCTGGAAGGCGTGGACCATCTGGTTCAACAGGGCATCGCGCACAG
AGACCTGAAATCCGACAACATCCTTGTGGAGCTGGACCCAGACGGCTG
CCCCTGGCTGGTGATCGCAGATTTTGGCTGCTGCCTGGCTGATGAGA
15 GCATCGGCCTGCAGTTGCCCTTCAGCAGCTGGTACGTGGATCGGGGC
GGAAACGGCTGTCTGATGGCCCCAGAGGTGTCCACGGCCCGTCCTGG
CCCCAGGGCAGTGATTGACTACAGCAAGGCTGATGCCTGGGCAGTGG
GAGCCATCGCCTATGAAATCTTCGGGCTTGTCAATCCCTTCTACGGCC
AGGGCAAGGCCACCTTGAAAGCCGCAGCTACCAAGAGGCTCAGCTA
20 CCTGCACTGCCCCGAGTCAGTGCCTCCAGACGTGAGACAGTTGGTGAG
GGCACTGCTCCAGCGAGAGGCCAGCAAGAGACCATCTGCCCCGAGTAG
CCGCAAATGTGCTTCATCTAAGCCTCTGGGGTGAACATATTCTAGCCCT
GAAGAATCTGAAGTTAGACAAGATGGTTGGCTGGCTCCTCCAACAATC

GGCCGCCACTTTGTTGGCCAACAGGCTCACAGAGAAGTGTTGTGTGGA
AACAAAAATGAAGATGCTCTTTCTGGCTAACCTGGAGTGTGAAACGCTC
TGCCAGGCAGCCCTCCTCCTCTGCTCATGGAGGGCAGCCCTG

SEQ ID NO.: 2

5 ATGGCGGTTTCGACAAGCTCTTGGAAGAGGCCTGCAACTGGGCAGAGC
ACTGCTGCTGAGATTCACCGGAAAACCCGGCAGAGCCTATGGCCTTG
GTAGACCTGGACCTGCCGCCGGATGTGTCAGAGGCGAAAGACCTGGA
TGGGCTGCTGGACCTGGTGCCGAGCCTAGAAGAGTTGGACTGGGCCT
GCCTAACCGGCTGCGGTTCTTTAGACAGTCTGTGGCCGGACTGGCCG
10 CCAGACTGCAGAGACAGTTTGTCTGTTAGAGCCTGGGGCTGCGCCGGA
CCTTGTGGTAGAGCTGTGTTTCTGGCCTTTGGCCTCGGCCTGGGACTG
ATCGAAGAGAAGCAGGCCGAAAGCAGACGGGCCGTGTCTGCCTGTCA
AGAGATCCAGGCCATCTTCACCCAGAAGTCCAAGCCTGGACCAGATCC
TCTGGACACCAGACGGCTGCAGGGCTTCAGACTGGAAGAGTACCTGA
15 TCGGCCAGAGCATCGGCAAGGGATGTTCTGCCGCCGTGTACGAGGCC
ACCATGCCTACACTGCCCCAGAACCTGGAAGTGACCAAGAGCACAGG
ACTGCTGCCTGGCAGAGGCCCTGGAACATCTGCTCCAGGCGAGGGAC
AAGAAAGAGCACCTGGCGCTCCAGCCTTTCCACTGGCCATCAAGATGA
TGTGGAACATCAGCGCCGGCAGCAGCTCTGAGGCCATCCTGAATACC
20 ATGAGCCAAGAGCTGGTGCCCGCCAGCAGAGTTGCTCTGGCTGGCGA
ATATGGCGCCGTGACCTACCGCAAGTCTAAGAGAGGACCCAAGCAGC
TGGCCCCTCATCCTAACATCATCCGGGTGCTGAGAGCCTTCACCAGCA
GTGTTCTCTGCTTCCTGGCGCACTGGTGGACTACCCTGATGTGCTTC

CTAGCAGACTGCACCCTGAAGGACTCGGCCACGGCAGAACCCTGTTC
CTCGTGATGAAGAACTACCCCTGCACACTGCGGCAGTACCTGTGCGTG
AACACCCCATCTCCAAGACTGGCTGCCATGATGCTGCTGCAGCTGCTG
GAAGGCGTGGACCATCTGGTGCAGCAGGGAATCGCCACAGAGATCT
5 GAAGTCCGACAACATCCTGGTGGAACTGGACCCCGATGGCTGTCCTTG
GCTGGTTATCGCCGATTTCTGGCTGCTGTCTGGCCGACGAGTCTATCGG
ACTCCAGCTGCCTTTCTCCTCTTGGTACGTGGACAGAGGCGGCAACGG
CTGTCTGATGGCTCCCGAAGTGTCTACCGCTAGACCAGGACCTAGAGC
CGTGATCGACTACAGCAAAGCCGATGCCTGGGCCGTGGGAGCCATTG
10 CCTATGAGATCTTCGGCCTGGTCAACCCCTTCTACGGACAAGGCAAAG
CCCACCTGGAAAGCAGAAGCTATCAAGAGGCCAGCTGCCAGCTCTG
CCTGAGTCTGTTCCACCTGATGTGCGGCAGCTTGTGAGGGCTCTGCTG
CAGAGAGAGGCCAGCAAAAGACCTTCTGCCAGAGTGGCCGCCAACGT
GCTGCATCTTAGTCTGTGGGGCGAGCACATTCTGGCCCTGAAGAACCT
15 GAAGCTGGACAAGATGGTCGGATGGCTGCTCCAGCAGTCTGCCGCTA
CACTGCTCGCCAATAGACTGACCGAGAAGTGCTGCGTGGAACGAAG
ATGAAGATGCTGTTCTGGCCAACCTGGAATGCGAGACACTGTGTCAG
GCCGCTCTGCTCCTCTGTTCTTGGAGAGCCGCTCTG
SEQ ID NO.: 3
20 ATGGCCGTGCGACAGGCACTGGGCCGGGGCCTGCAGCTGGGGCGGG
CCCTCCTGCTACGGTTTACCGGCAAGCCTGGCAGAGCCTATGGCCTG
GGCAGACCCGGCCCAGCTGCCGGCTGTGTGCGGGGCGAGCGTCCAG
GATGGGCCGCGGACCCGGGGCAGAGCCACGCAGAGTGGGCCTGGG

TCTGCCCAACAGGCTTAGATTTTTCCGCCAGAGCGTGGCTGGACTGGC
TGCCAGGCTGCAGCGGCAGTTTGTGGTGCGCGCCTGGGGGTGTGCC
GGGCCTTGCGGCCGGGCCGTGTTTCTCGCCTTTGGACTGGGACTGGG
CCTGATTGAAGAAAAGCAGGCCGAGTCCAGAAGGGCCGTCAGCGCTT
5 GCCAGGAGATCCAGGCCATTTTCACCCAGAAGTCAAAGCCCGGCCCA
GATCCACTGGATACCCGAAGGCTGCAGGGCTTCAGGCTTGAGGAGTA
CCTGATCGGGCAGAGTATTGGCAAAGGCTGTTCAGCTGCCGTGTATGA
GGCAACAATGCCCCACCCTGCCCCAGAATCTGGAGGTGACCAAATCAAC
AGGACTGCTGCCAGGGAGAGGGCCAGGAACCAGCGCACCCGGGGAG
10 GGCCAAGAACGGGCCCCCGGCGCACCCAGCCTTCCCTCTGGCAATCAA
GATGATGTGGAATATCTCTGCCGGCAGTAGCTCAGAAGCCATCCTGAA
TACTATGAGCCAGGAGCTGGTCCCCGCTTCCAGAGTGGCCCTGGCTG
GCGAATACGGCGCTGTGACATACAGGAAGAGTAAAAGGGGGCCCAAAG
CAGCTGGCCCCTCATCCCAATATAATCAGAGTGCTGAGGGCCTTTACC
15 TCCAGCGTGCCTTTATTGCCTGGCGCCCTGGTTGATTACCCCGACGTG
CTGCCCTCACGCCTCCATCCTGAGGGACTGGGACATGGCAGGACCCT
GTTTCTGGTGATGAAGAACTATCCTTGCAACCCTGCGGCAGTATTTGTG
CGTCAATACTCCATCCCCCGGCTGGCCGCCATGATGCTGCTGCAGCT
CCTGGAAGGAGTGGATCATCTGGTGCAGCAGGGAATCGCCCATAGGG
20 ACCTGAAATCCGATAACATCCTGGTGGAAGTGGACCCCGACGGATGTC
CATGGCTGGTGATCGCTGACTTCGGATGCTGCCTGGCCGACGAGAGC
ATCGGCCTGCAGCTGCCTTTCAGCTCTTGGTATGTAGACAGAGGCGGC
AATGGTTGCCTGATGGCCCCTGAAGTGTCTACAGCACGGCCCCGGACC

