



# **ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ AAV, КОДИРУЮЩИЕ ПАРКИН, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Ссылка на родственные заявки**

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с § 119(e) раздела 35 Кодекса США (35 U.S.C.) предварительной заявки США с серийным номером 63/060353, поданной 3 августа 2020 г., озаглавленной «AAV VECTORS ENCODING PARKIN AND USES THEREOF», полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

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

Паркин (PRKN) представляет собой E3 убиквитинлигазу, которая опосредует клиренс поврежденных митохондрий из клеток, а также играет роль в выживании клеток путем подавления апоптоза. Было обнаружено, что мутации в PRKN вызывают митохондриальную дисфункцию и приводят к гибели нейронов, болезни Паркинсона (PD) и опухолеобразованию.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Аспекты настоящего раскрытия относятся к композициям и способам доставки трансгена субъекту. Настоящее раскрытие частично основано на экспрессионных конструкциях (например, векторах), выполненных с возможностью экспрессии человеческого белка паркин (PRKN), кодируемого кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионные конструкции, описанные в настоящем документе, уменьшают один или несколько признаков или симптомов заболевания ЦНС (например, болезни Паркинсона) при введении субъекту.

Соответственно, согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие основано выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей экспрессионную конструкцию, кодирующую человеческий белок паркин, причем человеческий белок паркин кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления человеческий белок паркин содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, или ее часть. Согласно некоторым вариантам осуществления кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая человеческий белок, содержит

последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 3. Согласно некоторым вариантам осуществления, кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную под SEQ ID NO: 4.

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция дополнительно содержит промотор, функционально связанный с кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифичный промотор. Согласно некоторым вариантам осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина кур (CBA), промотор CAG или промотор JeT.

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). Согласно некоторым вариантам осуществления ITR AAV относятся к серотипу, выбранному из группы, состоящей из ITR AAV1, ITR AAV2, ITR AAV3, ITR AAV4, ITR AAV5 и ITR AAV6. Согласно некоторым вариантам осуществления ITR AAV представляют собой ITR AAV2.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой плазмиду. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного AAV (rAAV) или вектор на основе бакуловируса.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, дрожжевую клетку, бактериальную клетку или клетку насекомого. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой человеческую клетку.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу (rAAV), содержащему: (i) капсидный белок; и (ii) выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок способен проникать через барьер между кровью и головным мозгом. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок представляет собой капсидный белок AAV9 или его вариант. Согласно

некоторым вариантам осуществления гAAV трансдуцирует нейронные клетки и/или ненеуронные клетки центральной нервной системы (ЦНС).

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, вектор, клетку-хозяин или гAAV, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к способу доставки трансгена в клетки центральной нервной системы, причем данный способ предусматривает введение экспрессионной конструкции (например, гAAV), описанной в настоящем документе, субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления введение представляет собой прямую инъекцию в ткань ЦНС. Согласно некоторым вариантам осуществления введение представляет собой периферическое введение. Согласно некоторым вариантам осуществления периферическое введение представляет собой внутривенную инъекцию.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие болезни Паркинсона, причем данный способ предусматривает введение субъекту выделенной нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина, гAAV или композиции, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления введение предусматривает прямую инъекцию в ЦНС субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция представляет собой интрацеребральную инъекцию, интрапаренхиматозную инъекцию, интратекальную инъекцию, инъекцию в большую цистерну (ICM) или любую их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта предусматривает конвекционную доставку (CED). Согласно некоторым вариантам осуществления введение предусматривает периферическую инъекцию, причем, необязательно, периферическая инъекция представляет собой внутривенную инъекцию.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет мутацию в гене PRKN. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация в гене PRKN содержит замену, делецию, вставку нуклеотидов или мутацию сайта сплайсинга.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащему нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' к 3': 5' ITR AAV; энхансер CMV; промотор CBA; трансген, кодирующий белок PRKN, причем белок PRKN кодируется последовательностью

нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 2 или 3; WPRE; сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста; и 3' ITR AAV.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу (rAAV), содержащему капсидный белок AAV; и вектор на основе rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' к 3': 5' ITR AAV; энхансер CMV; промотор CBA; трансген, кодирующий белок PRKN, причем белок PRKN кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 2 или 3; WPRE; сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста; и 3' ITR AAV.

Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV9.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к плазмиде, содержащей вектор на основе rAAV, как описано в настоящем документе.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к вектору на основе бакуловируса, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 3.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к клетке, содержащей первый вектор, кодирующий один или несколько гер-белков аденоассоциированного вируса и/или один или несколько сар-белков аденоассоциированного вируса; и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 3.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый вектор представляет собой плазмиду и второй вектор представляет собой плазмиду. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку HEK293.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый вектор представляет собой вектор на основе бакуловируса и второй вектор представляет собой вектор на основе бакуловируса. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой клетку насекомого. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка насекомого представляет собой клетку SF9.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к способу получения rAAV, причем данный способ предусматривает доставку в клетку первого вектора, кодирующего один или несколько гер-белков аденоассоциированного вируса и/или один или несколько сар-белков аденоассоциированного вируса, и вектора на основе рекомбинантного AAV, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:

2 или 3; культивирование клеток в условиях, обеспечивающих упаковку гAAV; и сбор культивируемых клеток-хозяев или культуральной среды для сбора гAAV.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие болезни Паркинсона, причем данный способ предусматривает введение субъекту гAAV, как описано в настоящем документе.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой млекопитающее, не являющееся человеком. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является субъектом-человеком.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к способу коррекции митохондриальной дисфункции в клетке, причем данный способ содержит приведение клетки в контакт с выделенной нуклеиновой кислотой, вектором или гAAV, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления приведение в контакт содержит приведение клетки в контакт с некоторым количеством выделенной нуклеиновой кислоты, вектора или гAAV в количестве, достаточном для снижения окислительного стресса в клетке и/или усиления митофагии в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой человеческую клетку. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка содержит одну или несколько мутаций, вставок или делеций в гене *PRKN*. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой человеческую клетку *in vitro*. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка находится в субъекте. Согласно некоторым вариантам осуществления стадию приведения клетки в субъекте в контакт осуществляют путем введения субъекту выделенной нуклеиновой кислоты, вектора или гAAV, как описано в настоящем документе, любым подходящим путем (например, с помощью одного или нескольких из путей введения, описанных в настоящем документе). Согласно некоторым вариантам осуществления после приведения в контакт митохондриальная дисфункция

снижается в клетке по меньшей мере на 1% (например, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, на 10-25%, на 25-50%, на 50-75%, на 75-90% или более чем на 90%) по отношению к митохондриальной дисфункции в клетке до приведения в контакт.

### **Краткое описание фигур**

На фиг. 1 приведено схематическое изображение одного варианта осуществления плазмиды, содержащей кодирующий человеческий паркин вектор на основе gAAV, как описано в настоящем раскрытии.

На фиг. 2A-2B показаны уровни экспрессии иРНК и белка в клетках HeLa, трансфицированных векторами с кодон-оптимизированной нуклеиновой кислотой паркин optParkA и optParkB. На фиг. 2A показана экспрессия иРНК. На фиг. 2B показана экспрессия белков optParkA и opt ParkB в трансфицированных клетках.

На фиг. 3 показана локализация белка optParkB в трансфицированных клетках HeLa.

На фиг. 4A-4B показан анализ митохондриального стресса на клетках HeLa, трансфицированных optParkB. На фиг. 4A показана схема анализа. На фиг. 4B показаны результаты анализа *in vitro* после введения менадиона.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Настоящее раскрытие частично основано на композициях и способах экспрессии одного или нескольких генных продуктов (например, генных продуктов, ассоциированных с заболеванием ЦНС) у субъекта. Генный продукт может представлять собой белок, фрагмент (например, часть) белка, интерферирующую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует ассоциированный с заболеванием ЦНС ген, и так далее. Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт представляет собой белок или фрагмент белка, кодируемый ассоциированным с заболеванием ЦНС геном. Согласно некоторым вариантам осуществления, генный продукт представляет собой интерферирующую нуклеиновую кислоту (например, кшРНК, миРНК, микроРНК, имикроРНК и так далее), которая ингибирует ассоциированный с заболеванием ЦНС ген.

Термин «ассоциированный с заболеванием ЦНС ген» относится к гену, кодирующему генный продукт, который генетически, биохимически или функционально ассоциирован с заболеванием ЦНС, например болезнью Паркинсона (PD). Например, у индивидуумов с мутациями в гене *GBA1* (*GBA1*, который кодирует белок Gcase), или гене паркин (*PRKN*, который кодирует белок паркин) наблюдается повышенный риск развития PD по сравнению с индивидуумами без мутаций в *GBA1* или *PRKN*. Согласно некоторым вариантам осуществления кассета экспрессии, описанная в настоящем документе, кодирует

форму дикого типа или немутантную форму PD-ассоциированного гена (или его кодирующую последовательность) (например, белка паркин). Согласно некоторым вариантам осуществления кассета экспрессии, описанная в настоящем документе, кодирует белок PRKN дикого типа и один или несколько дополнительных PD-ассоциированных белков. Примеры PD-ассоциированных генов приведены в таблице 1.

