

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201990558** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.11.30

(22) Дата подачи заявки
2014.04.18

(51) Int. Cl. *C07K 14/47* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) **ДОСТАВКА НАЦЕЛЕННЫХ НА ЭКЗОН 2 ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ U7snRNA ПРИ ПОМОЩИ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА**

(31) 61/814,256

(32) 2013.04.20

(33) US

(62) 201592014; 2014.04.18

(71) Заявитель:
**РИСЁРЧ ИНСТИТЮТ ЭТ
НЭЙШНВАЙД ЧИЛДРЕН'С
ХОСПИТАЛ (US)**

(72) Изобретатель:

**Флэниган Кевин, Вулин-Чэффиол
Аделин, Вейн Николас (US)**

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Глухарёва А.О., Лыу
Т.Н., Угрюмов В.М., Христофоров
А.А., Гизатуллина Е.М., Гизатуллин
Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Осипенко
Н.В., Лебедев В.В., Парамонова К.В.,
Николаева О.А. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к доставке полинуклеотидов при помощи рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для лечения мышечной дистрофии Дюшенна, являющейся следствием дупликации экзона 2 DMD. В изобретении предложены продукты гAAV и способы применения гAAV в лечении мышечной дистрофии Дюшенна.

A2

201990558

201990558

A2

ДОСТАВКА НАЦЕЛЕННЫХ НА ЭКЗОН 2 ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ U7snRNA ПРИ ПОМОЩИ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА

Описание

[0001] Настоящая заявка заявляет приоритет по дате подачи предварительной заявки на патент США №. 61/814256, поданной 19 апреля 2013 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством отсылки.

Область техники

[0002] Настоящее изобретение относится к доставке полинуклеотидов при помощи рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) для лечения мышечной дистрофии Дюшенна, являющейся следствием дупликации экзона 2 *DMD*. В изобретении предложены продукты rAAV и способы применения rAAV в лечении мышечной дистрофии Дюшенна.

Включение перечня последовательностей посредством ссылки

[0003] Данная заявка содержит в виде отдельной части описания Перечень последовательностей в компьютерно-читаемой форме (название файла: 47699PCT_SeqListing.txt; 10162 байтов – текстовый файл ASCII, созданный 18 апреля 2014 г.), который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

[0004] Мышечные дистрофии (МД) представляют собой группу генетических заболеваний. Указанная группа характеризуется прогрессирующим ослаблением и дегенерацией скелетных мышц, которые управляют движением. Некоторые формы МД развиваются в младенческом или детском возрасте, в то время как другие могут не проявляться до достижения среднего и более старшего возраста. Нарушения различаются по времени распространения и степени ослабления мышц (некоторые формы МД поражают также сердечные мышцы), возрасту, на который приходится начало заболевания, скорости прогрессирования и схемы наследования.

[0005] Одной из форм МД является мышечная дистрофия Дюшенна (МДД). Она является наиболее распространенной тяжелой детской формой мышечной дистрофии, поражающей 1 из 5000 новорожденных детей мужского пола. Причиной МДД являются мутации в гене *DMD*, которые приводят к отсутствию белка дистрофина (427 КДа) в скелетных и сердечных мышцах, а также ЖК-тракте и сетчатке. Дистрофин не только защищает сарколемму от эксцентрических сокращений, но также фиксирует большое количество сигнальных белков в непосредственной близости от сарколеммы. Многие клинические случаи МДД связаны с делеционными мутациями в гене *DMD*. Несмотря на проведение большого количества исследований после идентификации гена *DMD*, возможности лечения ограничены. Кортикостероиды, несомненно, являются полезными, но, даже, несмотря на продление на годы способности передвигаться, их польза нивелируется долгосрочными побочными явлениями. Опубликованные более 20 лет назад результаты оригинального контролируемого, рандомизированного двойного слепого исследования показали наличие пользы от применения преднизона [Mendell *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 320: 1592-1597 (1989)]. В последующих работах было показано, что такой же эффективностью обладает дефлазакорт – натрий-сберегающий стероид. [Biggar *et al.*, *J. Pediatr.*, 138: 45-50 (2001)]. В недавних исследованиях также была продемонстрирована эффективность методики пропуска экзона, продлевающей дистанцию безболевого ходьбы в 6MWT (тесте шестиминутной ходьбы). До настоящего времени в опубликованных результатах клинических исследований сообщалось о пользе только в случае тех мутаций, для которых при пропуске экзона 51 происходит восстановление рамки считывания [Cirak *et al.*, *Lancet*, 378: 595-605 (2011) и Goemans *et al.*, *New Engl. J. Med.* 364: 1513-1522 (2011)]. В единственной работе, описывающей двойное слепое, рандомизированное пробное лечение, перспективные результаты демонстрировал этеплирсен – фосфородиамидат морфолино олигомер (ФМО). Во всех этих испытаниях с пропуском экзона конечным результатом было достижение фазы плато в способности к ходьбе после начального небольшого улучшения.

[0006] См. также публикации заявок на патент США № 2012/0077860, опубликованную 29 марта 2012 г.; 2013/0072541, опубликованную 21 марта 2013 г.; и 2013/0045538, опубликованную 21 февраля 2013 г.

[0007] В отличие от делеционных мутаций дупликации экзона *DMD* отвечают приблизительно за 5% приводящих к заболеванию мутаций в случае объективной выборки по пациентам с патологией дистрофина [Dent *et al.*, *Am. J. Med. Genet.*, 134(3): 295-298 (2005)], хотя в некоторых перечнях мутаций количество дупликаций выше

[включая перечень, опубликованный United Dystrophinopathy Project в Flanigan *et al.*, *Hum. Mutat.*, 30(12): 1657-1666 (2009), в котором оно составляет 11%].

[0008] Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой дефектный по репликации парвовирус, одноцепочечный ДНК-геном которого имеет длину около 4,7 тыс. п.о., включая 145-нуклеотидный инвертированный концевой повтор (ИКП). Существует множество серотипов AAV. Известны нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV. Например, полный геном AAV-1 представлен в GenBank под номером доступа NC_002077; полный геном AAV-2 представлен в GenBank под номером доступа NC_001401 и в Srivastava *et al.*, *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983); полный геном AAV-3 представлен в GenBank под номером доступа NC_1829; полный геном AAV-4 представлен в GenBank под номером доступа NC_001829; полный геном AAV-5 представлен в GenBank под номером доступа AF085716; полный геном AAV-6 представлен в GenBank под номером доступа NC_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 представлены в GenBank под номерами доступа AX753246 и AX753249, соответственно (См. также патенты № 7282199 и 7790449 в отношении AAV-8); геном AAV-9 представлен в Gao *et al.*, *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 представлен в *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); а геном AAV-11 представлен в *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). Действующие в *цис*-положении последовательности, управляющие репликацией вирусной ДНК (*гер*), капсидированием/упаковкой и интеграцией в хромосомы клетки-хозяина, находятся в ИКП AAV. Три промотора AAV (имеющие названия *p5*, *p19* и *p40*, связанные с их относительным месторасположением на карте) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены *гер* и *сар*. Два *гер*-промотора (*p5* и *p19*), связанные с дифференциальным сплайсингом единичного интрона AAV (в нуклеотидах 2107 и 2227), приводят к выработке четырех *гер*-белков (*гер* 78, *гер* 68, *гер* 52 и *гер* 40) из гена *гер*. *Рер*-белки обладают многими ферментативными свойствами, которые в значительной степени отвечают за репликацию вирусного генома. Ген *сар* экспрессируется из промотора *p40* и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативные сайты сплайсинга и неконсенсусные сайты инициации трансляции отвечают за выработку трех родственных капсидных белков. Единственный консенсусный сайт полиаденилирования расположен в позиции 95 на карте генома AAV. Жизненный цикл и генетические особенности AAV описаны в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

[0009] AAV обладает уникальными свойствами, которые обеспечивают его привлекательность в качестве вектора для доставки чужеродной ДНК в клетки, например,