CAGGGCAGTGATTGATTACTCCAAGGCTGATGCATGGGCCGTGGGCG
 CAATCGCCTACGAAATCTTTGGGTTGGTGAACCCATTCTATGGACAGG
 GCAAAGCCCACCTGGAAAGCAGGAGTTACCAGGAAGCACAGCTGCCC
 GCTCTGCCTGAATCCGTGCCACCTGATGTGCGGCAGCTTGTGCGGGC
 5 CCTGCTCCAACGCGAAGCCTCTAAGAGACCATCTGCAAGAGTCGCCG
 CCAACGTGCTGCATCTGAGCCTGTGGGGCGAACACATCCTGGCACTG
 AAGAACCTGAAGCTGGATAAGATGGTGGGATGGCTGCTGCAGCAGAG
 CGCCGCCACCCTGCTGGCCAACCGTCTGACCGAAAAATGCTGTGTGG
 AGACAAAAATGAAGATGCTGTTCTGGCTAATCTGGAGTGCGAGACAC
 10 TGTGCCAGGCCGCCCTGCTGCTGTGCAGCTGGAGGGCCGCCCTC

SEQ ID NO.: 9

MAVRQALGRGLQLGRALLLRFTGKPGRAYGLGRP GPAAGCVRGERPG
 WAAGPGAEP RRVLGLPNRLRFFRQSVAGLAARLQRQFVVRWGCAG
 PCGRAVFLAFGLGLGLIEEKQAESRRAVSACQEIQAI FTQKSKPGPDPLD
 15 TRRLQGFRLEEYLIGQSIGKGCSAAVYEATMPTLPQNLEVT KSTGLLPGR
 GPGTSAPGEGQERAPGAPAFPLAIKMMWNISAGSSSEAILNTMSQELVP
 ASRVALAGEYGAVTYRKSKRGPKQLAPHPNIIRVLRAFTSSVPLLPGALV
 DYPDVLPSRLHPEGLGHGRTLFLVMKNYPCTLRQYLCVNTPSPR LAAM
 MLLQLLEGVDHLVQQGIAHRDLKSDNILVELDPDGCPWLVIADFGCCLA
 20 DESIGLQLPFSSWYVDRGGNGCLMAPEVSTARPGPRAVIDYSKADAWA
 VGAIAYEIFGLVNPFGQGKAHLESRSYQEAQLPALPESVPPDVRQLVR
 ALLQREASKRPSARVAANVLHLSLWGEHILALKNLKLDKMVGWLLQQSA
 ATLLANRLTEKCCVETKMMLFLANLECETLCQAALLLCSWRAAL

El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus de ADN monocatenario que crece solo en células en las que ciertas funciones se proporcionan mediante un virus ayudante de coinfección. La información general y las revisiones de AAV se pueden encontrar, por ejemplo, en Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228, and Bems, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York). Se espera completamente que los mismos principios descritos en estas revisiones serán aplicables a los serotipos de AAV adicionales caracterizados después de las fechas de publicación de las revisiones porque se sabe que los diversos serotipos están estrechamente relacionados, tanto estructural como funcionalmente, incluso al nivel genético. (Ver, por ejemplo, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; y Rose, Comprehensive Virology 3: 1-61 (1974)). Por ejemplo, todos los serotipos de AAV exhiben aparentemente propiedades de replicación muy similares mediadas por genes de replicación homóloga; y todos tienen tres proteínas de la cápside relacionadas, tales como aquellas expresadas en AAV2. El grado de relación se sugiere adicionalmente por el análisis heterodúplex que revela hibridación cruzada extensiva entre los serotipos a lo largo de la longitud del genoma; y la presencia de segmentos de autohibridación análogos en los terminales que corresponden a “secuencias de repetición terminal invertida” (ITR). Los patrones de infectividad similares también sugieren que las funciones de replicación en cada serotipo están bajo control regulatorio similar.

Como se usa en la presente descripción, un “vector de AAV” o “vector de AAVr” se refiere a un vector recombinante que comprende uno o más

polinucleótidos de interés (o transgenes) que están flanqueados por las
secuencias de repetición terminales (ITR) de AAV. Tales vectores de AAV se
pueden replicar y empaquetar en partículas virales infecciosas cuando están
presentes en una célula huésped que ha sido transfectada con un plásmido que
5 codifica y expresa productos génicos rep y cap. Alternativamente, los vectores de
AAV pueden empaquetarse en partículas infecciosas usando una célula huésped
que ha sido modificada de manera estable para expresar genes rep y cap.

Como se usa en la presente descripción, un “virión de AAV” o “partícula viral
de AAV” o “partícula de vector de AAV” se refiere a una partícula viral compuesta
10 de al menos una proteína de la cápside de AAV y un vector de AAV de
polinucleótidos encapsidados. Como se usa en la presente descripción, si la
partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido
distinto de un genoma de AAV silvestre, tal como un transgén que se va a
administrar a una célula de mamífero), típicamente se denomina “partícula de
15 vector de AAV” o simplemente un “vector de AAV”. Por lo tanto, la producción de
partículas de vector de AAV incluye necesariamente la producción de vector de
AAV, ya que dicho vector está contenido dentro de una partícula de vector de AAV.

El AAV es un parvovirus con deficiencia de replicación, cuyo genoma de
ADN monocatenario es de aproximadamente 4,7 kb de longitud, lo que incluye dos
20 repeticiones terminales invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) de 145 nucleótidos.
Existen múltiples variantes conocidas de AAV, también denominadas a veces
serotipos cuando se clasifican por epítopos antigénicos. Se conocen las secuencias
de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV. Por ejemplo, el genoma

completo de AAV-1 se proporciona en el acceso a GenBank núm. NC_002077; el
genoma completo de AAV-2 se proporciona en el acceso a GenBank núm.
NC_001401 y Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983); el genoma completo
de AAV-3 se proporciona en el acceso a GenBank núm. NC_1829; el genoma
5 completo de AAV-4 se proporciona en el acceso a GenBank núm. NC_001829; el
genoma de AAV-5 se proporciona en el acceso a GenBank núm. AF085716; el
genoma completo de AAV-6 se proporciona en el acceso a GenBank núm. NC_00
1862; al menos porciones de genomas de AAV-7 y AAV-8 se proporcionan en los
accesos a GenBank núm. AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma de
10 AAV-9 se proporciona en Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); el genoma de
AAV-10 se proporciona en Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); y el genoma de AAV-11
se proporciona en Virology, 330(2): 375-383 (2004). La secuencia del genoma de
AAVrh.74 se proporciona en la patente de los EE. UU. núm. 9.434.928 incorporada
en la presente descripción como referencia. Las secuencias de actuación de Cis
15 que dirigen la replicación (rep) de ADN viral, la encapsidación/empaquetado y la
integración del cromosoma de la célula huésped están contenidas dentro de las ITR
de AAV. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones
relativas en el mapa) dirigen la expresión de dos marcos de lectura abiertos internos
de AAV que codifican los genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p19),
20 acoplados con el empalme diferencial del intrón AAV único (en los nucleótidos 2107
y 2227), dan como resultado la producción de cuatro proteínas rep (rep78, rep68,
rep52 y rep40) del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades
enzimáticas que son finalmente responsables de replicar el genoma viral. El gen

cap se expresa a partir del promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. El empalme alternativo y los sitios de inicio de la traducción sin consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un sitio de poliadenilación de consenso único se ubica en la posición 95 del mapa del genoma de AAV. El ciclo de vida y la genética de AAV se analizan en Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