Таблица 1: Примеры PD-ассоциированных генов

| Название                   | Ген      | Функция                                                                                                                                                                             | № доступа в NCBI                                                                                                                          |
|----------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Паркин                     | PRKN     | играет нейропротекторную роль в зависимости от функции его убиквитинлигазы E3                                                                                                       | BAA25751 (SEQ ID NO: 6)                                                                                                                   |
| Альфа-синуклеин            | SNCA     | играет роль в поддержании запаса синаптических везикул в пресинаптических окончаниях путем группирования синаптических везикул и может помогать регулировать высвобождение дофамина | NP_001139527.1 (SEQ ID NO: 7)                                                                                                             |
| Бета-глюкоцереброзидаза    | GBA1     | расщепляет бета-глюкозидную связь глюкоцереброзида                                                                                                                                  | NP_001005742.1 (изоформа 1 (SEQ ID NO: 8)),<br>NP_001165282.1 (изоформа 2 (SEQ ID NO: 9)),<br>NP_001165283.1 (изоформа 3 (SEQ ID NO: 10)) |
| Трансмембранный белок 106B | TMEM106B | играет роль в морфогенезе дендритов и регуляции лизосомального транспорта                                                                                                           | NP_060844.2 (SEQ ID NO: 11)                                                                                                               |
| Програнулин                | PGRN     | играет роль в развитии, воспалении, пролиферации клеток и белковом гомеостазе                                                                                                       | NP_002087.1 (SEQ ID NO: 12)                                                                                                               |
| Рибосомный белок S25       | RPS25    | рибосомный белок, являющийся компонентом                                                                                                                                            | AB061844.1 (SEQ ID NO: 13)                                                                                                                |



|                                                    |             |                            |                                |
|----------------------------------------------------|-------------|----------------------------|--------------------------------|
|                                                    |             | субъединицы 40S            |                                |
| Тау-белок,<br>ассоциированный с<br>микротрубочками | <i>MAPT</i> | Стабилизация микротрубочек | NM_016835.4<br>(SEQ ID NO: 14) |

### *Выделенные нуклеиновые кислоты и векторы*

Выделенная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к выделенным нуклеиновым кислотам (например, векторам на основе гAAV), содержащим экспрессионную конструкцию, кодирующую один или несколько PD-ассоциированных генов, например белок паркин (например, генный продукт гена *PRKN*). «Белок паркин» представляет собой убиквитинлигазу E3, способную убиквитинировать широкий спектр белков в ответ на различные условия (например, деполяризацию митохондрий или сигнализацию эпидермального фактора роста). У человека ген *PRKN* расположен на хромосоме 6. Согласно некоторым вариантам осуществления человеческий ген *PRKN* кодирует пептид, представленный эталонной последовательностью NCBI BAA25751 (SEQ ID NO: 1). Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит кодирующую человеческий паркин последовательность, которая была кодон-оптимизирована. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит кодон-оптимизированную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 3. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная нуклеиновая кислота не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную под SEQ ID NO: 4 (например, *PRKN* дикого типа).

Генный продукт может кодироваться кодирующей частью (например, кДНК) встречающегося в природе гена или вариантом встречающегося в природе гена (например, мутантным или усеченным вариантом встречающегося в природе гена). Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый человеческим геном *PRKN*. Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт представляет собой белок (или его фрагмент), кодируемый другим геном, приведенным в таблице 1, например геном *MAPT*. Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт представляет собой фрагмент (например, часть) гена, приведенного в таблице 1, например фрагмент человеческого гена *PRKN*. Фрагмент белка может содержать приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80% приблизительно 90% или приблизительно 99% белка, кодируемого генами, приведенными в таблице 1. Согласно некоторым вариантам осуществления

фрагмент белка содержит от 50% до 99,9% (например, любое значение от 50% до 99,9%) белка, кодируемого геном, приведенным в таблице 1.

Экспрессионная конструкция может содержать один или несколько промоторов (например, 1, 2, 3, 4, 5 или больше промоторов). Можно использовать любой подходящий промотор, например конститутивный промотор, индуцируемый промотор, эндогенный промотор, тканеспецифичный промотор (например, ЦНС-специфичный промотор) и так далее. Согласно некоторым вариантам осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина кур (промотор CBA), промотор CAG (например, как описано в документе Alexoroulou et al. (2008) *BMC Cell Biol.* 9:2; doi: 10.1186/1471-2121-9-2) или промотор JeT (например, как описано в документе Tornøe et al. (2002) *Gene* 297(1-2):21-32).

Аспекты настоящего раскрытия относятся к конструкциям, которые сконфигурированы для экспрессии одного или нескольких трансгенов в клетках ЦНС (например, нейронах или ненейронных клетках) субъекта. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления, конструкция (например, вектор экспрессии гена) содержит белок, кодирующий последовательность, которая функционально связана с нейрон-специфичным промотором. Примеры нейрон-специфичных промоторов включают промотор синапсина I, промотор кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, промотор тубулина-альфа I, промотор нейронспецифической енолазы и промотор бета-цепи тромбоцитарного фактора роста, например, как описано в документе Hioki et al. *Gene Therapy*, volume 14, pages 872–882 (2007).

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция является моноцистронной (например, экспрессионная конструкция кодирует один генный продукт, например белок, или несколько генных продуктов под контролем одного промотора). Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессионная конструкция является полицистронной (например, экспрессионная конструкция кодирует два различных генных продукта, например два разных белка или белковых фрагмента, под контролем разных промоторов). Полицистронный вектор экспрессии может содержать один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5 или больше) промоторов.

Согласно некоторым вариантам осуществления кассета экспрессии содержит одну или несколько дополнительных регуляторных последовательностей, включая, но без ограничения, последовательности связывания фактора транскрипции, сайты сплайсинга интронов, сайты добавления поли(A), энхансерные последовательности, сайты связывания репрессора или любую комбинацию вышеперечисленного. В контексте кассеты экспрессии, кодирующей несколько генных продуктов последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать первый генный продукт и второй генный продукт, которые

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

Патологически такие расстройства, как PD и болезнь Гоше, связаны с накоплением белковых агрегатов, состоящих в основном из белка  $\alpha$ -синуклеина ( $\alpha$ -Syn). Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе, содержат ингибирующую нуклеиновую кислоту, которая снижает или предотвращает экспрессию белка  $\alpha$ -Syn. Последовательность, кодирующая ингибирующую нуклеиновую кислоту, может быть помещена в нетранслируемую область (например, интрон, 5'UTR, 3'UTR и так далее) вектора экспрессии.

Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота расположена в интроне экспрессионной конструкции, например в интроне выше последовательности, кодирующей первый генный продукт. Ингибирующая нуклеиновая кислота может представлять собой двухцепочечную РНК (дцРНК), миРНК, мкРНК (микроРНК), искусственную микроРНК (имикроРНК) или РНК-аптамер. Как правило, ингибирующая нуклеиновая кислота связывается (например, гибридизуется) с от приблизительно 6 до приблизительно 30 (например, с любым целым числом от 6 до 30 включительно) смежных нуклеотидов РНК-мишени (например, иРНК). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой микроРНК или имикроРНК, например микроРНК, которая нацелена на *SNCA* (ген, кодирующий белок  $\alpha$ -синуклеин), *MAPT* (например, ген, кодирующий тау-белок) или *APP* (например, ген, кодирующий бета-амилоидный белок). Согласно некоторым вариантам осуществления микроРНК не содержит каких-либо несовпадений с областью иРНК *SNCA*, иРНК *MAPT* или иРНК *APP*, с которой она гибридизуется (например, микроРНК является «усовершенствованной»). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой кшРНК (например, кшРНК, нацеленную на *SNCA*, *MAPT* или *APP*). Согласно некоторым вариантам

осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой искусственную микроРНК (имикроРНК), которая содержит скаффолд *miR-155* и нацеленную на *SNCA* или *TMEM106B* последовательность.

Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой искусственную микроРНК (имикроРНК). Термин микроРНК (мкРНК) обычно относится к малой некодирующей РНК, обнаруженной у растений и животных, и она участвует в транскрипционной и посттрансляционной регуляции экспрессии генов. МикроРНК транскрибируются РНК-полимеразой с образованием структуры шпилька-петля и получают название при-микроРНК, а затем процессируются ферментами (например, Droscha, Pasha, сплайсосомой и так далее) с образованием структуры шпильки пре-микроРНК, которая затем процессируется Dicer с образованием дуплекса микроРНК/микроРНК\* (где \* указывает на пассажирскую цепь дуплекса микроРНК), одна цепь которого затем включается в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибирующая РНК, как описано в настоящем документе, представляет собой микроРНК, нацеленную на *SNCA*, *MAPT* или *APP*.

Искусственную микроРНК (имикроРНК) получают путем модификации нативной микроРНК для замены природных нацеливающих областей пре-иРНК на представляющие интерес нацеливающие области. Например, встречающаяся в природе экспрессируемая микроРНК может использоваться в качестве скаффолда или каркаса (например, скаффолда при-микроРНК), причем стеблевую последовательность заменяют на последовательность микроРНК, нацеленную на представляющий интерес ген. Искусственный предшественник микроРНК (пре-имикроРНК) обычно процессируется таким образом, что преимущественно образуется одна единственная стабильная малая РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления векторы на основе одного или нескольких *scAAV*, описанные в настоящем документе, содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую имикроРНК. Согласно некоторым вариантам осуществления скаффолд при- микроРНК в имикроРНК получают от при-микроРНК, выбранной из группы, состоящей из *pri-MIR-21*, *pri-MIR-22*, *pri-MIR-26a*, *pri-MIR-30a*, *pri-MIR-33*, *pri-MIR-122*, *pri-MIR-375*, *pri-MIR-199*, *pri-MIR-99*, *pri-MIR-194*, *pri-MIR-155*, *pri-MIR-451*, *pri-MIR-14*, *pri-MIR145*, *pri-MIR 7-2* и *pri-MIR-155*. Согласно некоторым вариантам осуществления имикроРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, нацеленную на *SNCA*, *MAPT* или *APP*, и скаффолд имикроРНК *eSIBR*, например, как описано в документе Fowler et al. *Nucleic Acids Res.* 2016 Mar 18; 44(5): e48.

Выделенная нуклеиновая кислота, как описано в настоящем документе, может существовать сама по себе или как часть вектора. Как правило, вектор может представлять собой плазмиду, космиду, фагмиду, бактериальную искусственную хромосому (BAC) или вирусный вектор (например, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор, бакуловирусный вектор и так далее). Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой плазмиду (например, плазмиду, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе). Согласно некоторым вариантам осуществления вектор на основе гAAV является одноцепочечным (например, одноцепочечной ДНК). Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного AAV (гAAV). Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой вектор на основе бакуловируса (например, вектор на основе вируса ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV)).