в рамках генной терапии. Инфицирование клеток в культуре при помощи AAV является нецитопатическим, а естественное инфицирование людей и других животных является бессимптомным. Кроме того, AAV инфицирует большое количество клеток млекопитающих, что делает возможным нацеливание на большое количество разных тканей *in vivo*. Кроме того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и неделящиеся клетки и может в значительной степени сохраняться на протяжении всего времени жизни этих клеток в качестве транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Провирусный геном AAV является инфекционным в виде клонированной ДНК в плаزمиде, что делает возможным конструирование рекомбинантных геномов. Более того, так как сигналы, управляющие репликацией AAV, капсидированием и интеграцией генома, находятся в ИКП генома AAV, некоторая часть или вся внутренняя часть генома, составляющая приблизительно 4,3 тыс. п.о. (кодирующая репликационные и структурные капсидные белки, гер-сар) может быть замещена чужеродной ДНК. Белки гер и сар могут находиться в транс-положении. Другой существенной характеристикой AAV является то, что это исключительно стабильный и крепкий вирус. Он легко переносит условия, применяемые для инактивации аденовируса (от 56° до 65°С на протяжении нескольких часов), что делает менее критическим сохранение AAV в холоде. AAV можно даже лиофилизировать. И наконец, AAV-инфицированные клетки не устойчивы к суперинфекции.

[0010] AAV8-подобный AAV под названием rh.74 для доставки ДНК, кодирующих различные белки. Xu *et al.*, *Neuromuscular Disorders*, 17: 209-220 (2007) и Martin *et al.*, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 296: 476-488 (2009) относятся к экспрессии rh.74 GalNAc-трансферазы цитотоксических Т-клеток в случае мышечной дистрофии Дюшенна. В Rodino-Klapac *et al.*, *Mol. Ther.*, 18(1): 109-117 (2010) описана экспрессия AAV rh.74 продукта слияния микродистрофина с белковой меткой FLAG после доставки AAV rh.74 путем перфузии в сосуды конечностей.

[0011] Мышечные дистрофии представляют собой группу заболеваний, для которых не существует определенного вида лечения и которые негативно сказываются на отдельных людях, семьях и обществе. Затраты не поддаются учету. Люди страдают от эмоционального напряжения и сниженного качества жизни, связанных с потерей самооценки. Чрезвычайные физические трудности вследствие утраты функциональности конечностей создают сложности в повседневной жизни. Семейная динамика страдает из-за материальных убытков и трудностей в межличностных взаимоотношениях. Братья и сестры пораженных детей чувствуют отчуждение, а конфликты между супругами часто

приводят к разводам, в особенности, если ответственность за мышечную дистрофию можно возложить на одного из родителей. Необходимость поисков лечения часто становится основной задачей всей жизни, что оказывает негативное влияние и затрудняет каждый аспект жизни. За пределами семьи общество несет финансовое бремя вследствие необходимости в добавочных средствах для того, чтобы ликвидировать ограничение населения с мышечной дистрофией в специальном образовании, специальной транспортировке и средствах для регулярной госпитализации для лечения регулярных инфекций дыхательных путей и сердечных осложнений. Финансовые обязательства распределяются между региональными и федеральными государственными органами, которые распространяют эти обязательства на налогоплательщиков.

[0012] Следовательно, в данной области остается необходимость в средствах лечения мышечных дистрофий, включая МДД.

Описание

[0013] В настоящем изобретении предложены способы и продукты для предотвращения, замедления прогрессирования и/или лечения МДД, которая вызвана дупликацией экзона 2 гена *DMD*. Способы включают применение AAV в качестве вектора для доставки полинуклеотидной конструкции, кодирующей малую ядерную РНК U7 и антисмысловую последовательность, нацеленную на экзон 2 – «нацеленную на экзон 2 полинуклеотидную конструкцию U7snRNA». Например, полинуклеотидную конструкцию вставляют в геном гAAV rh.74, геном гAAV6 или геном гAAV9. Полинуклеотидная последовательность генома AAV rh.74 приведена на Фигуре 7 и в виде SEQ ID №: 1.

[0014] Типовые нацеленные на экзон 2 антисмысловые последовательности включают, но не ограничиваются этим,

U7B TCAAAAGAAAACATTCACAAAATGGGTA (SEQ ID №: 3);

U7Along GTTTTCTTTTGAAGATCTTCTTTTCATcta (SEQ ID №: 4);

U7Ashort AGATCTTCTTTTCATcta (SEQ ID №: 5); и

U7C GCACAATTTTCTAAGGTAAGAAT (SEQ ID №: 6).

[0015] В одном аспекте предложен способ облегчения МДД у пациента. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ включает этап введения пациенту гAAV, при этом геном гAAV содержит нацеленную на экзон 2 полинуклеотидную конструкцию U7snRNA.

[0016] В другом аспекте в изобретении предложен способ подавления прогрессирующей дистрофической патологии, связанной с МДД. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ включает этап введения пациенту гAAV, при этом геном гAAV содержит нацеленную на экзон 2 полинуклеотидную конструкцию U7snRNA.

[0017] В другом аспекте предложен способ улучшения мышечной функции у пациента, страдающего МДД. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ включает этап введения пациенту гAAV, при этом геном гAAV содержит нацеленную на экзон 2 полинуклеотидную конструкцию U7snRNA. В некоторых случаях улучшение мышечной функции состоит в улучшении мышечной силы. Улучшение мышечной силы определяют известными в данной области техники способами, такими как тест на максимальное произвольное изометрическое напряжение (MVIC). В некоторых случаях улучшение мышечной функции состоит в улучшении стабильности в отношении возможности стоять и ходить. Улучшение в стабильности определяют известными в данной области техники способами, такими как тест 6-минутной ходьбы (6MWT) или лестничная проба.

[0018] В другом аспекте в изобретении предложен способ доставки нацеленной на экзон 2 полинуклеотидной конструкции U7snRNA животному (включая, но не ограничиваясь этим, человека). В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ включает этап введения пациенту гAAV, при этом геном гAAV содержит нацеленную на экзон 2 полинуклеотидную конструкцию U7snRNA.

[0019] Эффективность трансдукции клеток в вышеописанных способах согласно изобретению может составлять по меньшей мере около 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 процентов.

[0020] В некоторых вариантах реализации вышеуказанных способов вирусный геном является самокомплементарным. В некоторых вариантах реализации указанных способов в геноме гAAV отсутствует ДНК гер и сар AAV. В некоторых вариантах реализации указанных способов гAAV представляет собой SC гAAV U7_ACCA, содержащую типовой геном, приведенный на Фигуре 9. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV представляет собой гAAV rh.74. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV представляет собой гAAV6. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV представляет собой гAAV9.

[0021] В другом аспекте в изобретении предложен гAAV, содержащий капсид AAV rh.74 и геном, содержащий типовую нацеленную на экзон 2 полинуклеотидную конструкцию U7snRNA – U7_ACCA. В некоторых вариантах реализации изобретения в геноме гAAV отсутствует ДНК гер и сар AAV. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV содержит самокомплементарный геном. В некоторых вариантах реализации указанных способов гAAV представляет собой SC гAAV U7_ACCA, содержащую типовой геном, приведенный на Фигуре 9. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV представляет собой гAAV rh.74. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV представляет собой гAAV6. В некоторых вариантах реализации изобретения гAAV представляет собой гAAV9.