El AAV posee características únicas que hacen que sea atractivo como un vector para administrar ADN extraño a las células, por ejemplo, en terapia génica. La infección por AAV de células en cultivo es nocitopática, y la infección natural de humanos y otros animales es silenciosa y asintomática. Además, AAV infecta muchas células de mamíferos, lo que permite la posibilidad de dirigir muchos tejidos diferentes in vivo. Además, AAV transduce lentamente la división y no división de células, y puede persistir esencialmente durante la vida de esas células como un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma proviral de AAV se inserta como ADN clonado en plásmidos, lo que hace viable la construcción de genomas recombinantes. Además, debido a que las señales que dirigen la replicación de AAV y la encapsidación del genoma están contenidas dentro de las ITR del genoma de AAV, parte o toda la parte interna de aproximadamente 4,3 kb del genoma (replicación de codificación y proteínas de la cápside estructural, rep-cap) se puede reemplazar con ADN extraño. Para generar vectores de AAV, las proteínas rep y cap se pueden proporcionar en trans. Otra característica significativa de AAV es que es un virus extremadamente estable y resistente. Resiste fácilmente a las condiciones usadas para inactivar el adenovirus

(56 °C a 65 °C durante varias horas), lo que hace que la conservación en frío de AAV sea menos crítica. El AAV puede incluso ser liofilizado. Por último, las células infectadas por AAV no son resistentes a la superinfección.

El ADN de AAV en los genomas de AAVr puede ser de cualquier variante o serotipo de AAV para el que puede derivar un virus recombinante que incluye, entre otros, variantes de AAV o serotipos AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 y AAVrh10. La producción de AAVr pseudotipificado se describe, por ejemplo, en WO 01/83692. También se contemplan otros tipos de variantes de AAVr, por ejemplo, AAVr con mutaciones de la cápside. Ver, por ejemplo, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Las secuencias de nucleótidos de los genomas de varios serotipos de AAV se conocen en la técnica.

En algunos casos, el AAVr comprende un genoma autocomplementario. Como se define en la presente descripción, un AAVr que comprende un genoma “autocomplementario” o “bicatenario” se refiere a un AAVr que se ha diseñado por ingeniería genética de manera que la región codificante del AAVr se configura para formar una plantilla de ADN bicatenario intramolecular, como se describe en McCarty et al. Los vectores de virus adenoasociado recombinante autocomplementario (AAVac) promueven una transducción eficiente independientemente de la síntesis de ADN. *Gene Therapy*. 8 (16): 1248-54 (2001). La presente descripción contempla el uso, en algunos casos, de un AAVr que comprende un genoma autocomplementario porque tras la infección (tal transducción), en lugar de esperar la síntesis mediada por células

de la segunda cadena del genoma de AAVr, las dos mitades complementarias de AAVac se asociarán para formar una unidad de ADN bicatenario (ADNbc) que está lista para la replicación y transcripción inmediatas. Se comprenderá que en lugar de la capacidad de codificación completa encontrada en AAVr (4,7-6 kb), el AAVr que comprende un genoma autocomplementario solo puede
5 contener aproximadamente la mitad de esa cantidad (=2,4 kb).

Las secuencias de longitud completa y las secuencias para genes de la cápside para los AAV más conocidos se proporcionan en la patente de los EE. UU. núm. 8.524.446, que se incorpora en la presente descripción en su totalidad.

10 Los vectores de AAV pueden comprender una secuencia de AAV silvestre o pueden comprender una o más modificaciones a una secuencia de AAV silvestre. En ciertas modalidades, un vector de AAV comprende una o más modificaciones de aminoácidos, p. ej., sustituciones, eliminaciones o inserciones, dentro de una proteína de la cápside, p. ej., VP1, VP2 y/o VP3. En
15 modalidades particulares, la modificación proporciona una inmunogenicidad reducida cuando el vector de AAV se proporciona a un sujeto.

De acuerdo con la presente descripción, el AAV usado en la presente descripción es un AAV silvestre o un AAV modificado. En algunas modalidades, el AAV usado en la presente descripción comprende una
20 proteína de la cápside que tiene al menos 95 % de identidad con la proteína de la cápside VP1, VP2 o VP3 silvestre. En algunas modalidades, el AAV usado en la presente descripción es AAV1.

De acuerdo con la presente descripción, el polinucleótido que codifica PINK1 está enlazado operativamente a un promotor. En algunas modalidades, el promotor es un promotor eucariota activo, que es capaz de promover la iniciación de la transcripción de ARN de un polinucleótido en una célula eucariota. En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de tejido, tal como un promotor capaz de conducir la expresión en una neurona en mayor medida que en una célula no neuronal. Los promotores específicos de neuronas adecuados, incluyen, sin limitación, promotores hSYNI (sinapsina humana), INA (alfa-internexina), NES (nestina), hTH (tirosina hidroxilasa humana), FOXA2 (Forkhead box A2), CaMKII (proteína quinasa dependiente de calmodulina II), Prnp (promotor de proteína prion), Hb9 y NSE (enolasa específica neuronal). En algunos casos, el promotor es un promotor ubicuo. Un “promotor ubicuo” se relaciona con un promotor que no es específico del tejido en condiciones experimentales o clínicas. El promotor ubicuo adecuado usado en la presente descripción incluye, sin limitación, CMV, CAG, UBC, PGK, EFl-alfa, EFS (forma abreviada $\alpha 1$ del factor de elongación de la traducción eucariota humana 1), SFFV (promotor del virus formador de foco del bazo), GAPDH, SV40, HBV, promotores de beta-actina de pollo y beta-actina humana.

En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica PINK1 está enlazado operativamente a un promotor hSYNI (SEQ ID NO.: 4).

SEQ ID NO.: 4

CTGCAGAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGG
ATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCA

CTGGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTAT
 CAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCA
 CTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGC
 GGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCA
 5 CTCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGC
 GTCCGCGCCGCGCCGGCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGGCG
 CGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCG
 GCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCG
 TGTCGTGCCTGAGAGCGCAG

10 En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica PINK1 está
 enlazado operativamente a un promotor CAG (SEQ ID NO.: 5).