Как правило, вектор на основе гAAV (например, генома гAAV) содержит трансген (например, экспрессионную конструкцию, содержащую один или несколько каждого из следующих элементов: промотор, интрон, энхансерная последовательность, кодирующая белок последовательность, кодирующая ингибирующую РНК последовательность, последовательность поли(А)-хвоста и так далее), фланкированный двумя последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. Согласно некоторым вариантам осуществления трансген вектора на основе гAAV содержит выделенную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем раскрытии. Согласно некоторым вариантам осуществления каждая из двух последовательностей ITR вектора на основе гAAV представляет собой полноразмерный ITR (например, имеющий длину приблизительно 145 п. о. и содержащий функциональный сайт связывания *Rep* (RBS) и сайт концевой разрешения (*trs*)). Согласно некоторым вариантам осуществления ITR AAV выбраны из группы, состоящей из ITR AAV1, ITR AAV2, ITR AAV3, ITR AAV4, ITR AAV5 и ITR AAV6. Согласно некоторым вариантам осуществления один из ITR вектора на основе гAAV является усеченным (например, укороченным или не полноразмерным). Согласно некоторым вариантам осуществления в усеченном ITR нет функционального сайта концевой разрешения (*trs*), и он используется для получения векторов на основе самокомплементарного AAV (векторов на основе scAAV). Согласно некоторым вариантам осуществления усеченный ITR представляет собой  $\Delta$ ITR, например как описано в документе McCarty et al. (2003) *Gene Ther.* 10(26):2112-8.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к выделенным нуклеиновым кислотам (например, векторам на основе гAAV), содержащим ITR с одной или несколькими

модификациями (например, добавлениями, делециями, заменами и так далее нуклеиновых кислот) по отношению к ITR AAV дикого типа, например по отношению к ITR AAV2 дикого типа (например, к SEQ ID NO: 5). Как правило, ITR дикого типа содержит область из 125 нуклеотидов, которая самоотжигается с образованием палиндромной двухцепочечной Т-образной шпильчатой структуры, состоящий из двух поперечных ветвей (образованных последовательностями, называемыми В/В' и С/С' соответственно), более длинную стеблевую область (образованную последовательностями А/А') и одноцепочечную концевую область, называемую областью «D». Как правило, область «D» в ITR расположена между стеблевой областью, образованной последовательностями А/А', и вставкой, содержащей трансген вектора на основе гAAV (например, расположена «внутри» ITR по отношению к концу ITR или проксимальнее трансгенной вставки или экспрессионной конструкции вектора на основе гAAV).

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

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к векторам на основе бакуловируса, содержащим выделенную нуклеиновую кислоту или вектор на основе гAAV, как описано в настоящем раскрытии. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор на основе бакуловируса представляет собой вектор на основе вируса ядерного полиэдроса *Autographa californica* (AcNPV), например, как описано в документах Urabe et al. (2002) *Hum Gene Ther* 13(16):1935-43 и Smith et al. (2009) *Mol Ther* 17(11):1888-1896.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в настоящем документе. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. Например, клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего, бактериальную клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомого и так далее. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, например клетку HEK293T. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, например клетку *E. coli*. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой

клетку насекомого, например клетку SF9 (например, клональный изолят клеток Sf21 *Spodoptera frugiperda*).

#### *rAAV*

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к рекомбинантным AAV (rAAV), содержащим трансген, который кодирует нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе (например, вектор на основе гAAV, как описано в настоящем документе). Термин «гAAV» обычно относится к вирусным частицам, содержащим вектор на основе гAAV, инкапсулированный одним или несколькими капсидными белками AAV. Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV представляет собой самокомплементарный гAAV (scAAV).

гAAV, описанный в настоящем раскрытии, может содержать капсидный белок серотипа, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 и их вариантов. Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV содержит капсидный белок серотипа AAV9. Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV содержит капсидный белок отличающегося от человека хозяина, например капсидный белок AAV макака-резуса, такой как AAVrh.10, AAVrh.39 и так далее. Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, описанный в настоящем раскрытии, содержит капсидный белок, который представляет собой вариант капсидного белка дикого типа, такой как вариант капсидного белка, который включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 (например, 15, 20 25, 50, 100 и так далее) аминокислотных замен (например, мутаций) по отношению к капсидному белку AAV дикого типа, из которого он получен. Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV содержит химерный капсидный белок (например, капсидный белок, который содержит последовательности из двух или более различных капсидных белков AAV), например AAV1RX, как описано в документе Albright et al. *Mol Ther.* 2018 Feb 7;26(2):510-523. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант капсидного белка представляет собой капсидный белок AAV TM6, например, как описано в документе Rosario et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016; 3: 16026.

Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, описанный в настоящем раскрытии, содержит капсидный белок, который представляет собой вариант капсидного белка дикого типа, такой как вариант капсидного белка, который включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 (например, 15, 20 25, 50, 100 и так далее) аминокислотных замен (например, мутаций) по отношению к капсидному белку AAV, из которого он получен. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант капсидного белка содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по

меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере или на 99% идентична капсидному белку AAV дикого типа, из которого он получен.

Настоящее раскрытие частично основано на гAAV, содержащих трансген, кодирующий один или несколько PD-ассоциированных генных продуктов (например, человеческий паркин) и капсидные белки, нацеленных на клетки в центральной нервной системе (ЦНС), например нейронные клетки (например, астроциты) или ненейронные клетки (например, микроглиальные клетки, периваскулярные макрофаги, макрофаги сосудистого сплетения, менингеальные макрофаги, менингеальные дендритные клетки и/или менингеальные гранулоциты).

Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, описанные в настоящем раскрытии, легко распространяются через ЦНС, особенно при введении в пространство CSF или непосредственно в паренхиму головного мозга. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, описанные в настоящем раскрытии, содержат капсидный белок, который способен проникать через барьер между кровью и головным мозгом (BBB). Например, согласно некоторым вариантам осуществления гAAV содержит капсидный белок серотипа AAV9, серотипа AAVrh.10 или серотипа AAV1RX. Получение гAAV описано, например, в документах Samulski et al. (1989) *J Virol.* 63(9):3822-8 и Wright (2009) *Hum Gene Ther.* 20(7): 698–706.

Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, как описано в настоящем раскрытии (например, содержащий рекомбинантный геном гAAV, инкапсулированный капсидными белками AAV с образованием капсидной частицы гAAV), получают в бакуловирусной векторной системе экспрессии (BEVS). Получение гAAV с использованием BEVS описано, например, в документах Urabe et al. (2002) *Hum Gene Ther* 13(16):1935-43, Smith et al. (2009) *Mol Ther* 17(11):1888-1896, патенте США № 8945918, патенте США № 9879282 и международной публикации PCT WO 2017/184879. Однако гAAV можно получать с помощью любого подходящего способа (например, с помощью рекомбинантных генов гер и сар).

#### *Фармацевтические композиции*

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к фармацевтическим композициям, содержащим выделенную нуклеиновую кислоту или гAAV, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. При использовании в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» относится к материалу, такому как носитель или разбавитель, который не подавляет биологическую активность или свойства соединения и является относительно нетоксичным, например, этот материал можно вводить индивидууму, и он не вызывает нежелательных биологических эффектов и



не взаимодействует вредным образом с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

При использовании в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, стабилизатор, диспергирующее средство, суспендирующее средство, разбавитель, вспомогательное вещество, загущающее средство, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке соединения, примененного в рамках изобретения, внутри пациента или к пациенту, так что оно может выполнять свою предполагаемую функцию. Дополнительные ингредиенты, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, применяемые при осуществлении настоящего изобретения на практике, известны в данной области техники и описаны, например в Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA), который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции (например, фармацевтические композиции), предлагаемые в настоящем документе, можно вводить любым путем, включая энтеральный (например, пероральный), парентеральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, подкожный, внутрижелудочковый, чрескожный, внутрикожный, ректальный, интравагинальный, внутрибрюшинный, местный (такой как с помощью порошков, мазей, кремов и/или капель), мукозальный, назальный, буккальный, подъязычный; путем интратрахеальной инстилляцией, бронхиальной инстилляцией и/или ингаляцией; и/или в виде перорального спрея, назального спрея и/или аэрозоля. Конкретно предусмотренными путями являются пероральное введение, внутривенное введение (например, системная внутривенная инъекция), регионарное введение через кровь и/или лимфу и/или прямое введение в пораженный участок. Как правило, наиболее подходящий путь введения зависит от множества факторов, включая характер средства (например, его стабильность в среде желудочно-кишечного тракта) и/или состояние субъекта (например, способен ли субъект переносить пероральное введение). Согласно определенным вариантам осуществления соединение или фармацевтическая композиция, описанные в настоящем документе, подходят для местного введения в глаз субъекта.

### *Способы*

Была установлена связь болезни Паркинсона с митохондриальной дисфункцией и окислительным стрессом в клетках (или клеточной среде) субъекта. Например, у пациентов с PD наблюдается дефицит комплекса I электрон-транспортной цепи митохондрий. Согласно некоторым вариантам осуществления митохондриальную дисфункцию вызывает

мутация в одном или нескольких из следующих генов в клетке или у субъекта: *SNCA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1* или *ATP13A2*. *PRKN* кодирует цитозольную убиквитинлигазу E3, которая убиквитинирует белки-мишени для передачи сигналов или протеасомной деградации. Согласно некоторым вариантам осуществления паркин поддерживает здоровье митохондрий путем регуляции их биогенеза и деградации посредством митофагии. Некоторые мутации в *PRKN* нарушают этот процесс и приводят дисрегуляции митохондрий и увеличению окислительного стресса, например, как описано в документе Park et al. *Curr. Neurol Neurosci. Rep.* 2018; 18(5): 21.

Настоящее раскрытие частично основано на композициях и способах снижения митохондриальной дисфункции и/или окислительного стресса в клетке или у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу снижения митохондриальной дисфункции в клетке или у субъекта (например, снижения окислительного стресса в клетке или у субъекта) путем введения композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем раскрытии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение композиции настоящего раскрытия субъекту снижает митохондриальную дисфункцию или окислительный стресс в клетке или у субъекта по меньшей мере на 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 100% или более (например, относительно субъекта, который не характеризуется митохондриальной дисфункцией или окислительным стрессом, или относительно уровня митохондриальной дисфункции или окислительного стресса у субъекта до введения композиции). Способы измерения уровней митохондриальной функции и окислительного стресса известны в данной области техники. Согласно некоторым вариантам осуществления митохондриальную функцию измеряют по поглощению кислорода, с помощью люминесцентных анализов АТФ для количественной оценки общего энергетического метаболизма и МТТ или Alamar Blue для определения метаболической активности. Согласно некоторым вариантам осуществления окислительный стресс измеряют по уровням повреждения ДНК/РНК, перекисного окисления липидов и окисления/нитрования белка или непосредственно измеряя активные формы кислорода.

Аспекты настоящего раскрытия относятся к композициям для экспрессии одного или нескольких ассоциированных с заболеванием ЦНС генных продуктов у субъекта для лечения связанных с ЦНС заболеваний. Один или несколько ассоциированных с заболеванием ЦНС генных продуктов могут кодироваться одной или несколькими выделенными нуклеиновыми кислотами или векторами на основе гAAV. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят вектор (например, выделенную

нуклеиновую кислоту, гAAV и так далее), кодирующий один или несколько (1, 2, 3, 4, 5 или более) генных продуктов. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят несколько (например, 2, 3, 4, 5 или более) векторов (например, выделенных нуклеиновых кислот, гAAV и так далее), причем все векторы кодируют различные ассоциированные с заболеванием ЦНС генные продукты. Согласно некоторым вариантам осуществления трансген, доставляемый в клетку-мишень, кодирует один или несколько PD-ассоциированных белков, например человеческий *паркин*, и/или одну или несколько ингибирующих нуклеиновых кислот, нацеленных на *APP*, *MAPT* или  $\alpha$ -синуклеин.