[0022] Геномы рекомбинантных AAV согласно изобретению содержат один или более ИКП AAV, фланкирующих по меньшей мере одну нацеленную на экзон 2 полинуклеотидную конструкцию U7snRNA. Отдельно рассмотрены геномы с нацеленными на экзон 2 полинуклеотидными конструкциями U7snRNA, каждая из которых содержит нацеленные на экзон 2 антисмысловые последовательности, приведенные в параграфе [0012], а также геномы с нацеленными на экзон 2 полинуклеотидными конструкциями U7snRNA, содержащими любые возможные комбинации двух или более нацеленных на экзон 2 антисмысловых последовательностей, приведенных в параграфе [0012]. В некоторых вариантах реализации изобретения, включая проиллюстрированные варианты реализации изобретения, полинуклеотид U7snRNA содержит собственный промотор. ДНК AAV в геноме гAAV может быть получена из AAV любого серотипа, для которого можно получить рекомбинантный вирус, включая, но не ограничиваясь этим, серотипы AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 и AAV-11. Как отмечалось в приведенном выше разделе, описывающем уровень техники, нуклеотидные последовательности геномов разных серотипов AAV известны в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения промоторные ДНК представляют собой мышечно-специфические регуляторные элементы, включая, но не ограничиваясь этим, полученные из семейств актиновых и миозиновых генов, такие как полученные из семейства генов *myoD* [См. Weintraub *et al.*, *Science*, 251: 761-766 (1991)], миоцит-специфический связывающий (энхансерный) фактор MEF-2 [Cserjesi and Olson, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 4854-4862 (1991)], регуляторные элементы, полученные из человеческого гена актина скелетных мышц [Muscat *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 4089-4099 (1987)], гена актина сердечных мышц, элементы последовательности мышечной креатинкиназы [Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393-3399 (1989)] и энхансерный элемент мышечной креатинкиназы

(МСК), десминовый промотор, регуляторные элементы, полученные из гена быстросокращающегося тропонина С скелетных мышц, гена медленносокращающегося тропонина С сердечных мышц и гена медленносокращающегося тропонина I: гипоксия-индуцибельные ядерные факторы [Semenza *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5680-5684 (1991)], стероид-индуцибельные элементы и промоторы, включая глюкокортикоид-ответные элементы (GRE) [См. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5603-5607 (1993)], и другие регуляторные элементы.

[0023] ДНК-плазмиды согласно изобретению содержат геномы гAAV согласно изобретению. ДНК-плазмиды переносятся в клетки, которые можно инфицировать, посредством вируса-помощника AAV (*например*, аденовируса, аденовируса с удаленным E1 или вируса герпеса) для сборки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Способы получения частиц гAAV, в которых геном AAV, который необходимо упаковать, гены гер и сар и функции вируса-помощника вводят в клетку, являются стандартными в данной области техники. Для получения гAAV необходимо присутствие в одной клетке (называемой в данном документе пакующей клеткой) следующих компонентов: генома гAAV, генов гер и сар AAV отдельно от (*т.е.* не в составе) генома гAAV и функций вируса-помощника. Рер-гены AAV могут быть получены из AAV любого серотипа, для которого можно получить рекомбинантный вирус, и могут быть получены из серотипа AAV, отличного от ИКП генома гAAV, включая, но не ограничиваясь этим, серотипы AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 и AAV-11. Отдельно рассмотрено применение когнатных компонентов. Получение псевдотипированного гAAV описано, например, в WO 01/83692, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[0024] Способ получения пакующей клетки состоит в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для получения AAV-частицы. Например, в геном клетки интегрируется плазида или (множественные плазмиды), содержащая геном гAAV, в котором отсутствуют гер и сар гены AAV, гер и сар гены AAV отдельно от генома гAAV и селективируемый маркер, такой как ген устойчивости к неомицину. Геномы AAV вносили в бактериальные плазмиды при помощи таких процедур, как GC-присоединение (Samulski *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой (Laughlin *et al.*, 1983, *Gene*, 23:65-73) или прямое лигирование тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, *J. Biol. Chem.*, 259:4661-4666). Затем пакующую клеточную линию инфицируют вирусом-помощником, таким как

аденовирус. Преимущества этого способа состоят в том, что клетки являются селективируемыми и подходят для крупномасштабного получения гAAV. В других примерах подходящих способов для внесения геномов гAAV и/или гер и сар генов в пакующие клетки вместо плазмид применяется аденовирус или бакуловирус.

[0025] Обзор основных принципов получения гAAV приведен, например, в Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539; и Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbial. and Immunol.*, 158:97-129). Различные подходы описаны в Ratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072 (1984); Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984); Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251 (1985); McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828); патент США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующий патент США № 5658776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) *Vaccine* 13:1244-1250; Paul et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:609-615; Clark et al. (1996) *Gene Therapy* 3:1124-1132; патент США № 5786211; патент США № 5871982; и патент США № 6258595. Вышеуказанные документы в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки с особенным акцентом на тех разделах документов, которые относятся к получению гAAV.

[0026] Таким образом, в настоящем изобретении предложены пакующие клетки, которые вырабатывают инфекционный гAAV. В одном варианте реализации изобретения пакующие клетки могут представлять собой стабильно трансформированные раковые клетки, такие как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (когнатная линия 293). В другом варианте реализации изобретения пакующие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такие как многократно пассированные клетки 293 (человеческие фетальные клетки почек, трансформированные E1 аденовирусом), клетки MRC-5 (человеческие фетальные фибробласты), клетки WI-38 (человеческие фетальные фибробласты), клетки Vero (клетки почек обезьяны) и клетки FRhL-2 (фетальные клетки легких макака-резуса).

[0027] гAAV можно очищать стандартными в данной области техники способами, такими как колоночная хроматография или центрифугирование в градиенте плотности хлорида цезия. Способы очистки гAAV-векторов от вируса-помощника известны в данной области техники и включают способы, раскрытые, например, в Clark et al., *Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, *Methods Mol. Med.*, 69 427-443 (2002); патенте США № 6,566,118 и WO 98/09657.

[0028] В другом варианте реализации в изобретении рассмотрены композиции, содержащие гAAV согласно настоящему изобретению. Композиции согласно изобретению содержат гAAV в фармацевтически приемлемом носителе. Композиции также могут содержать другие ингредиенты, такие как разбавители. Подходящие носители и разбавители нетоксичны для реципиентов и предпочтительно являются инертными в применяемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный или другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахарные спирты, такие как манит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как ионы натрия; и/или неионные сурфактанты, такие как твин, плуроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0029] Стерильные растворы для инъекций готовят путем внесения необходимого количества гAAV в соответствующий растворитель, при необходимости, с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, с последующей фильтрующей стерилизацией. В общем случае дисперсии готовят путем внесения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из вышеперечисленных. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъеклируемых растворов предпочтительными способами приготовления являются методы вакуумной сушки и лиофилизации, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный необходимый ингредиент из их предварительно стерильно-отфильтрованного раствора.

[0030] Титры гAAV, предназначенного для введения в способах согласно настоящему изобретению, будут варьироваться в зависимости, например, от конкретного гAAV, режима введения, цели лечения, индивида и типа(ов) клеток-мишеней, и могут быть определены стандартными в данной области техники способами. Диапазон титров гAAV может составлять от около 1×10^6 , около 1×10^7 , около 1×10^8 , около 1×10^9 , около 1×10^{10} , около 1×10^{11} , около 1×10^{12} , около 1×10^{13} до около 1×10^{14} или более устойчивых к ДНКазе частиц (УДЧ) на мл. Дозировки также можно выражать в единицах вирусных геномов (вг) (*т.е.* 1×10^7 вг, 1×10^8 вг, 1×10^9 вг, 1×10^{10} вг, 1×10^{11} вг, 1×10^{12} вг, 1×10^{13} вг, 1×10^{14} вг, соответственно).

[0031] В изобретении рассмотрены способы трансдукции клетки-мишени (*например*, скелетных мышц) гAAV *in vivo* или *in vitro*. Указанные способы включают этап введения эффективной дозы или эффективных многократных доз композиции, содержащей гAAV согласно изобретению, нуждающемуся в этом животному (включая человека). Если дозу вводят до развития МДД, введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития МДД, введение является терапевтическим. В вариантах реализации изобретения эффективная доза представляет собой дозу, которая приводит к облегчению (устранению или снижению) по меньшей мере одного симптома, связанного с МДД, лечение которой проводится, которая замедляет или предотвращает прогрессирование до МДД, которая замедляет или предотвращает прогрессирование нарушения/болезненного состояния, которая снижает степень заболевания, которая приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или которая продлевает срок жизни.