SEQ ID NO.: 5

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTA
 GTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG
 15 GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATA
 ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
 AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG
 TGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
 GCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTAC
 20 TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTG
 AGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCC
 CCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGC
 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCG

AGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATC
 AGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGG
 CGGCGGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTG
 CGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCG
 5 CCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGC
 GGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGAC
 GGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGG
 AGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG
 TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGC
 10 TGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTG
 TCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGG
 GGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGG
 GGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCC
 CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGC
 15 GGGGCTCCGTACGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGG
 GGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCG
 GGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGC
 CGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGT
 AATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCG
 20 GAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCG
 GGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGG
 GCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCT
 CGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGC

AGGGCGGGGTTCTGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTC
 TGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAAC
 GTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTC

El vector de terapia génica recombinante descrito en la presente
 5 descripción puede comprender además uno o más elementos reguladores,
 tales como un potenciador, un intrón, una secuencia de señal de poliA y un
 elemento estabilizador del transcrito.

En algunas modalidades, el elemento estabilizador de transcripción puede
 ser una secuencia de WPRE (elemento regulador postranscripcional del virus de la
 10 hepatitis de la marmota), una secuencia de HPRE (elemento regulador
 postranscripcional de la hepatitis), una región de unión de supercóntigo, una UTR 3'
 o una UTR 5'. En algunas modalidades, el vector de terapia génica recombinante
 descrito en la presente descripción comprende tanto una UTR 5' como una UTR 3'.

Los potenciadores adecuados usados en la presente descripción
 15 incluyen, sin limitación, un potenciador de CMV, un potenciador de GAPDH, un
 potenciador de β -actina o un potenciador de EF1- α .

En algunas modalidades, el vector de terapia génica recombinante
 descrito en la presente descripción comprende una o más secuencias de
 intrones. Por ejemplo, la secuencia de intrones se puede seleccionar de una
 20 secuencia de intrón de globina de conejo, una secuencia de intrón de la β -actina
 de pollo, una secuencia de intrón sintético, o una secuencia de intrón EF1- α .

En algunas modalidades, el vector de terapia génica recombinante
 descrito en la presente descripción comprende una secuencia de señal de

poliA. Por ejemplo, la secuencia señal poliA es una secuencia señal poliA de globina de conejo, una secuencia señal poliA de hormona de crecimiento humana, una secuencia señal poliA de hormona de crecimiento bovina, una secuencia señal poliA PGK, una secuencia señal poliA SV40 o una secuencia
 5 señal poliA TK. En algunas modalidades, la secuencia señal poliA puede ser una secuencia señal poliA de la hormona del crecimiento bovina.

En algunas modalidades del vector de terapia génica recombinante descrito en la presente descripción, el casete de expresión puede comprender un polinucleótido adicional que codifica una proteína distinta de PINK1 y el
 10 PINK1 que codifica el polinucleótido y el polinucleótido adicional están enlazados por un enlazador. Los enlazadores adecuados incluyen, sin limitación, un IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) y una secuencia codificante de péptido 2A.

En diversas modalidades del vector de terapia génica recombinante descrito en la presente descripción, el casete de expresión comprende, en orden de 5' a 3':

- 15 promotor CAG y polinucleótido que codifica PINK1;
- promotor CAG, polinucleótido que codifica PINK1 y WPRE;
- promotor hTH y polinucleótido que codifica PINK1;
- promotor EF1a y polinucleótido que codifica PINK1;
- promotor EF1a, polinucleótido que codifica PINK1 y WPRE;
- 20 promotor CBA y polinucleótido que codifica PINK1; o
- promotor CBA, polinucleótido que codifica PINK1 y WPRE.

También dentro del alcance de la presente descripción, el vector de terapia génica recombinante comprende un polinucleótido variante que codifica

PINK1, en el que se presenta un nivel de expresión de PINK1 más alto. Es decir, una célula transducida con el vector expresa PINK1 a un nivel más alto en comparación con el nivel de PINK1 expresado en una célula del mismo tipo que se transduce con un vector del mismo tipo que comprende un polinucleótido silvestre que codifica PINK1.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de terapia génica recombinantes como se proporcionó anteriormente. Las células huésped ilustrativas incluyen, sin limitación, células HEK293, 293T, HeLa, Vero y Sf9.

En aun otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un polinucleótido variante que codifica PINK1 y tiene una secuencia de la SEQ ID NO.: 2 o 3 o tiene al menos aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o 3. En algunas modalidades, el polinucleótido variante tiene al menos 90 % de identidad a la SEQ ID NO.: 2 o 3. En algunas modalidades, el polinucleótido variante tiene al menos 95 % de identidad a la SEQ ID NO.: 2 o 3. En algunas modalidades, el polinucleótido variante tiene al menos 98 % de identidad a la SEQ ID NO.: 2 o 3. En algunas modalidades, el polinucleótido variante tiene al menos 99 % de identidad a la SEQ ID NO.: 2 o 3.

En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un plásmido que comprende el polinucleótido variante que codifica PINK1, como se describió anteriormente.

En aun otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para aumentar la expresión de PINK1 en células (p. ej., neuronas) en un sujeto al poner en contacto las células con el vector de terapia génica recombinante, como se proporcionó anteriormente. El método puede ponerse en práctica in vitro o in vivo, p. ej., en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto humano. En algunas modalidades, el sujeto humano está padeciendo o está en riesgo de desarrollar PD. En algunas modalidades, la PD es una PD de aparición temprana. En algunas modalidades, la PD es una PD autosómica recesiva de aparición temprana. En algunas modalidades, el sujeto humano comprende una mutación en el gen PINK1. En algunas modalidades, la neurona es una neurona positiva de tirosina hidroxilasa primaria. Como se demuestra en el Ejemplo 2, cuando los vectores de terapia génica que contienen el gen PINK1 (silvestre o variantes) se transdujeron en células HEK293T con inactivación (KO) de PINK1, se detectó la expresión de la proteína PINK1 y ARNm. Además, en comparación con las células transducidas con vectores que contienen el gen PINK 1 silvestre (SEQ ID NO.: 1), las células transducidas con vectores que contienen la variante de PINK1 GT69 (SEQ ID NO.: 2) o GT74 (SEQ ID NO.: 3) exhiben un nivel de expresión de ARNm y proteína más alto de PINK1. Además, en el Ejemplo 3, se detectó una alta funcionalidad de PINK1 en células HEK293T

con inactivación de PINK1 que se transducen con vectores que contienen la variante de PINK1 GT69 o GT74.

En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para aumentar la expresión de PINK1 en células en un sujeto. El método
5 comprende poner en contacto las células con un vector de terapia génica recombinante que comprende un polinucleótido variante que codifica PINK1, como se describió anteriormente, en donde la expresión de PINK1 en las células aumenta en relación con la expresión de PINK1 en células del mismo tipo que se ponen en contacto en las mismas condiciones con la misma cantidad de un vector
10 del mismo tipo que comprende un polinucleótido silvestre que codifica PINK1.

En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para inhibir, reducir, o retrasar la degeneración o la muerte de las neuronas al poner en contacto las neuronas con el vector de terapia génica recombinante, como se proporcionó anteriormente. El método puede ponerse en práctica in
15 vitro o in vivo, p. ej., en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto humano. En algunas modalidades, el sujeto humano está padeciendo o está en riesgo de desarrollar PD. En algunas modalidades, la PD es una PD de aparición temprana. En algunas modalidades, la PD es una PD autosómica recesiva de aparición temprana. En algunas modalidades, el sujeto
20 humano comprende una mutación en el gen PINK1. En algunas modalidades, la neurona es una neurona positiva de tirosina hidroxilasa primaria. En algunas modalidades, se atenúa la neurodegeneración inducida por MPP+ (1-metil-4-fenilpiridinio). En algunas modalidades, se evita la pérdida de neuronas inducida

por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). Como se demuestra en los Ejemplos 4-5, las neuronas corticales transducidas con vectores que contienen variantes de PINK1 (GT69 o GT74) exhiben un nivel reducido de liberación de LDH en comparación con las células no transducidas.