Согласно некоторым аспектам композиции (например, выделенные нуклеиновые кислоты, гAAV и так далее), описанные в настоящем документе, вводят субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является человеком. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят более чем один (например, 2, 3, 4, 5 или более) вектор (например, гAAV), причем все векторы кодируют различные трансгены (например, первый гAAV кодирует человеческий белок паркин, а второй гAAV кодирует белок GBA1 или ингибирующую нуклеиновую кислоту).

Настоящее раскрытие частично основано на композициях для экспрессии PD-ассоциированных генных продуктов у субъекта для лечения болезни Паркинсона. При использовании в настоящем документе термины «лечить» или «лечение» относятся к (a) предупреждению или отсрочке начала болезни Паркинсона; (b) уменьшению тяжести болезни Паркинсона; (c) уменьшению или предотвращению развития симптомов, характерных для болезни Паркинсона; (d) и/или предотвращению ухудшения симптомов, характерных для болезни Паркинсона. Признаки и симптомы болезни Паркинсона включают, например, накопление белка синуклеина, тремор, замедление движений (брадикинезию), ригидность мышц (скованность), нарушение осанки и равновесия, изменение речи и изменения письма.

Настоящее раскрытие частично основано на композициях для экспрессии комбинаций PD-ассоциированных генных продуктов у субъекта, которые действуют вместе (например, синергически) для лечения болезни Паркинсона.

Соответственно, согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие болезни Паркинсона, причем данный способ предусматривает введение субъекту композиция (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или а гAAV), как описано в настоящем раскрытии.

Настоящее раскрытие частично основано на композициях для экспрессии одного или нескольких ассоциированных с заболеванием ЦНС генных продуктов у субъекта для

лечения болезни Гоше. Согласно некоторым вариантам осуществления болезнь Гоше представляет собой нейропатическую болезнь Гоше, например болезнь Гоше 2 типа или болезнь Гоше 3 типа. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта нет PD или симптомов PD.

Соответственно, согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие нейропатической болезни Гоше, причем данный способ предусматривает введение субъекту композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или rAAV), как описано в настоящем раскрытии.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие аутосомно-рецессивной ювенильной болезни Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие болезни Паркинсона с мутацией PARK2. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие идиопатической болезни Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие спорадической болезни Паркинсона. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие атипичного паркинсонизма. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие множественной системной атрофии (MSA). Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие прогрессирующего надъядерного паралича (PSP). Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие кортикобазального синдрома (CBS). Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие деменции с тельцами Леви (DLB). Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие индуцированного лекарственными препаратами паркинсонизма. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие сосудистого паркинсонизма (VP).

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект с болезнью Паркинсона или подверженный риску ее развития характеризуется наличием одной или нескольких мутаций, замен, вставок или делеций в человеческом *PRKN*.

Примеры мутаций в человеческом *PRKN* (или человеческом белке паркин) включают с.81G>T, A42P, делецию экзона 2, дупликацию экзона 2, 255delA, 202-3delAG, A46P, Q34R, D53E, делецию 40 bp экзона 30, делецию экзона 3, R128K, делецию экзона 3-4, делецию экзона 5-6, делецию экзона 6, T240M, R275W, R256C, I298L, делецию экзона 8, P437A, 255delA, делецию 40 bp экзона 3, R256C + делецию экзона 2-4, 255delA + делецию экзона 2-4, 255delA + R275W, R42P + R275W, 202delAG + делецию экзона 3-4, R42P + делецию экзона 3, делецию 40 bp экзона 3, делецию 40 bp экзона 3 + делецию экзона 4, делецию экзона 3 + делецию экзона 5, делецию 40 bp экзона 3 + R275W, делецию экзона 3 + делецию экзона 12, делецию 40 bp экзона 3 + G430D, делецию экзона 3-4, G430D, делецию экзона 4 + R275W, делецию экзона 4 + R366Q, R275W + G430D, дупликацию экзона 7-8, делецию экзона 10, R275W + C212Y, C253W, R256C, R275W и D280N, мутации экзона 7 или их комбинацию.

Субъект обычно является млекопитающим, предпочтительно человеком. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект находится в возрасте от 1 месяца до 10 лет (например, в возрасте 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4, месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 14 месяцев, 15 месяцев, 16 месяцев, 17 месяцев, 18 месяцев, 19 месяцев, 20 месяцев, 21 месяца, 22 месяцев, 23 месяцев, 24 месяцев, 3 лет, 4 лет, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет или в любом возрасте между ними). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект находится в возрасте от 2 лет до 20 лет. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект находится в возрасте от 30 лет до 100 лет. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект старше 55 лет.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие болезни Паркинсона, причем данный способ предусматривает введение субъекту композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или gAAV), как описано в настоящем раскрытии.

Согласно некоторым аспектам композиции настоящего раскрытия применимы для лечения ассоциированного с ЦНС заболевания. Ассоциированное с ЦНС заболевание может представлять собой нейродегенеративное заболевание, синуклеопатию, таупатию или лизосомную болезнь накопления. Примеры нейродегенеративных заболеваний и связанных с ними генов приведены в таблице 2.

Термин «синуклеопатия» относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся 1) снижением экспрессии или активности альфа-синуклеина (генного продукта *SNCA*) у субъекта (например, относительно здорового субъекта, например субъекта без синуклеопатии) или 2) повышением экспрессии или активности альфа-синуклеина (генного продукта *SNCA*) у субъекта (например, относительно здорового субъекта, например субъекта без синуклеопатии), что приводит к токсичному фенотипу «с приобретением функции». Примеры синуклеопатий и связанных с ними генов приведены в таблице 3.

Термин «таупатия» относится к заболеванию или нарушению, характеризующемуся 1) снижением экспрессии или активности тау-белка у субъекта (например, здорового субъекта без таупатии) или 2) повышением экспрессии или активности тау-белка у субъекта (например, здорового субъекта без таупатии), что приводит к фенотипу «с приобретением функции». Примеры таупатий и связанных с ними генов приведены в таблице 4.

Термин «лизосомная болезнь накопления» относится к заболеванию, характеризующемуся 1) аномальным накоплением токсичных клеточных продуктов в лизосомах субъекта или 2) отсутствием генного продукта, экспрессируемого в лизосомах субъекта, что приводит к дефициту или аномальному накоплению некоторых клеточных продуктов (например, лизосомальных ферментов, липидов, метаболитов и так далее) в лизосомах. Примеры лизосомных болезней накопления и связанных с ними генов приведены в таблице 5.

Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят непосредственно в ЦНС субъекта, например путем прямой инъекции в головной мозг и/или спинной мозг субъекта. Примеры способов прямого введения в ЦНС включают, но без ограничения, интрацеребральную инъекцию, внутривентрикулярную инъекцию, интракраниальную инъекцию, интрапаренхиматозную инъекцию, интратекальную инъекцию и любую комбинацию вышеперечисленного. Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция в ЦНС субъекта приводит к экспрессии трансгена (например, к приводит к экспрессии белка паркин) в среднем мозге, стриатуме и/или коре головного мозга субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция в ЦНС приводит к экспрессии трансгена (например, к приводит к экспрессии белка паркин) в спинном мозге и/или CSF субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления прямое введение в ЦНС субъекта приводит к инфицированию клеток ЦНС субъекта гAAV. Согласно некоторым вариантам осуществления прямое введение в ЦНС субъекта приводит к экспрессии трансгена, кодируемого гAAV (например, человеческого *PRKN* и так далее) в

клетках ЦНС субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления миелоидные клетки представляют собой микроглиальные клетки.

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

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

Согласно некоторым вариантам осуществления композицию (например, композицию, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем раскрытии, вводят как периферически, так и непосредственно в ЦНС субъекта. Например, согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят композицию посредством внутриартериальной инъекции (например, инъекции в сонную артерию) и посредством интрапаренхиматозной инъекции (например, интрапаренхиматозной инъекции с помощью CED). Согласно некоторым вариантам осуществления прямая инъекция в ЦНС и периферическая инъекция являются одновременными (например, происходят в одно время). Согласно некоторым вариантам осуществления прямую инъекцию проводят до (например, от 1 минуты до 1 недели или более до) периферической инъекции. Согласно некоторым вариантам осуществления прямую инъекцию проводят после (например, от 1 минуты до 1 недели или более после) периферической инъекции.

Количество композиции (например, композиции, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем раскрытии, вводимой субъекту, будет отличаться в зависимости от способа введения. Например, согласно некоторым вариантам осуществления гAAV, как описано в настоящем документе, вводят субъекту в титре от приблизительно  $10^9$  копий генома (GC)/кг до приблизительно

$10^{14}$  GC/кг (например, приблизительно  $10^9$  GC/кг, приблизительно  $10^{10}$  GC/кг, приблизительно  $10^{11}$  GC/кг, приблизительно  $10^{12}$  GC/кг, приблизительно  $10^{12}$  GC/кг или приблизительно  $10^{14}$  GC/кг). Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят высокий титр (например,  $>10^{12}$  копий генома гAAV GC/кг) путем инъекции в пространство CSF или путем интрапаренхиматозной инъекции.

Композицию (например, композицию, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, или вектор, или гAAV), как описано в настоящем раскрытии, можно вводить субъекту один или несколько раз (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 или более) раз. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят субъекту непрерывно (например, постоянно), например с помощью инфузионного насоса.