[0032] Введение эффективной дозы композиций можно осуществлять стандартными в данной области техники путями, включая, но не ограничиваясь этим, внутримышечный, парентеральный, внутривенный, пероральный, буккальный, назальный, ингаляционный, внутричерепной, внутрикостный, внутриглазной, ректальный или вагинальный. Путь(и) введения и серотип(ы) AAV-компонентов гAAV (в частности, ИКП AAV и капсидный белок) согласно изобретению могут быть выбраны и/или подобраны специалистами в данной области техники, принимая во внимание инфекцию и/или болезненное состояние, лечение которых проводится, и клетки/ткань(и)-мишени. В некоторых вариантах реализации изобретения путем введения является внутримышечный путь. В некоторых вариантах реализации изобретения путем введения является внутривенный путь.

[0033] Также в изобретении рассмотрена комбинированная терапия. В контексте данного документа комбинирование включает одновременное лечение или последовательное лечение. В частности, рассмотрено комбинирование способов согласно изобретению со стандартными видами медицинского лечения (*например*, кортикостероидами и/или иммуносупрессивными лекарственными препаратами), а также комбинирование с другими видами терапии, такими как те, которые представлены выше в разделе, описывающем уровень техники.

Краткое описание чертежей

[0034] Фигура 1 иллюстрирует гистологический и иммунофлуоресцентный анализ мышц мышцы Dup2.

[0035] Фигура 2 иллюстрирует иммуноблоты, полученные при проведении вестерн-блот анализа мышц мыши Dup2.

[0036] Фигура 3 иллюстрирует, что пропуск продублированного экзона 2 в MyoD-трансдифференцированном миобласте, индуцированный АОН, направленными на энхансер сплайсинга экзона, приводит к получению 39% транскрипта дикого типа. Дозировка для каждого ряда приведена в нмолях (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500). Количество варьирующихся транскриптов приведено под каждым рядом, а максимальное залито цветом. ТБ = трансфекционный буфер. НСМ = нормальные скелетные мышцы. Процент дубликаций экзона 2, дт и делеций экзона 2 приведен под каждым рядом.

[0037] Фигура 4 иллюстрирует подход с применением вектора U7snRNA для пропуска экзона. U7snRNA применяют в качестве носителя для нацеливания на пре-матричную РНК. Она состоит из петли, используемой для ядерно-цитоплазматического экспорта, последовательности распознавания для связывания с белками Sm, используемыми для эффективной сборки между U7snRNA и пре-мРНК-мишенью, и антисмысловой последовательности для нацеливания на пре-мРНК. Она содержит свой собственный промотор и 3' нижележащие последовательности. Затем кассету U7 клонируют в AAV-плазмиду для получения вектора.

[0038] Фигура 5 иллюстрирует результаты ОТ-ПЦР для экспериментов по пропуску экзона с применением векторов SC rAAV для трансдуцирования иммортализованных человеческих фибромиобластов Dup2 типовыми нацеленными на экзон 2 конструкциями U7snRNA.

[0039] На Фигуре 6 (A-D) представлены результаты экспериментов по пропуску экзона *in vivo*, в которых U7_ACCA SC rAAV доставляли путем внутримышечной инъекции Dup2 мышам.

[0040] На Фигуре 7 представлена геномная последовательность rh74 (SEQ ID №: 1), в которой нуклеотиды 210-2147 представляют собой открытую рамку считывания гена Rep78, 882-208 представляют собой открытую рамку считывания гена Rep52, 2079-2081 представляют собой стоп-кодон Rep78, 2145-2147 представляют собой стоп-кодон Rep78, 1797-1800 представляют собой донорный сайт сплайсинга, 2094-2097 представляют собой акцепторный сайт сплайсинга, 2121-2124 представляют собой акцепторный сайт сплайсинга, 174-181 представляют собой промотор p5 +1 прогнозируемый, 145-151 представляют собой ТАТА-бокс p5, 758-761 представляют собой промотор p19 +1 прогнозируемый, 732-738 представляют собой ТАТА-бокс p19, 1711-1716 представляют

собой ТАТА-боксы р40, 2098-4314 представляют собой открытую рамку считывания гена VP1 Cap, 2509-2511 представляют собой стартовый кодон VP2, 2707-2709 представляют собой стартовый кодон VP3 и 4328-4333 представляют собой сигнал полиА .

[0041] Фигура 8 иллюстрирует карту плазмиды с вставкой генома AAV типовой нацеленной на экзон 2 U7snRNA.

[0042] Фигура 9 иллюстрирует последовательность ДНК вставки генома AAV (SEQ ID №: 2) для плазмиды, представленной на Фигуре 8.

[0043] На Фигуре 10 вертикальные столбики указывают на приблизительное расположение зонда MLPA.

[0044] На Фигуре 11 приведено схематическое изображение вектора, применяемого при получении мыши mdx^{dup2} (Dup2).

[0045] Фигура 12 (a-e) иллюстрирует результаты внутримышечной доставки AAV1 U7-ACCA мышам Dup2.

[0046] Фигура 13 (a-f) иллюстрирует результаты внутривенной инъекции AAV9 U7-ACCA в мышиную модель Dup2.

Примеры

[0047] Аспекты и варианты реализации изобретения проиллюстрированы следующими примерами.

Пример 1

Выделение AAV rh.74

[0048] Уникальный серотип AAV выделяли из лимфатического узла макака-резуса при помощи новой методики под названием Линейная Амплификация по типу Катящегося Кольца. Применяя способ ЛАКК, проводили амплификацию двухцепочечных циклических AAV-геномов, полученных от нескольких макак-резус. Данный способ базируется на способности амплифицировать циклические AAV-геномы путем изотермической амплификации по типу катящегося кольца с применением ДНК-полимеразы фага phi29 и AAV-специфических праймеров. Продукты ЛАКК представляют собой непрерывные матрицы «голова-к-хвосту» циклических AAV-геномов, из которых выделяли полноразмерные молекулярные клоны Rep-Cap AAV. Проводили секвенирование четырех изолятов, а для прогнозированных аминокислотных

последовательностей для OPC Rep и Cap проводили выравнивание и сравнения с ранее опубликованными серотипами (Таблица). Проводили анализ белковых последовательностей VP1, который выявил наличие гомологии с изолятами клад D, E AAV нечеловеческих приматов (НЧП) и AAV 4-подобного вируса. Анализ OPC Rep78 (верхняя часть Таблицы) выявил высокую степень гомологии с AAV 1 (98-99%).

Таблица 1

	AAV 1	AAV 4	AAV 7	AAV 8	rh.73	rh.74	rh.75	rh.76
AAV 1		90	98	95	98	98	99	
AAV 4	63		90	87	90	90	90	
AAV 7	85	63		96	97	98	98	
AAV 8	84	63	88		97	97	95	
rh.73	79	61	83	80		99	99	
rh.74	84	63	88	93	80		99	
rh.75	65	82	82	64	62	64		
rh.76	85	63	91	86	84	86	84	

Сходство опубликованных последовательностей AAV и новых последовательностей AAV, определенное при помощи однопарного выравнивания по методу Липмана-Пирсона, осуществленного при помощи программного обеспечения MegAlign в DNASTAR (DNASTAR Inc.). Числа, набранные обычным шрифтом (вверху, справа), представляют сходство последовательностей Rep78, а числа, набранные жирным шрифтом (внизу, слева), представляют сходство капсидных последовательностей VP1.

[0049] Из образца ткани одного макака-резуса (rh426-M) получили дивергентный AAV8-подобный изолят под названием rh.74, который обладает 93% идентичности последовательности с AAV8. Нуклеотидная последовательность генома rh.74 приведена на Фигуре 7 и в виде SEQ ID №: 1.