5 La administración del vector de terapia génica recombinante o composiciones que comprenden el vector de terapia génica recombinante puede ser por vías estándar en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, inyección sistémica, local, directa, administración parenteral, intravenosa, cerebral, cefalorraquídeo, intratecal, intracisternal, intraputamina, intrahipocámpal, intranigal, 10 intraestriatal o intracereventricular. En algunos casos, la administración comprende inyección intravenosa, cerebral, cefalorraquídea, intratecal, intracisternal, intraputamina, intrahipocámpal, intraestriatal o intracerebroventricular.

 En algunas modalidades, la descripción proporciona la administración local y la administración sistémica de una cantidad terapéuticamente efectiva del vector de 15 terapia génica recombinante descrito en la presente descripción. Por ejemplo, la administración sistémica puede ser la administración en el sistema circulatorio de modo que todo el cuerpo se vea afectado. La administración sistémica incluye administración enteral, tal como absorción a través del tracto gastrointestinal y administración parenteral a través de una inyección, infusión o implantación.

20 En algunas modalidades, la administración real del vector de terapia génica recombinante descrito en la presente descripción se puede lograr mediante cualquier método físico que transporte el vector al tejido diana de un sujeto. Las vías de administración adecuadas incluyen, entre otras, inyección en

el sistema nervioso central (SNC) o líquido cefalorraquídeo (LCR) y/o directamente en el cerebro.

Las proteínas cápside de un vector de terapia génica recombinante pueden modificarse de manera que el vector se dirija a un tejido diana particular de interés, tal como neuronas o más particularmente una neurona dopaminérgica. Ver, por ejemplo, Albert et al. AAV Vector-Mediated Gene Delivery to Substantia Nigra Dopamine Neurons: Implications for Gene Therapy and Disease Models. Genes. 8 de febrero de 2017; ver también, la patente de los EE. UU. núm. 6.180.613 y la publicación de patentes de los EE. UU. núm. US20120082650A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En algunas modalidades, el vector de terapia génica recombinante se inyecta directamente en la sustancia negra del sujeto.

Para fines de administración, p. ej., mediante inyección, se pueden emplear diversas soluciones, tales como soluciones acuosas estériles. Tales soluciones acuosas pueden regularse, si se desea, y hacer primero que el diluyente líquido sea isotónico con solución salina o glucosa. Las soluciones del vector como un ácido libre (ADN contiene grupos fosfato ácidos) o se puede preparar una sal farmacológicamente aceptable en agua adecuadamente mezclada con un surfactante tal como hidroxipropilcelulosa. También se puede preparar una dispersión del vector en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. En este

sentido, los medios acuosos estériles empleados son fácilmente obtenibles mediante técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen, pero no se limitan a, soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la
5 preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma es estéril y debe ser fluida en la medida que sea fácil de inyectar. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a las acciones contaminantes de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que
10 contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y lo similar), mezclas adecuadas de estos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de surfactantes.
15 La prevención de la acción de los microorganismos puede producirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y lo similar. En muchos casos, se prefiere incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso de agentes
20 retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando un vector de terapia génica recombinante en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea

necesario, seguido de esterilización por filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la
5 preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación deseables son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución previamente esterilizada por filtrado de esta.

La transducción con el vector de terapia génica recombinante también
10 se puede llevar a cabo in vitro. En una modalidad, las células diana deseadas se eliminan del sujeto, se transducen con el vector de terapia génica recombinante y se reintroducen en el sujeto.

Los métodos adecuados para la transducción y reintroducción de células transducidas en un sujeto son conocidos en la técnica. En una modalidad, las
15 células se pueden transducir in vitro combinando el vector de terapia génica recombinantes con células, p. ej., en medios apropiados, y la evaluación para aquellas células que albergan el ADN de interés usando técnicas convencionales tales como transferencia Southern y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. Las células transducidas se pueden formular luego en composiciones
20 farmacéuticas, y la composición se introduce en el sujeto mediante diversas técnicas, tales como por administración sistémica, local, inyección directa, parenteral, intravenosa, cerebral, cefalorraquídeo, intratecal, intracisternal, intraputamina, intranigral, intrahipocampo, intraestriado o intracerebroventricular.

En algunos casos, la administración comprende inyección intravenosa, cerebral, cefalorraquídea, intratecal, intracisternal, intraputamina, intrahipocámpica, intraestriatal o intracerebroventricular. La administración puede realizarse mediante inyección intratecal con la inclinación de Trendelenburg.

5 La transducción de células con el vector de terapia génica recombinante descrito en la presente descripción da como resultado una expresión sostenida o aumentada de PINK1. Por lo tanto, en la presente descripción se proporcionan métodos para administrar o administrar vectores de terapia génica recombinantes que expresan PINK1 a un sujeto mamífero, preferentemente, un
10 ser humano. Estos métodos incluyen la transducción de tejidos (incluidos, entre otros, los tejidos del cerebro) con el vector de terapia génica recombinante descrito en la presente descripción. La transducción se puede llevar a cabo con casetes de expresión génica que comprenden elementos de control específicos de tejido. Por ejemplo, en una modalidad, la transducción de células neuronales y tejidos cerebrales está dirigida por elementos de control específicos de
15 neuronas, que incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de promotores enriquecidos con neuronas y otros elementos de control.

 En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un vector de terapia génica recombinante que comprende un polinucleótido variante que
20 codifica PINK1, en donde una célula transducida con el vector expresa PINK1 a un nivel más alto en comparación con el nivel de PINK1 expresado en una célula del mismo tipo que se transduce con un vector del mismo tipo que comprende un polinucleótido silvestre que codifica PINK1.

En algunas modalidades, las células se ponen en contacto con el vector de terapia génica recombinante que comprende el polinucleótido variante que codifica PINK1, lo que aumenta la expresión de PINK1 en las células en relación con la expresión de PINK1 en células del mismo tipo que se ponen en contacto en las mismas condiciones con la misma cantidad de un vector del mismo tipo que comprende un polinucleótido silvestre que codifica PINK1.

En algunas modalidades, las neuronas de un sujeto se ponen en contacto con los vectores de terapia génica recombinante que comprenden el polinucleótido variante que codifica PINK1, lo que aumenta la expresión de PINK1 en las neuronas en relación con la expresión de PINK1 en neuronas del mismo tipo que se ponen en contacto en las mismas condiciones con la misma cantidad de un vector del mismo tipo que comprende un polinucleótido silvestre que codifica PINK1 y de esta manera inhibe, reduce o retrasa la disfunción/degeneración o muerte de neuronas en el sujeto.

En algunas modalidades, la variante de polinucleótido y/o el polinucleótido silvestre se enlaza operativamente a un promotor.

En algunas modalidades, los vectores son virus adenoasociados (AAV).

En algunas modalidades, PINK1 se expresa al menos aproximadamente 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2 veces más alto por células o neuronas en contacto o transducidas con el vector que comprende el polinucleótido variante que codifica PINK1 en comparación con las células o neuronas que se ponen en contacto o transducidas con el vector que comprende el polinucleótido silvestre que codifica PINK1.

En algunas modalidades, el polinucleótido variante que codifica PINK1 tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 % o al menos aproximadamente 90 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

5 En algunas modalidades, las células son neuronas, que pueden seleccionarse de neuronas corticales, células ependimales, neuronas glutamatérgica, neuronas gabaérgicas, neuronas dopaminérgicas, oligodendrocitos, astrocitos y células microgliales.