Таблица 2: Примеры нейродегенеративных заболеваний

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



|              |  |
|--------------|--|
| прионопатия) |  |
|--------------|--|

Таблица 3: Примеры синуклеинопатий

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

Таблица 4: Примеры таупатий

| <b>Заболевание</b>                          | <b>Ассоциированные гены</b>                         |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Болезнь Альцгеймера                         | <i>APP, PSEN1, PSEN2, APOE</i>                      |
| Первичная возрастная таупатия               | <i>MAPT</i>                                         |
| Прогрессирующий надъядерный паралич         | <i>MAPT</i>                                         |
| Кортикобазальная дегенерация                | <i>MAPT, GRN, C9orf72, VCP, CHMP2B, TARDBP, FUS</i> |
| Лобно-височная деменция с паркинсонизмом-17 | <i>MAPT</i>                                         |
| Подострый склерозирующий панэнцефалит       | <i>SCN1A</i>                                        |
| Болезнь Литико-Бодига                       |                                                     |
| Гангиоглиома, ганглиоцитомы                 |                                                     |
| Менингиоангиоматоз                          |                                                     |
| Постэнцефалитический паркинсонизм           |                                                     |
| Хроническая травматическая энцефалопатия    |                                                     |

Таблица 5: Примеры лизосомных болезней накопления

| <b>Заболевание</b>               | <b>Ассоциированные гены</b> |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Болезнь Ниманна-Пика             | <i>NPC1, NPC2, SMPD1</i>    |
| Болезнь Фабри                    | <i>GLA</i>                  |
| Болезнь Краббе                   | <i>GALC</i>                 |
| Болезнь Гоше                     | <i>GBA</i>                  |
| Болезнь Таха-Сакса               | <i>HEXA</i>                 |
| Метахроматическая лейкодистрофия | <i>ARSA, PSAP</i>           |
| Болезнь Фарбера                  | <i>ASAHI</i>                |

|                                            |                                                                                           |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Галактосиалидоз                            | <i>CTSA</i>                                                                               |
| Болезнь Шиндлера                           | <i>NAGA</i>                                                                               |
| GM1-ганглиозидоз                           | <i>GLB1</i>                                                                               |
| GM2-ганглиозидоз                           | <i>GM2A</i>                                                                               |
| Болезнь Сандхоффа                          | <i>HEXB</i>                                                                               |
| Дефицит лизосомной кислой липазы           | <i>LIPA</i>                                                                               |
| Множественная сульфатазная недостаточность | <i>SUMF1</i>                                                                              |
| Мукополисахаридоз I типа                   | <i>IDUA</i>                                                                               |
| Мукополисахаридоз II типа                  | <i>IDS</i>                                                                                |
| Мукополисахаридоз III типа                 | <i>GNS, HGSNAT, NAGLU, SGSH</i>                                                           |
| Мукополисахаридоз IV типа                  | <i>GALNS, GLB1</i>                                                                        |
| Мукополисахаридоз VI типа                  | <i>ARSB</i>                                                                               |
| Мукополисахаридоз VII типа                 | <i>GUSB</i>                                                                               |
| Мукополисахаридоз IX типа                  | <i>HYAL1</i>                                                                              |
| Муколипидоз II типа                        | <i>GNPTAB</i>                                                                             |
| Муколипидоз III альфа/бета типа            | <i>GNPTAB</i>                                                                             |
| Муколипидоз III гамма типа                 | <i>GNPTG</i>                                                                              |
| Муколипидоз IV типа                        | <i>MCOLN1</i>                                                                             |
| Нейрональный цероидный липофусциноз        | <i>PPT1, TPP1, CLN3, CLN5, CLN6, MFSD8, CLN8, CTSD, DNAJC5, CTSF, ATP13A2, GRN, KCTD7</i> |
| Альфа-маннозидоз                           | <i>MAN2B1</i>                                                                             |
| Бета-маннозидоз                            | <i>MANBA</i>                                                                              |
| Аспартилглюкозаминурия                     | <i>AGA</i>                                                                                |
| Фукозидоз                                  | <i>FUCA1</i>                                                                              |

### **Примеры**

#### *Пример 1: Векторы на основе rAAV*

Векторы на основе AAV получают с использованием клеток, таких как клетки HEK293 для трансфекции тремя плазмидами или клетки SF9 для получения на основе бакуловируса. Последовательности ITR фланкируют экспрессионную конструкцию, содержащую промоторный/энхансерный элемент, функционально связанный с кодон-

оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей человеческий белок PRKN (например, SEQ ID NO: 2 или 3), 3'-поли(А)-сигнал и посттрансляционные сигналы, такие как элемент WPRE. На фиг. 1 показан один вариант осуществления плазмиды, кодирующей вектор на основе rAAV, кодирующий человеческий паркин.

### *Пример 2: Анализы*

Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессию и/или активность белка (например, белка PRKN), кодируемого композицией нуклеиновой кислоты (например, одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, описанными в настоящей заявке) можно оценить с помощью одного или нескольких анализов. В следующих разделах представлены неограничивающие примеры анализов, которые можно использовать для оценки экспрессии и/или активности нуклеиновой кислоты и/или белка.

#### **а. Анализы экспрессии иРНК и белка**

Клетки HeLa трансфицировали плазмидами L00310 (содержащей SEQ ID NO: 2, также обозначается как optParkA) и L00311 (содержащей SEQ ID NO: 3, также обозначается как optParkB) по 50 нг плазмидной ДНК на лунку с использованием липофектамина 2000. Клетки инкубировали при 37 градусах Цельсия в течение 72 часов. Измеряли экспрессию иРНК и белка для optParkA и optParkB. Для измерения экспрессии иРНК клетки лизировали и получали кДНК с использованием набора Cells-to-CT. Анализ кРВ-ПЦР проводили с использованием SYBR green (фиг. 2А). Обратные праймеры для анализа кРВ-ПЦР были разными для optParkA и optParkB. Для измерения экспрессии белка клетки лизировали и анализировали с использованием набора Human Parkin SimpleStep ELISA от Abcam (фиг. 2В). Результаты показывают, что экспрессия белка optParkB более чем в два раза выше, чем optParkA.

#### **б. Анализ локализации белка**

Клетки HeLa трансфицировали 100 нг L00311 (optParkB) с использованием липофектамина 2000 и инкубировали в течение 72 часов при 37 градусах Цельсия. Клетки окрашивали на митохондрии, фиксировали и окрашивали на ядро и паркин. Результаты на фиг. 3 демонстрируют окрашенные ядра клеток в виде больших округлых областей в центре клеток и митохондрии светло-серого цвета. Белок optParkB (темно-серые области в цитоплазме, отмеченные звездочками «\*» на фиг. 3) локализован в цитоплазме трансфицированных клеток.

#### **с. Анализ митохондриального стресса**

Клетки HeLa трансфицировали по 10 нг на лунку L00311 (optParkB) с использованием липофектамина 2000 и инкубировали в течение 48 часов при 37 градусах

Цельсия. В клетки вводили менадион через 48 часов, и МТТ-тест завершали через 72 часа после трансфекции (фиг. 4А). Результаты показывают, что клетки HeLa, трансфицированные 10 нг паркина, характеризуются меньшей цитотоксичностью при дозе менадиона 60 мкМ (фиг. 4В). Не наблюдали существенной разницы при трансфекции 5 нг или 20 нг паркина. Клеточную токсичность наблюдали при трансфекции 50 нг паркина.

### ЭКВИВАЛЕНТЫ

Таким образом, после описания нескольких аспектов по меньшей мере одного варианта осуществления настоящего изобретения следует понимать, что специалисты в данной области техники легко обнаружат различные изменения, модификации и усовершенствования. Предполагается, что такие изменения, модификации и усовершенствования являются частью настоящего раскрытия и находятся в пределах сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно, вышеприведенное описание и чертежи приведены только в качестве примера.

Хотя в настоящем документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, рядовые специалисты в данной области техники легко представят множество других средств и/или структур для выполнения функций и/или получения результатов и/или одного или нескольких из описанных в настоящем документе преимуществ, и предполагается, что каждый из таких вариантов и/или модификаций входит в объем настоящего изобретения. В более общем смысле, специалистам в данной области техники будет понятно, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящем документе, предназначены для примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используются принципы настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будут очевидны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, или они смогут определить их с использованием не более чем обычных экспериментов. Таким образом, следует понимать, что вышеперечисленные варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов настоящее изобретение может быть реализовано иначе, чем конкретно описано и заявлено. Настоящее изобретение относится к каждому отдельному признаку, системе, изделию, материалу и/или способу, описанным в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов и/или способов, если такие

признаки, системы, изделия, материалы и/или способы не являются взаимно несовместимыми, входит в объем настоящего изобретения.

Единственное число при использовании в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать в значении «по меньшей мере один».

Фразу «и/или» при использовании в настоящем документе в описании и формуле изобретения следует понимать в значении «любой или оба» из соединенных таким образом элементов, то есть элементов, которые в некоторых случаях присутствуют совместно, а в других случаях присутствуют порознь. Необязательно, могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно указанных выражением «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с конкретно указанными элементами, если явно не указано иное. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, ссылка на «А и/или В» при использовании в сочетании с неограничивающим выражением, таким как «содержащий», может относиться согласно одному варианту осуществления к А без В (необязательно, включая элементы, отличные от В); согласно другому варианту осуществления на В без А (необязательно, включая элементы, отличные от А); согласно еще одному варианту осуществления к А и В вместе (необязательно, включая другие элементы); и так далее.

При использовании в настоящем документе в описании и в формуле изобретения «или» следует понимать в том же значении, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в списке «или» или «и/или» должны интерпретироваться как охватывающие, то есть как включение по меньшей мере одного, но также включая более чем один, из ряда или списка элементов, и, необязательно, дополнительных неперечисленных элементов. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как «только один из», или «ровно один из», или, при использовании в формуле изобретения, «состоящий из», будут относиться к включению ровно одного элемента из ряда или списка элементов. Как правило, термин «или» при использовании в настоящем документе следует толковать только как обозначающий исключающие альтернативы (то есть «один или другой, но не оба»), если ему предшествуют термины исключительности, такие как «один любой», «один из», «только один из» или «ровно один из». «Состоящий в основном из» при использовании в формуле изобретения имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Описание в настоящем документе любого аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения с использованием таких терминов, как «содержащий», «имеющий», «включающий в себя» или «содержащий в себе» в отношении элемента или

элементов предназначено для обеспечения обоснования аналогичного аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения, который «состоит из», «по существу состоит из» или «по существу содержит» этот конкретный элемент или элементы, если не указано иное или если это явно не противоречит контексту (например, описание в настоящем документе композиции как содержащей конкретный элемент следует понимать также как описание композиции, состоящей из этого элемента, если не указано иное или если это явно не противоречит контексту).

При использовании в настоящем документе в описании и формуле изобретения фразу «по меньшей мере один» в отношении перечня из одного или нескольких элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких из элементов в перечне элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из всех без исключения элементов, конкретно перечисленных в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что, необязательно, могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно указанных в перечне элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны они или не связаны с конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, «по меньшей мере один из А и В» (или, эквивалентно, «по меньшей мере один из А или В» или, эквивалентно, «по меньшей мере один из А и/или В») может относиться, согласно одному варианту осуществления, к по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, А при отсутствии В (и, необязательно, включая элементы, отличные от В); согласно другому варианту осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, В при отсутствии А (и, необязательно, включая элементы, отличные от А); согласно еще одному варианту осуществления к по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, А и по меньшей мере одному, необязательно включая более чем один, В (и необязательно включая другие элементы); и так далее.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные фразы, такие как «содержащий», «включающий в себя», «несущий», «имеющий», «содержащий в себя», «включающий», «удерживающий» и аналогичные, следует понимать как неограничивающие, то есть означающие включение без ограничения. Только переходные фразы «состоящий из» и «по существу состоящий из» представляют собой закрытые или полужакрытые переходные фразы соответственно, как указано в Руководстве по проведению патентной экспертизы Патентного ведомства США, раздел 2111.03.