[0050] Последовательность капсидного гена rh.74 клонировали в AAV плазмиду-помощника, содержащую ген Rep из AAV2, чтобы обеспечить функции репликации вектора для получения рекомбинантного AAV-вектора.

Пример 2

Модели МДД

Примеры моделей дубликации экзона 2 МДД включают следующие *in vivo* и *in vitro* модели.

Мышиная модель *mdx^{dup2}*

[0051] Разрабатывали линию мышей, несущих дупликацию экзона 2 в пределах локуса *Dmd*. Мутация, связанная с дупликацией экзона 2, является наиболее распространенной человеческой дупликационной мутацией и приводит к развитию относительно тяжелой формы МДД.

[0052] Сначала по данным White et al., *Hum. Mutat.*, 27(9): 938-945 (2006), исследовали максимальное содержание 11 разных дупликаций экзона 2 у человека при помощи МАЛЗ (мультиплексной амплификации лигированных зондов) и ПЦР длинных фрагментов. Результаты приведены на Фигуре 10. На Фигуре 10 каждый вертикальный столбик указывает на приблизительное расположение МАЛЗ-зонда. Заштрихованные колонки представляют два выявленных переменных участка; их использовали для определения расположения вставки по гомологии кассеты экзона 2 у мышей.

[0053] Карта инсерционного вектора приведена на Фигуре 11. На карте обозначены числами относительные позиции сайтов клонирования и экзонов и сайтов рестрикции. Нео-кассета имеет то же направление гена, а точка вставки находится точно в 32207/32208 п.о. в интроне 2. С каждой стороны вставленного экзона 2 находятся по меньшей мере 150 п.о. добавочных интронных последовательностей, длина участка E2 составляет 1775-2195 п.о. Размеры экзона 2 и интрона 2 составляют 62 п.о. и 209572 п.о., соответственно.

[0054] Клетки самцов C57BL/6 ES трансфицировали вектором, несущим конструкцию экзона 2, а вставку затем проверяли при помощи ПЦР. Был обнаружен один хороший клон, который амплифицировали и инъецировали в большое количество бластоцитов мышей-альбиносов BL/6. Инъецированные бластоциты имплантировали в реципиентных мышей. Ген дистрофина, полученный от химерных самцов, проверяли при помощи ПЦР, а затем – ОТ-ПЦР. Колония была расширена и содержит некоторое количество самок мышей размноженных до достижения гомозиготности.

[0055] Фигура 1 и Фигура 2 демонстрируют, что экспрессия дистрофина в мышцах 4-недельных гемизиготных мышей *mdxdup2* практически отсутствует. (Как видно на Фигуре 2, следы экспрессии можно выявить, используя С-терминальное антитело, но не специфическое к экзону 1 антитело Manex1A, что согласуется с очень слабой трансляцией из альтернативного сайта инициации трансляции экзона 6, как было описано ранее).

Иммортализованные и условно-индуцибельные клеточные линии fibroMyoD

[0056] Экспрессия гена MyoD в фибробластах млекопитающих приводит к трансдифференцировке клеток в миогенную линию. Такие клетки могут впоследствии дифференцироваться в мышечные трубочки и экспрессируют мышечные гены, включая ген DMD.

[0057] Получали иммортализованные клеточные линии, которые в определенных условиях экспрессируют MyoD под управлением тетрациклин-индуцибельного промотора. Этого достигали путем стабильной трансфекции линий первичных фибробластов лентивирусом, содержащим тет-индуцибельный MyoD и содержащим ген человеческой теломеразы (TER). Полученные в результате стабильные линии позволяют инициировать экспрессию MyoD путем обработки доксициклином. Такие клеточные линии получали от пациентов с МДД, несущих дупликацию экзона 2.

[0058] При помощи указанной линии был продемонстрирован пропуск дупликации с применением 2'-О-метил антисмысловых олигомеров (АОН), предоставленных доктором Стивом Уилтоном (Steve Wilton) (Перт, Австралия). Были исследованы множественные клеточные линии. Результаты, полученные для типовых клеточных линий, приведены на Фигуре 3.

Временно MyoD-трансфицированные первичные клеточные линии

[0059] Проводили контрольно-проверочные эксперименты с применением линий первичных фибробластов, временно трансфицированных аденовирусом-MyoD. Аденовирусные конструкции не интегрировались в геном клеток, но при этом происходила временная экспрессия MyoD. Достигнутая в результате экспрессия DMD была достаточной для проведения экспериментов по пропуску экзонов (хотя для воспроизводимости больше подходят стабильно трансфицированные линии).

Пример 3

Эффективность U7snRNA-опосредованного пропуска мутаций, связанных с дупликацией экзона 2

[0060] Были разработаны продукты и способы для вирусно-опосредованного пропуска дублированных экзонов. Продукты и способы были модифицированы по сравнению с U7snRNA-системами, описанными в Goyenvalle *et al.*, *Science*, 306(5702): 1796-1799 (2004) или Goyenvalle *et al.*, *Mol. Ther.*, 20(6): 1796-1799 (2004).

[0061] U7snRNA модифицировали, чтобы включить нацеленную антисмысловую последовательность для того, чтобы она препятствовала сплайсингу в заданном экзон-мишени (Фигура 4). В частности, были сконструированы четыре новых нацеленных на экзон 2 последовательности на основании результатов исследований АОН, описанных в Примере 2.

U7B TCAAAAGAAAACATTCACAAAATGGGTA (SEQ ID №: 3)

U7Along GTTTTCTTTTGAAGATCTTCTTTTCATcta (SEQ ID №: 4)

U7Ashort AGATCTTCTTTTCATcta (SEQ ID №: 5)

U7C GCACAATTTTCTAAGGTAAGAAT (SEQ ID №: 6)

Получали конструкции U7snRNA, включая нацеленные на экзон 2 последовательности. Каждая конструкция U7snRNA содержала одну из нацеленных последовательностей. Также получали конструкции U7snRNA, нацеленные на некоторые другие избранные экзоны (на основании вышеописанных исследований MyoD-трансдифференцированных клеточных линий). Затем получали самокомплементарные (SC) AAV векторы с геномами, содержащими одну или более из конструкций U7snRNA.

[0062] Для экспериментов в клеточной культуре и для внутримышечной инъекции мышам Dup2 применяли rAAV1 векторы. Рекомбинантные SC AAV векторы необходимого серотипа AAV получали, используя модифицированный подход перекрестной упаковки при помощи плазмиды, содержащей необходимый векторный ген, методом тройной трансфекции плазмидной ДНК (с преципитацией CaPO₄) в клетках HEK293 без применения аденовируса [Rabinowitz *et al.*, *J. Virol.*, 76:791–801 (2002)]. Вектор получали путем котрансфекции AAV плазмидой-помощником и аденовирусной плазмидой-помощником тем же способом, что был описан ранее [Wang *et al.*, *Gene Ther.*, 10:1528–1534 (2003)]. Аденовирусная плаزمиды-помощник (pAdhelper) экспрессирует аденовирусные гены типа 5 E2A, E4ORF6 и VA I/II RNA, которые необходимы для получения высоких титров rAAV.

[0063] Векторы очищали из осветленных лизатов клеток 293 методом очистки в непрерывном градиенте плотности йодиксанола и анионообменной колоночной хроматографии, используя линейный градиент соли NaCl, как было описано ранее [Clark *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10:1031–1039 (1999)]. Титры векторных геномов (вг) определяли

методом КПЦР на основании выявления при помощи группы специфических праймеров/зондов, используя детекторную систему Prism 7500 Taqman (PE Applied Biosystems), как было описано ранее (Clark *et al.*, выше). Исходные векторные титры соответствовали диапазону $1-10 \times 10^{12}$ вг/мл.