10 En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para inhibir, reducir o retrasar la degeneración o muerte de neuronas en un sujeto, en donde el método comprende poner en contacto las neuronas con una cantidad de vector de terapia génica recombinante que comprende un polinucleótido que codifica PINK1, en donde la cantidad de vector es una cantidad efectiva para inhibir, reducir o retrasar la degeneración o muerte de neuronas en el sujeto.

15 En algunas modalidades, las neuronas se ponen en contacto con una cantidad de vector correspondiente a una multiplicidad de infección (MOI) de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10^5 , o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 10^4 , o aproximadamente 1, o aproximadamente 10, o aproximadamente 10^1 , o aproximadamente 10^2 , o aproximadamente 10^3 , o
20 aproximadamente 10^4 , o aproximadamente 10^5 .

En algunas modalidades, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

En algunas modalidades, el polinucleótido es un polinucleótido variante que codifica PINK1. Y el polinucleótido variante que codifica PINK1 tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 % o al menos aproximadamente 90 % de identidad con la SEQ ID NO.: 2 o la SEQ ID NO.: 3.

En algunas modalidades, los vectores son virus adenoasociados (AAV).

En algunas modalidades, las células son neuronas. Y las neuronas pueden seleccionarse de neuronas corticales, células ependimales, neuronas glutamatérgica, neuronas gabaérgicas, neuronas dopaminérgicas, oligodendrocitos, astrocitos y células microgliales.

EJEMPLOS

Los expertos en la técnica apreciarán que puedan hacerse cambios en las modalidades descritas anteriormente sin apartarse del amplio concepto de la invención de estas. Se entenderá, por lo tanto, que esta invención no se limita a las modalidades particulares descritas, sino que cubre modificaciones dentro del espíritu y alcance de la presente invención tal como se define en la presente descripción. Y está bien establecido que el objeto descrito y reivindicado en la presente descripción debe verse e interpretarse al momento de presentar esta solicitud de patente.

Ejemplo 1: Diseño de variantes del gen PINK1 humano

Dieciséis (16) variantes de genes PINK1 humanos se diseñaron usando varios algoritmos de diseño (ver la Tabla 1) y se clonaron en el vector AAV1 (con GT0065 que es PINK1 silvestre (PINK 1 silvestre)).

Tabla 1

ID del vector	SEQ ID NO.	% de identidad con PINK1 silvestre	Contenido % de GC
GT0065	1	100 %	63
GT0066	-	80 %	63
GT0067	6	80 %	63
GT0068	-	79 %	65
GT0069	2	78 %	59
GT0070	-	76 %	56
GT0071	-	76 %	56
GT0072	-	77 %	60
GT0073	-	77 %	60
GT0074	3	78 %	61
GT0075	-	82 %	73
GT0076	-	81 %	68
GT0077	7	78 %	63
GT0078	-	74 %	55
GT0079	8	74 %	55
GT0080	-	75 %	55
GT0081	-	75 %	54

5

SEQ ID NO.: 6

atggccgtgcggcaggccctgggcccggggcctgcagctgggcagagccctgctgctgcgggtcaccg
gaaacctggcagagcctacggcctgggcagacctggcccagccgcccggctgcgtgaggggagaa
agacccggatgggctgccggcccaggagccgagcctagaagggtgggcctgggcctgcctaacag

actgcggttctccggcaatccgtggccggactcgccgctagactgcagagacaatttggtgcggggcc
 tggggatgcgccggcccttgccggccggcggtgttctggcctttggcctgggactgggcctgatcgagg
 aaaagcaggcagaatcccgagagccgtgtctgcttgccaggagatccaggccatcttcacccagaa
 gagcaaacctggccccgatcctctggacaccagacggctgcagggcttcagactggaagagtacctg
 5 attggacagtctatcggaagggctgtagcgccgctgtctatgaggccacgatgcctacactgccacag
 aacctggaagtgacaaagagcaccggcctgtgcccgggaagaggtcctggaacatctgctcctggcg
 agggacaggagagagagccccctggcgcccctgtttccctctggctatcaagatgatgtggaacatcagc
 gccggctcctcttgaagccatcctgaacacaatgagccaggagctggtgccgccagcaggggtgc
 cctggctggagagtacggcgctgtgacatacagaaagtccaagcggggacccaagcagctggcccc
 10 ccaccctaatatcatcagagtgtgagagccttcaccagcagcgtgcctctgctgcctggcgccctggtg
 gactaccctgatgtgctgcctagccggctccatcctgaaggcctggggccacggccggaccctgttcctgg
 tgatgaagaactaccctgcaccctcagacagtacctgtgctgaacaccctagccccagactggcc
 gctatgatgtgctgcagctgctggaaggcgtggatcacctggtgcagcagggcatgcccacagaga
 tctgaagagcgacaacatcctggtggaacttgaccctgacggctgtccttggtggtaatcgccgacttc
 15 ggctgttctgctggccgacgagagcatcggcctacagctgccattcagctcttggtacgtggacagagggc
 ggcaacggctgcctgatggcccctgaggtgtccaccgccagacctggccccagagccgtgattgacta
 cagcaaggccgatgcctgggcccgtggcgccatcgccctacgagatcttcggcctggtcaacccttcta
 cggccagggcaaggctcacctggaaagcagaagctaccaggaggccagctgcccgcctgcctg
 agagtgtgccacctgacgtgcgccaactcgtcagagccctgctgcaaagagaggccagcaaaaagac
 20 ccagcgcccgtgtggccgccaatgtgctgcacctttctgtggggcgaaacacatcctggccctgaaaa
 acctcaagctggacaagatggtgggctggctgctgcagcaaagcgccgcgaccctgctggctaatag
 actgaccgagaagtgtgctggtgaaaccaagatgaaaatgctgtttctggccaacctggagtgcgaga
 cactgtgtcaggcagccctgctgctgtgcagctggcgggccgcccctt

SEQ ID NO.: 7

atggctgtccgccaagccttagggagagggctgcagctgggcagagcgctcttgctgaggttcaccg
gaaagcccggacgcgcttacggcctcggaaggccaggtcctgcagcgggttgctgaggggaa
cggcctggttgggcagcaggaccaggagccgagccacggagagtgggactcggcctgcctaacc
5 gctccgcttctccggcaaagcggtggccggtcttgccgcacggcttcagcgccagttcgtggtccggg
cttgggggttgccggaccttgtagggcgggcggttctggccttcggactgggctgggactaatcga
ggaaaagcaggccgaatcccggagagcgggtgcagcgtgccaggaaatccaggccatattcaccc
agaagtccaagccgggaccagaccactggacactaggcggctgcagggcttcgggtcagga
atacctcatcgccagtcattggcaaaggttggtcgcccgctgtacgaggccaccatgccaccc
10 tgccgcaaaacctggaagtgaccaagtccactgggcttctgcccggaagaggacccgggacttctg
ccccgggagaaggacaggagcgggctcctggagcaccgcggttccgctggccattaagatgatgt
ggaacatctcgccggttcagctccgaggccatcctgaacacgatgtcccaagagctggtgccggc
gtcaagagtcgccttggtggagaatacggcgccgtgacctaccgcaaatccaagcgcggccga
aacagctggcgccacaccctaacatcatcagagtgtgcgcgcgttcacctcctccgtgcccctgcttc
15 ctggcgctctggtggactatccggacgtgctcccgctcagactgcaccccgaagggttggggcatgg
acgcaccctgttctggtcatgaagaactaccctgcactctgcggcagtatctgtgcgtcaacacccc
gtcacctcgccttgccgcgatgatgctgctccaactgctggaaggagtggaccacttggtgcagcagg
gtatcgcccaccgggatctcaagtccgacaacattctggtggagcttgatcccgatggatgccctggc
tggtcatcgccgacttcgggtgctgctgggtgacgaaagcatcggactccagttgccgttctcgtcttgg
20 tacgtggatcggggcggaatggctgtctgatggccccgaagtctccactgcacgccctggacct
gggccgtgattgactactgaaggccgatgcatgggccgtcggagccatgcctacgagatttccggc
ttggtgaacccgttctacggccaagggaaggccacctggaaagcaggagctaccaggaggccca
attgcccgcccttctgagtccgtgccgcctgacgtgcgacagctcgtgcgcgcactcctgcaacggg

aggcctcgaagaggccgtcagctagggctggccgcgaacgtgctgcatctgtcgctgtggggggaac
 acattctggccctgaagaacctcaagctcgacaagatggctcggctggctgctgcagcaatccgcggc
 cactctgctcgccaatcggctgaccgagaagtgtgctggaacccaagatgaagatgctgtttctcg
 ccaacctggagtgcgaaacactgtgccaggctgccctgctgctctgctcctggagagccgcgctg