Использование порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и так далее, в формуле изобретения для изменения элемента формулы изобретения само по себе не означает какого-либо приоритета, предшествования или порядка одного элемента формулы изобретения над другим или временного порядка, в котором выполняют действия способа, но их используют просто как метки для различения одного элемента формулы с определенным названием от другого элемента с тем же названием (но с использованием порядкового термина) для различения элементов формулы изобретения.

Следует также понимать, что, если явно не указано обратное, в любых заявленных в настоящем документе способах, которые включают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничен порядком, в котором приведены стадии или действия способа.

#### Последовательности

Согласно некоторым вариантам осуществления кассета экспрессии, кодирующая один или несколько генных продуктов (например, первый, второй и/или третий генный продукт) содержит или состоит из (или кодирует пептид, содержащий) последовательность, приведенную под любой из SEQ ID NO: 1-5. Согласно некоторым вариантам осуществления генный продукт содержит или состоит из или кодируется частью (например, фрагментом) любой из SEQ ID NO: 1-5.

#### >аминокислотная последовательность человеческого паркина (SEQ ID NO: 1)

MIVFVRFNSSHGFPVEVSDTSIFQLKEVVAKRQGVPAQDLRVI FAGKELRNDWTVQNCDLDQQ  
SIVHIVQRPWRKGQEMNATGGDDPRNAAGGCERE PQSLTRVDLSSSVLPGDSVGLAVILHTDSR  
KDSPPAGSPAGRSIYNSFYVYCKGPCQRVQPGKLRVQCSTCRQATLTLTQGPSCWDDVLI PNRM  
SGECQSPHCPGTSAEFFFKCGAHPTSDKETSVALHLIATNSRNITCITCTDVRSPVLVFQCNSR  
HVICLDLDFHLYCVTRLNDRQFVHDPQLGYSLPCVAGCPNSLIKELHHFRILGEEQYNRYQQYGA  
EECVLQMGGLVLCPRPGCGAGLLPEPDQRKVTCEGGNGLGCGFAFCRECKEAYHEGECSAVFEAS  
GTTTQAYRVDERAAEQARWEAASKETIKKTTKPCPRCHVPVEKNGGCMHMKCPQPQCRLEWCWN  
CGCEWNRVCMGDHWFVDV

#### >последовательность нуклеиновой кислоты человеческого паркина; кодон-оптимизированная (SEQ ID NO: 2)

ATGATTGTTTTCGTCAGATTCAATAGTTCCACGGGTTCCTGTGAGGTGGACAGTGATACTA  
GCATCTTCCAGCTGAAAGAAGTGGTGGCGAAGCGGCAGGGAGTTCTTGCAGACCAACTGAGGGT  
CATTTTCGCCGGCAAGGAGCTGAGGAACGATTGGACTGTGCAGAACTGTGACCTTGATCAGCAG  
AGTATCGTTCACATAGTGCAGCGCCCGTGGAGGAAGGGGCAGGAGATGAACGCAACGGGCGGGG  
ACGACCCCAGAAATGCTGCGGGGGGTGCGAGCGGGAACCTCAGTCTCTGACTCGGGTGGACCT  
GTCTAGCTCTGTGCTCCAGGTGATAGCGTTGGCCTCGCTGTTATCCTGCATACAGACTCCAGG

AAGGATAGTCCTCCCGCCGGGTCTCCTGCCGGCCGAAGTATCTATAACTCATTTTACGTTTACT  
 GCAAAGGACCCTGCCAACGCGTACAACCCGGCAAGCTCCGCGTGCAATGCTCAACTTGTAGGCA  
 GGCCACACTCACTTTGACGCAAGGTCCCTCTTGCTGGGACGATGTGCTGATTCCGAATAGAATG  
 AGTGGCGAGTGCCAATCACCCCATTTGTCCCGGTACAAGCGCGGAATTCTTCTTCAAATGCGGCG  
 CACATCCCACGTCAGACAAAGAGACTTCAGTCGCTCTCCACCTGATAGCCACCAACTCCCGCAA  
 CATTACCTGTATAACTTTGCACGGATGTCCGCTCCCCCGTGTTGGTGTTCAGTGTAAGTCCAGA  
 CATGTGATCTGTCTGGACTGCTTTCACCTGTACTGCGTGACTAGACTTAATGACAGACAGTTTG  
 TACATGACCCCCAGCTGGGATACAGCCTGCCGTGCGTGGCCGGTTGTCCCAACAGCCTGATTAA  
 GGAGCTGCACCATTTTCAGGATCCTGGGCGAGGAGCAGTACAACAGATACCAGCAGTACGGGGCG  
 GAGGAGTGTGTTCTTCAGATGGGGGGGGTGCTGTGCCCCAGGCCCGGCTGCGGTGCTGGTCTGT  
 TGCCAGAGCCCGACCAGAGAAAGGTCACATGTGAGGGCGGTAATGGGCTTGGCTGTGGATTTGC  
 CTTCTGCAGGGAATGTAAAGAGGCCTACCACGAGGGCGAATGCAGTGCCGTTTTCGAAGCAAGT  
 GGCACCACAACACAGGCCTATAGAGTTGATGAAAGGGCAGCAGAACAAGCGAGGTGGGAAGCCG  
 CCTCCAAAGAACTATCAAAAAACGACAAAGCCATGCCCCAGGTGCCATGTGCCTGTGGAGAA  
 AAACGGGGGATGCATGCATATGAAATGTCCCCAGCCCCAGTGCCGGTTGGAGTGGTGTGGAAC  
 TGTGGCTGCGAATGGAATCGGGTCTGCATGGGGGACCACTGGTTTTGACGTG

>последовательность нуклеиновой кислоты человеческого паркина; кодон-  
 оптимизированная (SEQ ID NO: 3)

ATGATTGTGTTTCGTTTCGATTCAATTCATCCCATGGATTTCCAGTCGAGGTCGATTTCAGATACCT  
 CCATATTCCAGCTCAAAGAAGTTGTGCGCAAAGAGGCAAGGAGTGCCAGCCGACCAGCTGCGAGT  
 CATCTTTGCCGGAAGGAGTTGAGGAACGACTGGACCGTTCAAAATTGTGACCTGGACCAGCAG  
 TCAATAGTGCACATCGTGCAAAGGCCTTGGCGGAAGGGTCAAGAGATGAACGCTACTGGTGGCG  
 ACGATCCTCGGAATGCAGCAGGCGGCTGCGAACGAGAGCCTCAGAGCCTTACCAGGGTAGATTT  
 GTCATCCAGCGTATTGCCTGGTGAAGTCAAGTAGGACTGGCTGTAATTCTTCATACAGACAGCAGG  
 AAAGATAGCCCACCAGCCGGCAGCCCCGCTGGTAGAAGTATCTACAACATCATTTCTACGTCTATT  
 GCAAAGGGCCGTGTCAGCGGGTGCAACCGGGTAAACTCAGAGTCCAATGCAGCACCTGTAGACA  
 AGCTACACTGACACTTACACAAGGGCCTAGTTGTTGGGACGACGTTCTTATTTCCCAATAGAATG  
 TCAGGTGAGTGTCAAAGTCCTCATTGTCCGGGGACTAGTGCTGAGTTTTTTTTTCAAATGCGGCG  
 CTCACCCCACTAGTGACAAGGAGACAAGCGTGGCCCTGCATCTCATAGCGACGAATAGCAGAAA  
 CATAACATGCATCACTTGCACGGACGTTCCGGTACCTGTGCTTGTGTTTCAATGTAACAGCCGG  
 CATGTCAATTTGTCTTGATTGCTTTCACCTCTACTGTGTGACACGCTTGAATGACAGACAATTTCG  
 TCCATGACCCACAATTGGGATACAGTTTGGCCTGCGTAGCGGGTTGTCCAAATTTCTTTGATTAA  
 GGAGCTGCATCACTTTTCGGATCCTGGGAGAAGAGCAGTACAATCGATACCAGCAGTATGGAGCT  
 GAAGAGTGTGTGCTCCAAATGGGCGGGGTTCTTTGTCCCCGGCCTGGCTGCGGCGCCGGTTTGC  
 TCCCCGAACCAGATCAGCGGAAAGTTACATGTGAGGGTGGAAATGGTCTTGGCTGTGGCTTCGC  
 GTTCTGCCGGGAGTGCAAAGAAGCGTACCATGAAGGGGAGTGCAGCGCAGTTTTTTGAGGCAAGT



GGCACGACGACCCAGGCTTACCGGGTAGACGAACGCGCAGCAGAGCAGGCCAGATGGGAAGCGG  
CCTCCAAGGAGACCATTA AAAAGACAACCAAACCTTGTCTCGGTGTCACGTGCCCCTCGAGAA  
GAACGGGGGCTGTATGCATATGAAATGCCACAAACGCAATGTAGGCTGGAATGGTGTGGAAC  
TGCGGCTGCGAATGGAATAGGGTGTGTATGGGAGACCATTTGGTTTGACGTCTAG

>последовательность нуклеиновой кислоты дикого типа человеческого паркина  
(SEQ ID NO: 4)