[0064] Начальный анализ пропуска экзонов проводили методом ОТ-ПЦР, используя SC гAAV векторы, чтобы трансдуцировать иммортализованные человеческие фибромиобласты Dup2. Иммортализованные человеческие фибромиобласты Dup 2, которые были способны трансдифференцироваться в клетки мышечной линии дифференцировки под управлением доксицилина, получали путем трансдукции экспрессирующих теломеразу и тет-индуцибельных экспрессирующих MyoD векторов. Конвертированные человеческие фибромиобласты (ФМ) затем трансдуцировали SC гAAV, несущим разные конструкции U7, содержащие антисмысловые последовательности экзона 2.

[0065] На Фигуре 5 показаны результаты ОТ-ПЦР для конструкций SC гAAV-U7 с тремя разными антисмысловыми последовательностями. На Фигуре 5, «(4C)» означает, что четыре копии конструкции U7 были включены в векторный геном, «+» означает более высокую дозу и «U7_ACCA A=Along» означает векторный геном (показанный на карте плазмиды на Фигуре 8, и последовательность которого, SEQ ID №: 2, приведена на Фигуре 9), который содержит последовательно расположенные четыре нацеленные на экзон 2 полинуклеотидные конструкции U7snRNA: первую конструкцию U7Along, первую конструкцию U7C, вторую конструкцию U7C и вторую конструкцию U7Along. Как показано, для SC гAAV U7_ACCA A-Along (в другом месте данного документа обозначенной как U7_ACCA SC гAAV1) был достигнут более высокий процент пропуска экзона 2 по сравнению с любыми другими векторными конструкциями.

[0066] В последующих экспериментах эффективность пропуска экзонов анализировали *in vivo*. Наиболее эффективный AAV-U7 вектор, U7_ACCA SC гAAV1, был выбран для проведения внутримышечной инъекции Dup2 мышам Dup2. Результаты приведены ниже на Фигуре 6 (A-D), где (A) иллюстрирует окрашивание дистрофина в случае восстановления экспрессии белка, локализованной в мембранах многих мышечных волокон; (B) восстановление белка подтверждали методом вестерн-блоттинга. Результаты ОТ-ПЦР показывают (C) дозозависимый единичный или двойной пропуск у мышей Dup2, а также (D) эффективный пропуск у мышей дикого типа.

[0067] Таким образом, была сконструирована высокоэффективная AAV-опосредованная U7snRNA для пропуска экзона 2, которая позволяет восстанавливать дистрофин

субсарколеммы. Будет проведено сравнение сердечной функции; оценки силы ДРП (длинного разгибателя пальцев) и диафрагмы; тестирования на бегущей дорожке и приподнятой перекладине для необработанных и обработанных мышей.

На основании степени экспрессии дистрофина, регистрируемой в инъецированных мышцах, U7_ACCA SC rAAV была выбрана для проведения дополнительных экспериментов для внутривенной доставки первой группе при $1E11$ вг/кг, с последующим дозированием второй группы на один log выше. Инъекцию будут осуществлять в возрасте четырех недель и проводить физиологическую и гистопатологическую оценку животных на 10 и 24 недели ($n = 8$ животных на группу), как описано выше.

Пример 4

Внутримышечная доставка U7-ACCA при помощи AAV1 приводит к существенной экспрессии N-усеченного дистрофина у мышей Dup2

[0068] rAAV1, содержащий геномную вставку, приведенную на Фигуре 9, получали способами, описанными в Примере 3. Затем AAV.1U7-ACCA вводили мышам Dup2 путем внутримышечной инъекции.

[0069] Для мРНК *DMD* проводили ОТ-ПЦР через 4 недели после внутримышечной инъекции в переднюю большеберцовую мышцу (ПБМ) $5e11$ vg AAV.1U7-ACCA, которая показывала практически полный пропуск обеих копий экзона 2 животных Dup2 [Фигура 12(a)].

[0070] Результаты иммуноблоттинга с применением C-терминального антитела (PA1-21011, ThermoScientific), проведенного через месяц после инфицирования, показали наличие значительной экспрессии N-усеченной изоформы (звездочки) как у Dup2, так и у контрольных B16 мышей [Фигура 12(b)]. Белок, выработка которого была индуцирована у самцов B16, инъецированных U7-ACCA, имел такой же размер, что и экспрессируемый у обработанных животных Dup2, что подтверждает разницу в размере между этим белком и полноразмерной изоформой.

[0071] Иммунофлуоресцентное окрашивание дистрофина, β -дистрогликана и нейрональной синтазы оксида азота продемонстрировало восстановление представителей дистрофин-ассоциированного комплекса [Фигура 12(c)].

[0072] Нормированная удельная сила после тетанического сокращения у необработанных животных Dup2 была значительно меньшей, чем у мышей B16.

Внутримышечная инъекция AAV1.U7-ACCA, как одного, так и с преднизолом, значительно повышала силу до уровней, которые существенно не отличались от наблюдаемых для B16 мышей. Существенной разницы между необработанными мышцами Dup2 и обработанными одним преднизолом (Dup2+ПДН) не наблюдали [Фигура 12(d)]. В этом анализе нормированную удельную силу оценивали, используя опубликованный протокол [Nakim *et al.*, *Journal of Applied Physiology*, 110: 1656-1663 (2011)].

[0073] Обработка в значительной степени защищала Dup2 мышцы от потери силы после повторяющихся эксцентрических сокращений согласно оценке в соответствии с опубликованными протоколами (Nakim *et al.*, выше). Обработка мышцей Dup2 одним AAV1.U7-ACCA приводила к статистически значимому улучшению по сравнению с необработанными мышцами Dup2. Комбинирование AAV1.U7-ACCA и преднизона приводило к незначительной разнице по сравнению с контрольными мышцами B16 в сохранении силы после сокращений от №3 до №10 [Фигура 12(e)].

Пример 5

Внутривенная инъекция AAV9-U7_ACCA в мышечной модели Dup2 приводит к значительной экспрессии N-усеченной изоформы и коррекции недостатка силы

[0074] На основании степени экспрессии дистрофина, регистрируемой в инъекцированных мышцах, U7_ACCA SC rAAV была выбрана для внутривенной доставки для проведения дополнительных экспериментов, а серотип rAAV9 был выбран на основании известных свойств распределения в тканях.

[0075] rAAV9, содержащий геномную вставку, приведенную на Фигуре 9, получали способами, описанными в Примере 3. Затем AAV9.U7-ACCA вводили Dup2 мышам Dup2. Первой группе проводили инъекцию в хвостовую вену 3.3×10^{12} вг/кг. Инъекцию проводили в возрасте четырех недель.

[0076] ОТ-ПЦР проводили для пяти разных мышечных групп мышцей Dup2 через месяц после инъекции в хвостовую вену AAV9.U7-ACCA (3.3×10^{12} вг/кг) [Фигура 13(a)]. Как продемонстрировано наличием множественных транскриптов (обозначенных Dup2, dt и Del2), обработка U7-ACCA приводила к пропуску одной или обеих копий экзона 2 во всех исследуемых типах мышц. (ПБМ: передняя большеберцовая мышца; Икр: икроножная мышца; ♥: сердце; Три: трицепс; диа: диафрагма).

[0077] Результаты вестерн-блоттинга с применением С-терминального антитела (PA1-21011, ThermoScientific), проведенного для пяти разных мышечных групп через месяц после инъекции, показали наличие дистрофина во всех исследуемых типах мышц [Фигура 13(b)].

[0078] Результаты иммуноокрашивания дистрофина с применением С-терминального антитела (PA1-21011, ThermoScientific), проведенного для тех же образцов, подтвердили наличие экспрессии дистрофина и его надлежащей локализации в сарколемме [Фигура 13(c)].

[0079] Оценка силы захвата передней и задней лапы продемонстрировала полную коррекцию силы захвата у животных Dup2, обработанных AAV9.U7-ACCA [Фигура 13(d)]. Данный анализ проводили, используя опубликованный протокол [Spurney, *et al.*, *Muscle & Nerve*, 39, 591-602 (2009)].