5

SEQ ID NO.: 8

atggcggtcaggcaagcactgggtcgaggactgcagctcggctcgggctcttcttttcggtttaccggt
 aaacccggtcgggcatacgggctgggacgacccggacctgccgctggatgtgttagaggggaga
 ggccgggttggcagccggacccggagcagagccaagaagagtgggtctgggactgcccaacc
 gactcaggttttcaggcagctctgtagcagggtggcagctaggctgcaaagacaattcgtggtacgg
 gcgtggggatgcgccgggcatgtggtcgggcggctcttttggccttcggctctggggctcggttgatc

10

gaggagaaacaagctgagtcgccgaagagcggatctgctgtcaagagatacaggccatattcac
 gcaaaaatcaaagccaggctccgaccccttggacactaggagactgcaaggattccgcctcgaag
 agtatctgatcggtaaatcaataggaaaagggtgttcagctgctgtgtatgaagctacgatgcctaccc
 tgcccaaaaatctcgaagtaacgaagtaaccggattgttgccagggcgagggccaggcacttctg

15

cacctggggaagggcaagagagggcaccgggtgcaccggcattccccctcgcaattaaaatgat
 gtggaacatatctgccggctcttcagcgaggcaatattgaacacaatgtctcaggaactgtgcccg
 ctagtgcgtagcacttgccggcgaatatggtgctgtaacttatagaaaaagcaaaagggggccaa
 agcagctggcgccgcacccaacatcataagggcttgcgagcgttcactcaagcgtgcctcttcttc
 ctggagcgcttgctgattatcccgatgtcttgccgtcccgattgcaccagagggctcggtcacggac

20

gaacgctgttcttggtgatgaaaaactacccttgactctgcgacaatactgtgtgtcaacacgccctc
 tcctcgattggcagcgatgatgcttctccaactcttgaggagtggaaccatttggtccagcagggaat
 cgcgcatcgggaccttaagtcagacaacatattggtagaactcgatccgatggttgcccctggctc
 gtgatcgcggattttgggtgctgcttggcagacgaatcaataggactgcaattgccgttttctagttggt

atgtcgataggggtgggaacgggtgcttgatggcaccgaagtgtctacggcgcgacccggccca
 cgagcagttattgattactcaaaggcggtgctgggctgtcggcgctattgcatacgaaatcttcgg
 cctcgtgaaccctttctatgggcaaggaaaagcgcaccttgaatccagaagttaccaagaagcgca
 gttgcctgcgctcccagagagcgctacctccagatgtagacagctcgtacgggcactgcttcagaga
 5 gaggcgagcaaaagaccatccgcaaggggtgccgccaatgtgtgcatctgtcctgtggggagag
 catatcttggcccttaagaatctgaagctggataaaatggtaggatggctcttgaacaatctgcggc
 aacgcttctggctaataaggctgacagaaaaatgctgcgtagagacaaaaatgaagatgttgtcctc
 gccaaccttgagtgcgaaacgctctgtcaagcggcattgctcttgtgtagctggagagcagctctt

Ejemplo 2: Cribado para expresión de proteínas

10 Se generaron plásmidos CIS de AAV1 para PINK1 silvestre (GT65) y
 todas las 16 variantes PINK1 (GT66-GT81). Luego, los plásmidos se probaron
 en células (HEK) 293T de riñón embrionario humano con inactivación (KO) de
 PINK1 para determinar la expresión de proteínas y ARNm. La Figura 1A
 muestra los niveles de proteína PINK1 relativos para 6 constructos de variantes
 15 de PINK1 representativas en células HEK293T con inactivación de PINK1. Las
 células HEK293T con inactivación de PINK1 se cultivaron a las mismas
 densidades celulares durante 24 horas. Al día siguiente, estas células se
 trataron con ADN plasmídico que contenía 6 variantes de PINK1 diferentes a
 una concentración de 0,3 microgramo y 1 microgramo. Las células tratadas se
 20 incubaron durante 48 horas y se recolectaron para la estimación de proteínas
 usando transferencia Western. Específicamente, las células se lisaron y el
 lisado se sometió a electroforesis para separar las proteínas por tamaño y
 carga. Después, las proteínas separadas se consultaron con anticuerpos

específicos para la proteína PINK1 y se detectaron por medio de autorradiografía. Se usó una proteína constitutiva, concretamente actina, como control interno para normalizar los niveles de proteína en las muestras. Las bandas de proteína PINK1 y actina se midieron para determinar la intensidad usando un software de formación de imágenes y se representaron como se muestra en la Figura 1B. La Figura 1B muestra un análisis representativo de transferencia Western de los 16 constructos de variantes de PINK1 que se sobreexpresaron en células HEK293T con inactivación de PINK1. El gráfico representa el enriquecimiento relativo de la proteína PINK1 en comparación con GT65 (PINK1 silvestre) y se representa en un orden creciente de expresión. El experimento se repitió tres veces. El análisis estadístico se realizó en el software GraphPad Prism (ANOVA unilateral, $p < 0,0001$).

Ejemplo 3: Ensayo funcional de variantes PINK1 seleccionadas. Este conjunto de datos muestra que los plásmidos CIS de AAV1 seleccionados de los datos de expresión anteriores son funcionales dentro de las células que los expresan. La Figura 2A muestra imágenes representativas de células HEK293T silvestres y con inactivación de PINK1 que se trataron con el vehículo DMSO o fármaco de Valinomicina antes y después de sobreexpresar AAV1-PINK1. La valinomicina es un factor estresante mitofágico que causa que la proteína PINK1 se estabilice sobre la superficie de las mitocondrias desencadenando una modificación específica de PINK1 en otra proteína llamada ubiquitina. Esta modificación, denominada pS65-Ub puede detectarse mediante inmunocitoquímica (Figura 2A) y mediante el ensayo de descubrimiento de

Mesoscale (MSD, Figura 2B) de pS65-Ub y es una lectura directa para la función de PINK1. Ambas células HEK293T silvestres y con inactivación que sobreexpresan AAV1-PINK1 muestran una señal de pS65-Ub muy fuerte después del tratamiento con Valinomicina (último panel) en comparación con el DMSO (primer y tercer panel) o niveles de fondo (segundo panel). La sobreexpresión de las variantes de PINK1 se realizó como se describió anteriormente.

Cinco (5) variantes de PINK1 seleccionadas (GT67, GT69, GT74, GT77, y GT79), junto con PINK1 silvestre (GT65) se probaron adicionalmente en un ensayo funcional de PINK1 específico que mide la fosforilación de PINK1 de ubiquitina en serina-65 (p-S65-Ub) después de la inducción de estrés mitofágico con valinomicina. La Figura 2B muestra datos representativos del ensayo de MSD pS65-Ub en las HEK293T de PINK1 silvestre y con inactivación de PINK1 que sobreexpresan las 5 variantes de PINK1 (GT67, GT69, GT74, GT77, y GT79) en comparación con el PINK1 silvestre (GT0065). Las barras azules representan los niveles de pS65-Ub en condiciones normales o sin estrés, mientras que las barras rojas muestran los niveles estabilizados de pS65-Ub como una respuesta a la sobreexpresión y función de PINK1.