ATGATAGTGT TTTGTCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCA  
GCATCTTCCAGCTCAAGGAGGTGGTTGCTAAGCGACAGGGGGTTCCGGCTGACCAGTTGCGTGT  
GATTTTCGCAGGGAAGGAGCTGAGGAATGACTGGACTGTGCAGAATTGTGACCTGGATCAGCAG  
AGCATTGTTACATTGTGCAGAGACCGTGGAGAAAAGGTCAAGAAATGAATGCAACTGGAGGCG  
ACGACCCCAAGAACGCGGCGGGAGGCTGTGAGCGGGAGCCCCAGAGCTTGA CTGGGTGGACCT  
CAGCAGCTCAGTCCTCCCAGGAGACTCTGTGGGGCTGGCTGTCATTCTGCACACTGACAGCAGG  
AAGGACTCACCACCAGCTGGAAGTCCAGCAGGTAGATCAATCTACAACAGCTTTTATGTGTATT  
GCAAAGGCCCTGTCAAAGAGTGCAGCCGGGAAACTCAGGGTACAGTGCAGCACCTGCAGGCA  
GGCAACGCTCACCTTGACCCAGGGTCCATCTTGCTGGGATGATGTTTTAATTCCAAACCGGATG  
AGTGGTGAATGCCAATCCCCACACTGCCCTGGGACTAGTGCAGAATTTTTCTTTAAATGTGGAG  
CACACCCACCTCTGACAAGGAAACATCAGTAGCTTTGCACCTGATCGCAACAAATAGTCGGAA  
CATCACTTGCATTACGTGCACAGACGTCAGGAGCCCCGTCTGGTTTTCCAGTGCAACTCCCGC  
CACGTGATTTGCTTAGACTGTTTCCACTTATACTGTGTGACAAGACTCAATGATCGGCAGTTTG  
TTCACGACCCTCAACTTGCTACTCCCTGCCTTGTGTGGCTGGCTGTCCCAACTCCTTGATTAA  
AGAGCTCCATCACTTCAGGATTCTGGGAGAAGAGCAGTACAACCGGTACCAGCAGTATGGTGCA  
GAGGAGTGTGTCCTGCAGATGGGGGGCGTGTTATGCCCCCGCCCTGGCTGTGGAGCGGGGCTGC  
TGCCGGAGCCTGACCAGAGGAAAGTCACCTGCGAAGGGGGCAATGGCCTGGGCTGTGGGTTTGC  
CTTCTGCCGGGAATGTAAAGAAGCGTACCATGAAGGGGAGTGCAGTGCCGTATTTGAAGCCTCA  
GGAACAAC TACTCAGGCCTACAGAGTCGATGAAAGAGCCGCCGAGCAGGCTCGTTGGGAAGCAG  
CCTCCAAAGAAACCATCAAGAAAACCAACCAAGCCCTGTCCCCGCTGCCATGTACCAGTGGAAAA  
AAATGGAGGCTGCATGCACATGAAGTGTCCGCAGCCCCAGTGCAGGCTCGAGTGGTGCTGGAAC  
TGTGGCTGCGAGTGGAACCGCGTCTGCATGGGGGACCACTGGTTTCGACGTGTAG

>последовательность нуклеиновой кислоты ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 5)  
AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG  
GCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC  
AGAGAGGGAGTGGCCAA

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая экспрессионную конструкцию, кодирующую человеческий белок паркин (PRKN), причем данный человеческий белок PRKN кодируется кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

2. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, причем человеческий белок PRKN содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, или ее часть.

3. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1 или 2, в которой кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая человеческий белок PRKN, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 3.

4. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-3, в которой экспрессионная конструкция дополнительно содержит промотор, функционально связанный с кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты.

5. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 4, в которой промотор представляет собой конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифичный промотор.

6. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 5, в которой промотор представляет собой промотор бета-актина кур (CBA), промотор CAG или промотор JeT.

7. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-6, в которой экспрессионная конструкция фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

8. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 7, в которой ITR AAV относятся к серотипу, выбранному из группы, состоящей из ITR AAV1, ITR AAV2, ITR AAV3, ITR AAV4, ITR AAV5 и ITR AAV6.

9. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 8, в которой ITR AAV представляют собой ITR AAV2.

10. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-9.
11. Вектор по п. 10, причем данный вектор представляет собой плазмиду.
12. Вектор по п. 10, причем вектор представляет собой вирусный вектор, причем, необязательно, вирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного AAV (rAAV) или вектор на основе бакуловируса.
13. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-9 или вектор по любому из пп. 10-12.
14. Клетка-хозяин по п. 13, причем данная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, дрожжевую клетку, бактериальную клетку или клетку насекомого, причем, необязательно, клетка-хозяин представляет собой человеческую клетку.
15. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий:
- (i) капсидный белок; и
  - (ii) выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-9 или вектор по любому из пп. 10-12.
16. rAAV по п. 15, в котором капсидный белок способен проникать через барьер между кровью и головным мозгом.
17. rAAV по п. 16, в котором капсидный белок представляет собой капсидный белок AAV9 или его вариант.
18. rAAV по п. 16 или 17, причем данный rAAV трансдуцирует нейронные клетки и/или ненейронные клетки центральной нервной системы (ЦНС).
19. Композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-9, вектор по любому из пп. 10-12, клетку-хозяина по любому из пп. 13-14 или rAAV по любому из пп. 15-18.

20. Композиция по п. 19, причем данная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, и причем данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

21. Способ доставки трансгена в клетки центральной нервной системы, причем данный способ предусматривает введение субъекту гAAV по любому из пп. 14-18.

22. Способ по п. 21, в котором введение представляет собой прямую инъекцию в ткань ЦНС.

23. Способ по п. 21, в котором введение представляет собой периферическое введение, причем, необязательно, периферическое введение представляет собой внутривенную инъекцию.

24. Способ лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие болезни Паркинсона, причем данный способ предусматривает введение субъекту выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-9, вектора по любому из пп. 10-12, клетки-хозяина по любому из пп. 13-14, гAAV по любому из пп. 15-18 или композиции по любому из пп. 19-20.

25. Способ по п. 24, в котором введение предусматривает прямую инъекцию в ЦНС субъекта, причем, необязательно, прямая инъекция представляет собой интрацеребральную инъекцию, интрапаренхиматозную инъекцию, интратекальную инъекцию, инъекцию в большую цистерну (ICM) или любую их комбинацию.

26. Способ по п. 25, в котором прямая инъекция в ЦНС субъекта предусматривает конвекционную доставку (CED).

27. Способ по любому из пп. 24-26, в котором введение предусматривает периферическую инъекцию, причем, необязательно, периферическая инъекция представляет собой внутривенную инъекцию.

28. Способ по любому из пп. 24-27, причем субъект имеет мутацию в гене PRKN.

29. Способ по п. 28, причем мутация в гене PRKN содержит замену нуклеотидов, делеции или мутацию сайта сплайсинга.

30. Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую в порядке от 5' к 3':

- (a) 5' ITR AAV;
- (b) энхансер CMV;
- (c) промотор CBA;
- (d) трансген, кодирующий белок PRKN, причем белок PRKN кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 2 или 3;
- (e) WPRE;
- (f) сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста; и
- (g) 3' ITR AAV.

31. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий:

- (i) капсидный белок AAV; и
- (ii) вектор на основе rAAV по п. 30.

32. rAAV по п. 31, в котором капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV9.

33. Плазмида, содержащая вектор на основе rAAV по п. 30.

34. Вектор на основе бакуловируса, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 3.

35. Клетка, содержащая:

- (i) первый вектор, кодирующий один или несколько гер-белков аденоассоциированного вируса и/или один или несколько сар-белков аденоассоциированного вируса; и
- (ii) второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную под SEQ ID NO: 2 или 3.

36. Клетка по п. 35, в которой первый вектор представляет собой плазмиду и второй вектор представляет собой плазмиду.

37. Клетка по п. 35, причем данная клетка представляет собой клетку млекопитающего, причем, необязательно, клетка млекопитающего представляет собой клетку HEK293.

38. Клетка по п. 35, в которой первый вектор представляет собой вектор на основе бакуловируса и второй вектор представляет собой вектор на основе бакуловируса.

39. Клетка по п. 38, причем данная клетка представляет собой клетку насекомого, причем, необязательно, клетка насекомого представляет собой клетку SF9.

40. Способ получения гAAV по п. 31 или 32, причем данный способ предусматривает:

(i) доставку в клетку первого вектора, кодирующего один или несколько гер-белков аденоассоциированного вируса и/или один или несколько сар-белков аденоассоциированного вируса, и вектора на основе рекомбинантного AAV, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 2 или 3;

(ii) культивирование клеток в условиях, обеспечивающих упаковку гAAV; и

(iii) сбор культивируемых клеток-хозяев или культуральной среды для сбора гAAV.

41. Способ лечения субъекта с наличием или с подозрением на наличие болезни Паркинсона, причем данный способ предусматривает введение субъекту гAAV по п. 31 или 32.

42. Способ по п. 41, в котором введение предусматривает прямую инъекцию в ЦНС субъекта, причем, необязательно, прямая инъекция представляет собой интрацеребральную инъекцию, интрапаренхиматозную инъекцию, интратекальную инъекцию, инъекцию в большую цистерну или любую их комбинацию.

43. Способ по п. 42, в котором прямая инъекция в ЦНС субъекта предусматривает конвекционную доставку (CED).

44. Способ по любому из пп. 41, в котором введение предусматривает периферическую инъекцию, причем, необязательно, периферическая инъекция представляет собой внутривенную инъекцию.

45. Способ коррекции митохондриальной дисфункции в клетке, причем данный способ предусматривает приведение данной клетки в контакт с выделенной нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-9, вектором по любому из пп. 10-12 или гAAV по любому из пп. 15-18.

46. Способ по п. 45, в котором приведение в контакт содержит приведение клетки в контакт с некоторым количеством выделенной нуклеиновой кислоты, вектора или гAAV в количестве, достаточном для снижения окислительного стресса в клетке и/или усиления митофагии в клетке.

47. Способ по п. 45 или 46, причем клетка представляет собой клетку млекопитающего.

48. Способ по любому из пп. 45-47, причем клетка представляет собой человеческую клетку.

49. Способ по любому из пп. 45-48, причем клетка содержит одну или несколько мутаций, вставок или делеций в гене *PRKN*.

50. Способ по любому из пп. 45-49, причем клетка находится *in vitro*.

51. Способ по любому из пп. 45-49, причем клетка находится в субъекте.