[0080] Измерение нормированной удельной и общей силы после тетанического сокращения показали улучшение в мышечной силе по сравнению с необработанными животными Dup2 [Фигура 13(e)], для оценки которого использовали опубликованный протокол [Наkim *et al.*, выше).

[0081] Сердечные папиллярные мышцы демонстрировали улучшение в зависимой от длины силовой генерации у обработанных животных [Фигура 13(f)], для оценки которого использовали опубликованный протокол [Janssen *et al.*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 289(6):H2373-2378 (2005)].

[0082] Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в терминах конкретных вариантов реализации, специалистам в данной области техники будет очевидно существование его вариаций и модификаций. Соответственно, только те ограничения, которые прописаны в формуле изобретения, могут быть наложены на изобретение.

[0083] Все документы, на которые ссылается данная заявка, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки с особым акцентом на их содержание.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий геном, содержащий по меньшей мере одну полинуклеотидную конструкцию U7snRNA, нацеленную на экзон 2 гена (DMD), связанного с развитием мышечной дистрофии Дюшенна.

2. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна нацеленная на экзон 2 DMD полинуклеотидная конструкция U7snRNA содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7.

3. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна нацеленная на экзон 2 DMD полинуклеотидная конструкция U7snRNA содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8.

4. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна нацеленная на экзон 2 DMD полинуклеотидная конструкция U7snRNA содержит две или более нуклеотидных последовательностей, каждая из которых представлена под SEQ ID NO: 7.

5. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна нацеленная на экзон 2 DMD полинуклеотидная конструкция U7snRNA содержит две или более нуклеотидных последовательностей, каждая из которых представлена под SEQ ID NO: 8.

6. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна нацеленная на экзон 2 DMD полинуклеотидная конструкция U7snRNA содержит две или более нуклеотидных последовательностей, содержащих нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7 и/или SEQ ID NO: 8.

7. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что геном содержит в последовательности четыре нацеленных на экзон 2 полинуклеотидных конструкции U7snRNA, содержащих первую нуклеотидную последовательность U7Along, изложенную под SEQ ID NO: 7, первую нуклеотидную последовательность U7C, изложенную под SEQ ID NO: 8, вторую нуклеотидную последовательность U7C, представленную под SEQ ID NO: 8, и вторую нуклеотидную последовательность U7Along, представленную под SEQ ID NO: 7.

8. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна нацеленная на экзон 2 DMD полинуклеотидная конструкция U7snRNA содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 6.

9. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна нацеленная на экзон 2 DMD полинуклеотидная конструкция U7snRNA содержит две или более нуклеотидных последовательностей, представленных под SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 6.

10. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что геном представляет собой самокомплементарный геном и/или одноцепочечный геном.

11. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что rAAV представляет собой rAAV rh.74, rAAV-1, rAAV-2, rAAV-3, rAAV-4, rAAV-5, rAAV-6, rAAV-7, rAAV-8, rAAV-9, rAAV-10 или rAAV-11.

12. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 11, отличающийся тем, что rAAV представляет собой rAAV rh.74, rAAV-8 или rAAV-9.

13. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, отличающийся тем, что в геноме rAAV отсутствует ДНК гер и сар AAV.

14. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) по п. 1, дополнительно содержащий капсид AAV rh.74, капсид AAV-1, капсид AAV-2, капсид AAV-3, капсид AAV-4, капсид AAV-5, капсид AAV-6, капсид AAV-7, капсид AAV-8, капсид AAV-9, капсид AAV-10 или капсид AAV-11.

15. Применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) по п. 1 для облегчения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) у нуждающегося в этом пациента с дупликациями экзона 2 DMD.

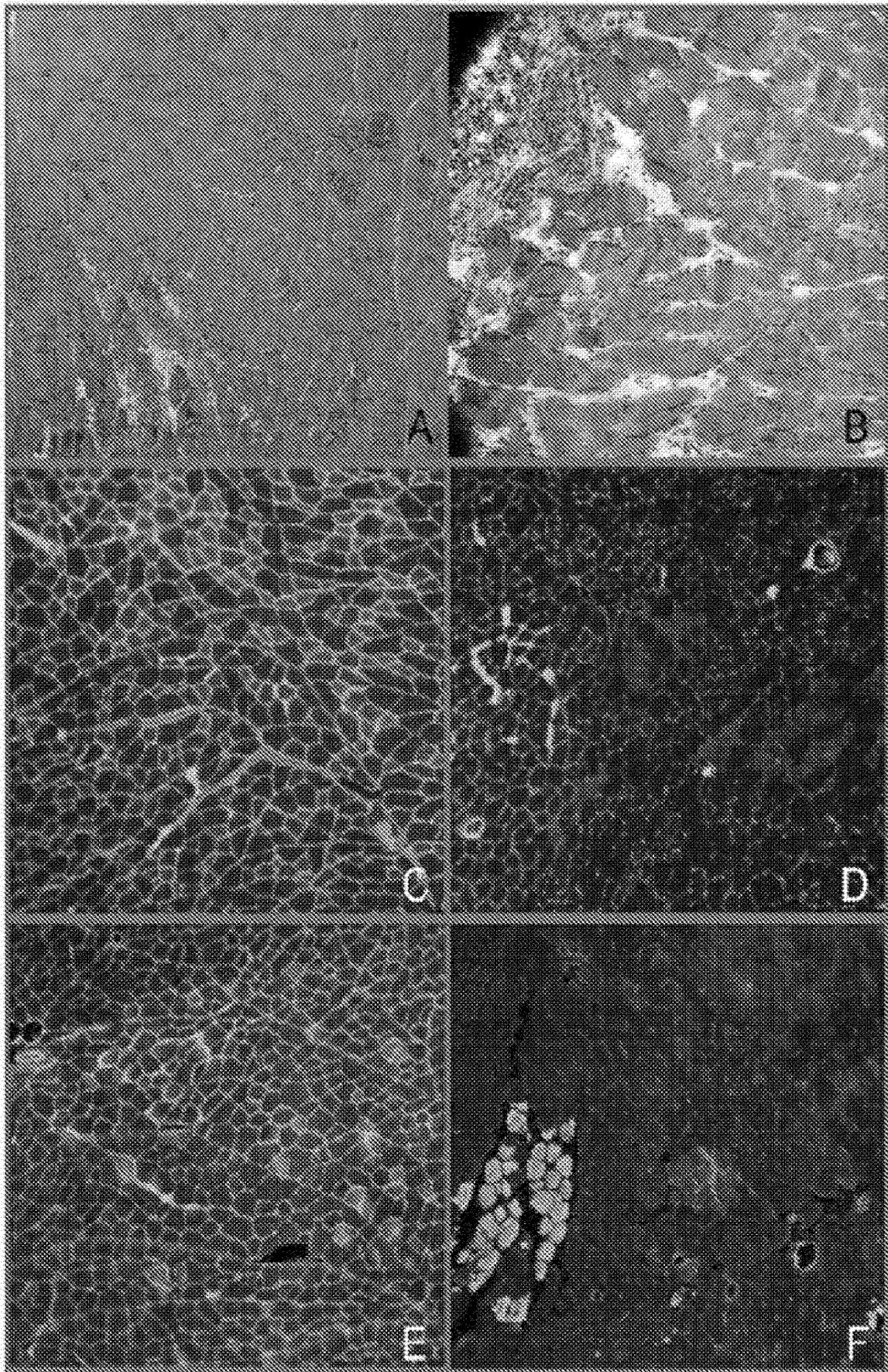
16. Применение по п. 15, причем облегчение связано с повышением экспрессии белка дистрофина у пациента.

17. Применение по п. 15, причем облегчение характеризуется подавлением прогрессирования дистрофической патологии у пациента.