Ejemplo 4: Evaluaciones de supervivencia neuronal

Se realizaron experimentos de rescate de neurotoxina en cultivos neuronales primarios. Los ensayos de liberación de LDH miden la citotoxicidad en neuronas corticales transducidas con vectores AAV1-PINK1. En la presente descripción se muestran las cantidades de LDH liberadas en el medio para los vectores que contienen una de las 5 variantes de PINK1 seleccionadas en

comparación con el vector de PINK1 silvestre (“GT65”) después de que los cultivos neuronales se expusieron con MPP+ (500 μ M) a los 7 días después de la transducción a las MOI indicadas. Las cortezas embrionarias de rata del día 18 (E18) se disociaron usando un protocolo estándar y se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con PDL y se incubaron a 37 °C durante 7 días. Las neuronas E18 se transdujeron después con un vector AAV1 que contenía una de las 5 variantes de PINK1 o PINK1 silvestre a tasas de multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) que variaban de 10 a 10^4 genomas virales por célula. Las células se incubaron durante otros 7 días y se recolectó una alícuota de medio como control previo al tratamiento de todos los pocillos. Se añadió la neurotoxina MPP+ a una concentración de 500 μ M y las células se incubaron con la toxina durante 24 horas. El medio que contiene LDH (liberado debido a la muerte celular) se recolectó después del tratamiento con MPP+ y los niveles de LDH se midieron para las condiciones anteriores y posteriores al tratamiento usando un ensayo colorimétrico disponible comercialmente. El gráfico representa la cantidad de LDH liberada de las diversas condiciones de tratamiento tal cual se especifica en el eje X para GT67 (Figura 3A), GT69 (Figura 3B), GT74 (Figura 3C), GT77 (Figura 3D) y GT79 (Figura 3E). AAV1.rPINK1 (rPINK1=Rata PINK1; MOI= 10^4) es el control positivo que muestra un rescate de muerte celular, es decir, menos LDH liberada en comparación con el control (primeras dos barras). En las Figuras 3A y 3B, los controles eran neuronas corticales de rata transducidas con el vector AAV1 vacío, mientras que en las Figuras 3C, 3D y 3E, los controles eran

neuronas corticales no transducidas. Solamente GT 69 (Figura 3B) y GT74 (Figura 3C) mostraron un efecto similar al control positivo a MOI más bajas.

Ejemplo 5: Reproducibilidad lote a lote de los efectos de GT69 y GT74 en la supervivencia neuronal

Los vectores de AAV1 que contienen GT69 y GT74 se realizaron justo así en la transducción de neuronas y atenuando la muerte celular después de una exposición a toxinas, lo que sugiere la reproducibilidad en los sitios de producción con estas secuencias. La Figura 4 muestra ensayos de liberación de LDH para medir la citotoxicidad como se describió anteriormente en neuronas corticales primarias transducidas con GT69 o GT74 a las MOI indicadas. Los resultados estadísticos de ANOVA unilateral se indican con *.

Ejemplo 6: Expresión de PINK1 in vivo en rata

La expresión de PINK1 in vivo robusta se logra después de la inyección directa en el cerebro de rata silvestre de AAV que codifica los tres constructos (Figura 5). Las ratas silvestres adultas se inyectaron estereotáxicamente directamente en sus cerebros con 6e9 GC de GT65 (A), GT69 (B) o GT74 (C) en un volumen fijo de 4 μ L por inyección (n=4 por vector). 3 semanas después, los cerebros se recolectaron y procesaron para hibridación in situ (ISH) para determinar los niveles de ARNm de PINK1 humanos (imágenes superiores) e inmunohistoquímica (imágenes inferiores). Las imágenes representativas del corte del cerebro coronal completo para el hemisferio inyectado se muestran a la izquierda (barra de escala = 1 mm), y se amplían en imágenes en la porción en recuadro roja-delineada a la derecha (barra de escala = 100 μ M). (D) Este

método de IHC se ha optimizado para detectar solo PINK1 humana, por lo que no se detecta ninguna señal en ratas silvestres no inyectadas. Además, las Figuras 6 y 7 son resultados de transferencia western y de qPCR, respectivamente, de muestras de cuerpo estriado. Estos muestran que GT69 y GT74 son tan buenos como o mejores que GT65 para inducir la expresión de la proteína PINK1 humana en el cuerpo estriado de rata silvestre.

Se ha conocido que a los 12 meses de edad, los ratones con inactivación de Pink1 han aumentado los niveles de dopamina (DA) en el cuerpo estriado en relación con los controles para silvestre (comparar las barras grises a cuadros con las sólidas en las Figuras 8A y 8B). Se cree que esto es el resultado de la compensación presináptica que resulta del daño nigroestriado. El tratamiento con todas las dosis probadas de GT69 resultó en niveles de dopamina significativamente diferentes que los controles con inactivación de PINK1 sin ningún tratamiento de AAV a los 6 meses posteriores a la inyección (Figura 8B), mientras que el vector AAV1.wPINK1 (GT65) en niveles de dosis coincidentes no redujo significativamente los niveles aumentados de DA del cuerpo estriado más cerca de los niveles de control silvestres (Figura 8A), aunque hubo una tendencia no significativa hacia la corrección a la dosis más alta probada. Estos demuestran que GT69 normaliza los niveles de dopamina en muestras estriatales de ratas con inactivación de PINK1.

Además, GT69 rescató la pérdida de TH a una dosis más baja que GT65 en muestras de mesencéfalo de rata con inactivación de PINK1. La tirosina hidroxilasa (TH) es un marcador de neuronas dopaminérgicas. En ratas con

inactivación de Pink1 a los 12 meses de edad, la dosis efectiva mínima que dio como resultado un aumento significativo en los niveles de TH del mesencéfalo fue 5 e9 vg para GT65, mientras que GT69 rescata la pérdida de TH en la dosis 2e9. Se obtuvieron resultados similares mediante espectrometría de masas (Figura 9A) y transferencia western (Figura 9B).

Ejemplo 7: Habilidades motoras

Las Figuras 10A-10D muestran mapas de trayectoria de ratas silvestres, ratas con inactivación de PINK1 o ratas con inactivación de PINK1 transducidas con AAV que contienen gen PINK1 silvestre (GT65) o gen PINK1 variante (GT69). Las Figuras 10E-10G muestran gráficos que muestran los cambios de la habilidad motora para ratas con inactivación de PINK1 después de la transducción con AAV que contiene el gen PINK1 silvestre (GT65) o gen PINK1 variante (GT69).

Ejemplo 8: Expresión de PINK1 in vivo en el cerebro canino

En este ejemplo, se administró una única inyección del vector AAV1 que contenía GT69 en la sustancia negra del cerebro canino, lo que da como resultado una expresión transgénica de hPINK1 robusta en esa región. Como se muestra en la Figura 11, la hibridación in situ (ISH) e inmunohistoquímica (IHC) para el ARNm y la proteína de hPINK1 y la tirosina hidroxilasa (TH) de canino confirmaron el patrón de transducción deseado en el cerebro del perro. Estas imágenes son imágenes representativas de secciones del mesencéfalo canino (rep. 1 de 6) a 1 semana después de la inyección con GT69 (1e10 vg en 20 µl).