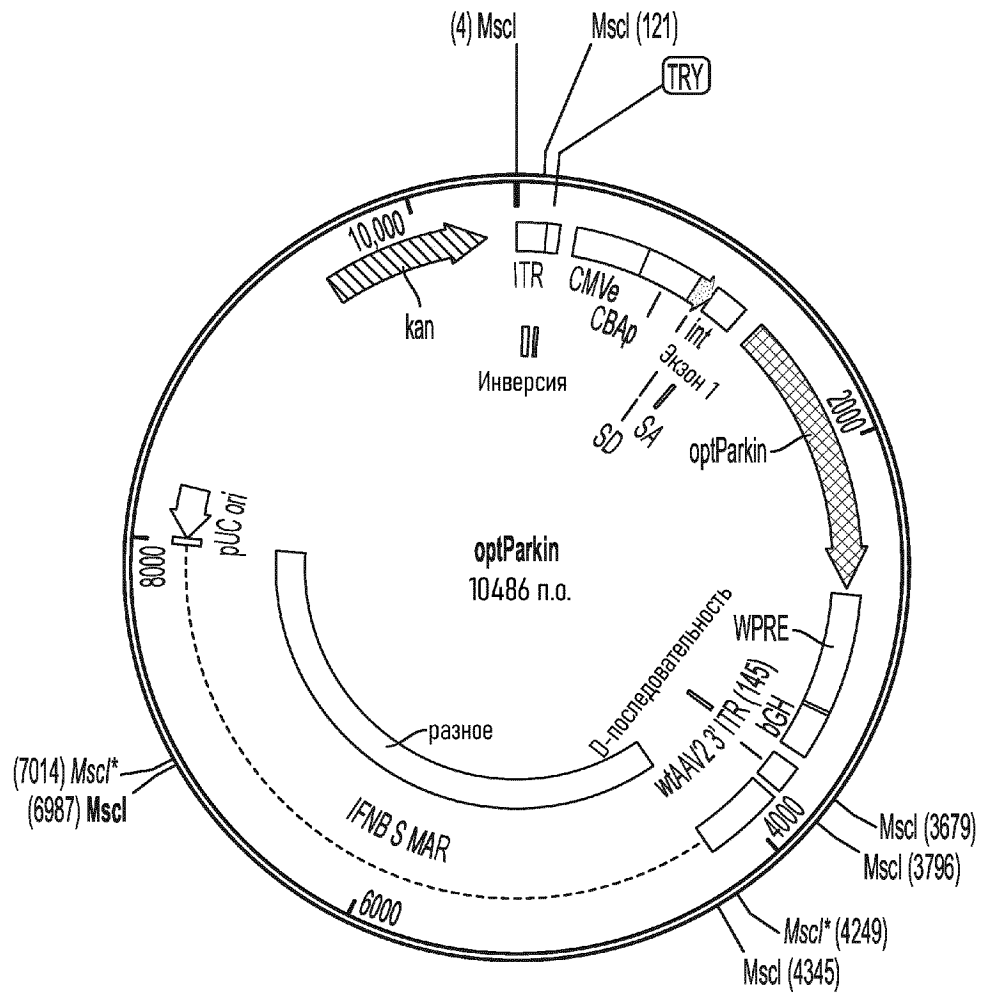
52. Способ по п. 51, в котором приведение клетки в субъекте в контакт осуществляют путем введения субъекту выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-9, вектора по любому из пп. 10-12 или гAAV по любому из пп. 15-18 посредством периферической инъекции, причем, необязательно, периферическая инъекция представляет собой внутривенную инъекцию.

53. Способ по любому из пп. 45-52, в котором после приведения в контакт митохондриальная дисфункция снижается в клетке по меньшей мере на 1% по отношению к митохондриальной дисфункции в клетке до приведения в контакт.

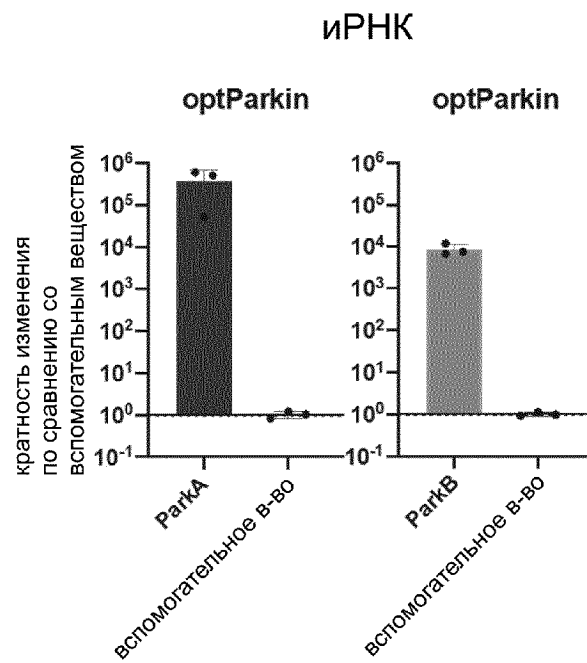
54. Способ по любому из пп. 41-44, причем субъект представляет собой млекопитающее, не являющееся человеком.

55. Способ по любому из пп. 41-44, причем субъект является субъектом-человеком.



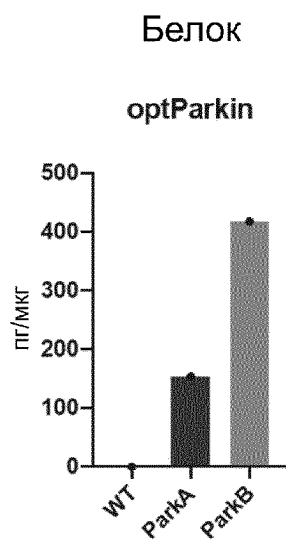


Фиг. 1

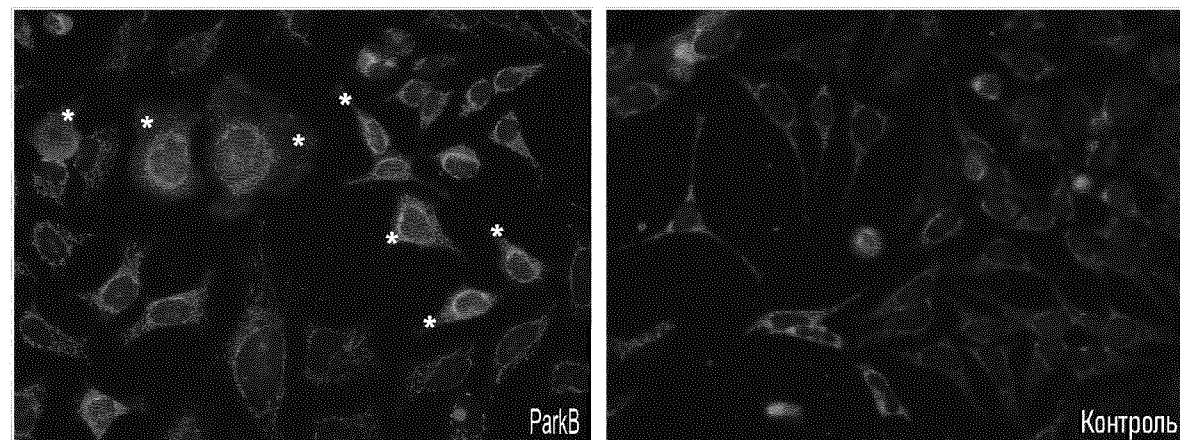


Фиг. 2А

3/6



Фиг. 2В

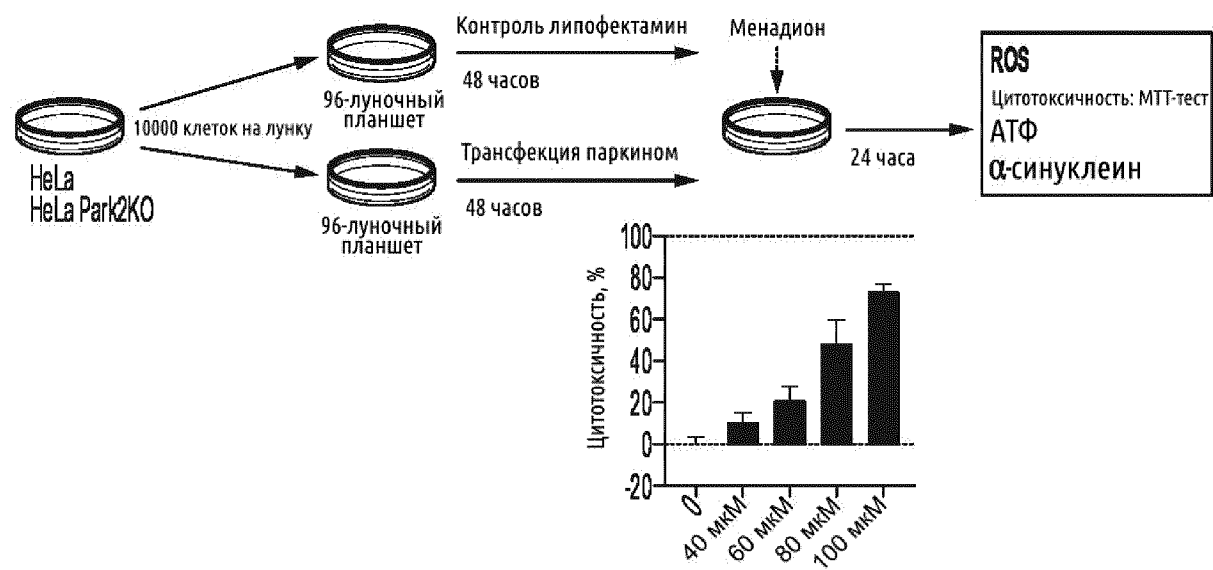


Паркин  
(\*)

DAPI  
(ядра)

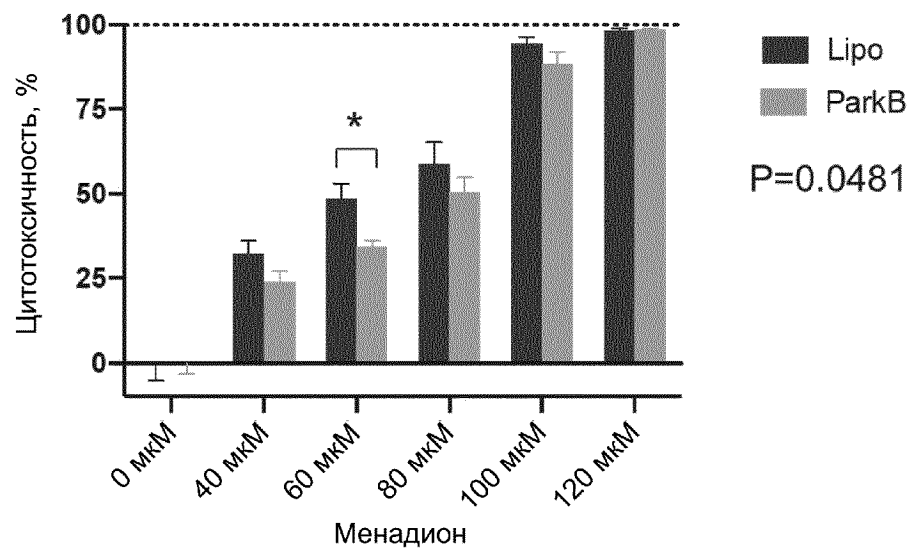
Митохондрии  
(светло-серые)

Фиг. 3



Фиг. 4А

6/6



Фиг. 4В