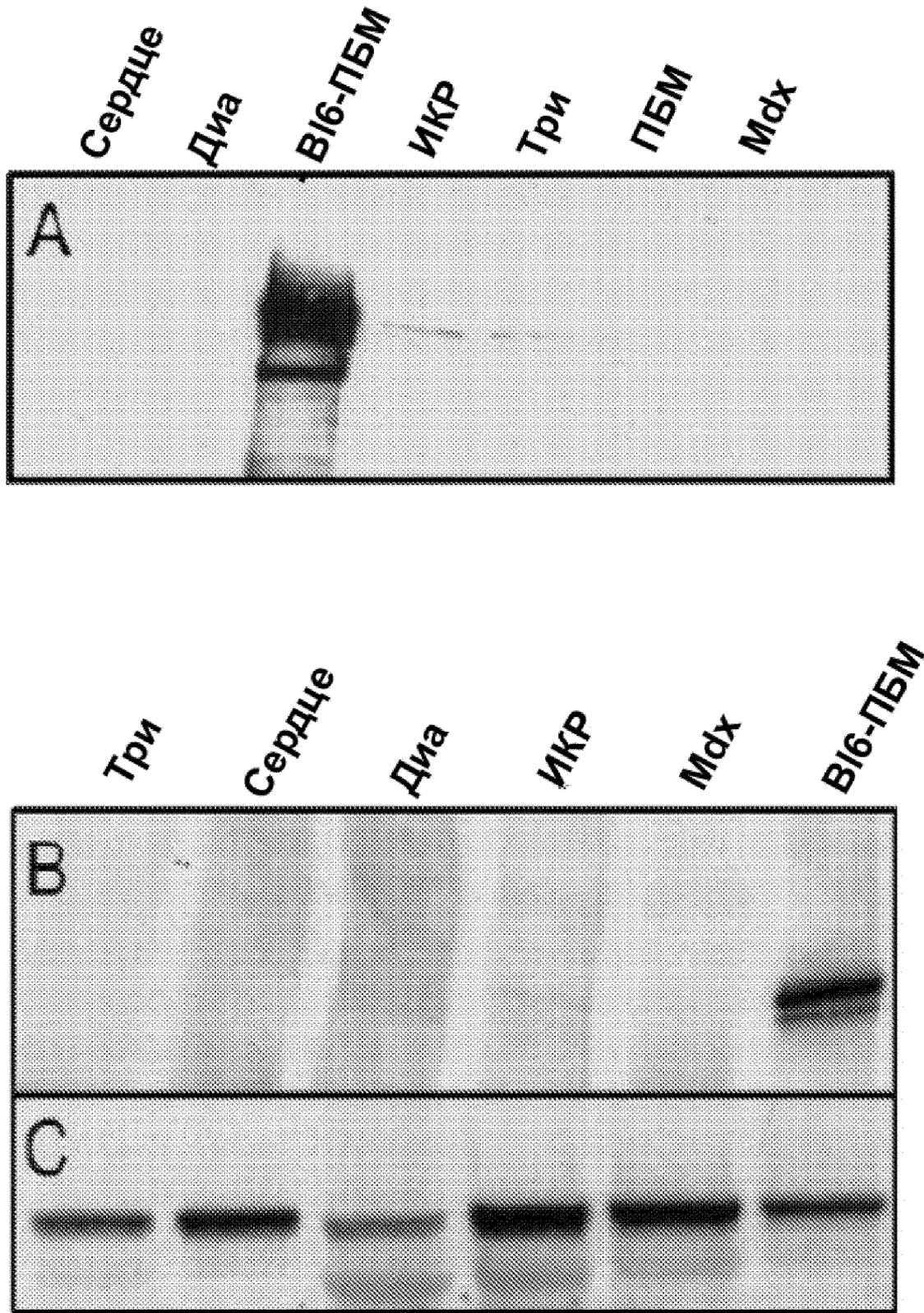
18. Применение по п. 15, причем облегчение характеризуется улучшением мышечной функции у пациента.

19. Применение по п. 18, причем улучшение мышечной функции у пациента состоит в улучшении мышечной силы.

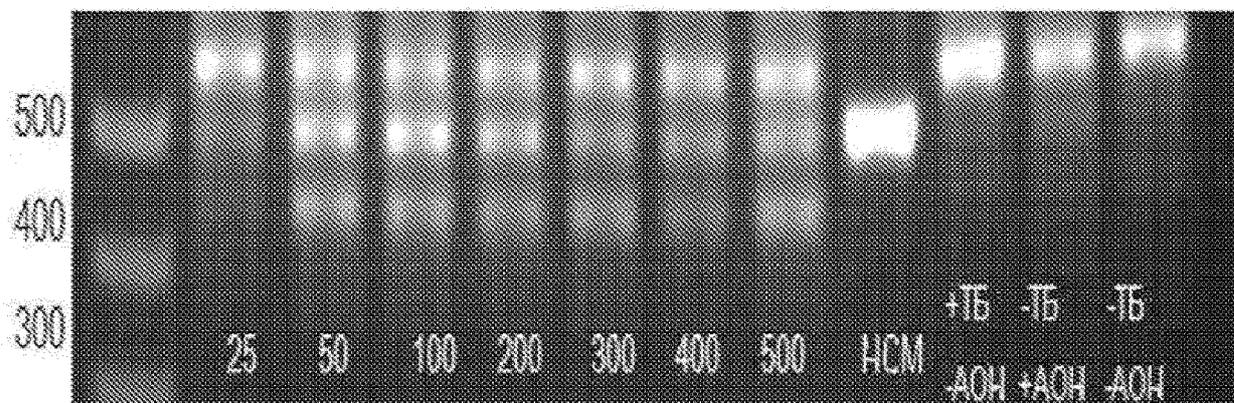
20. Применение по п. 18, причем улучшение мышечной функции у пациента состоит в улучшении стабильности в отношении возможности стоять и ходить.



ФИГУРА 1

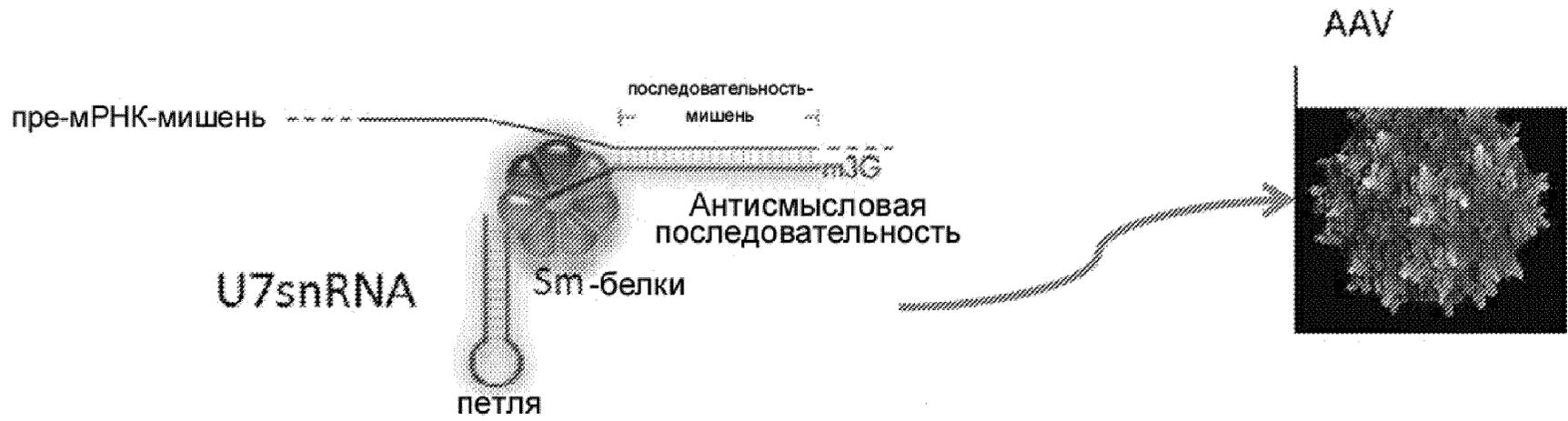


ФИГУРА 2

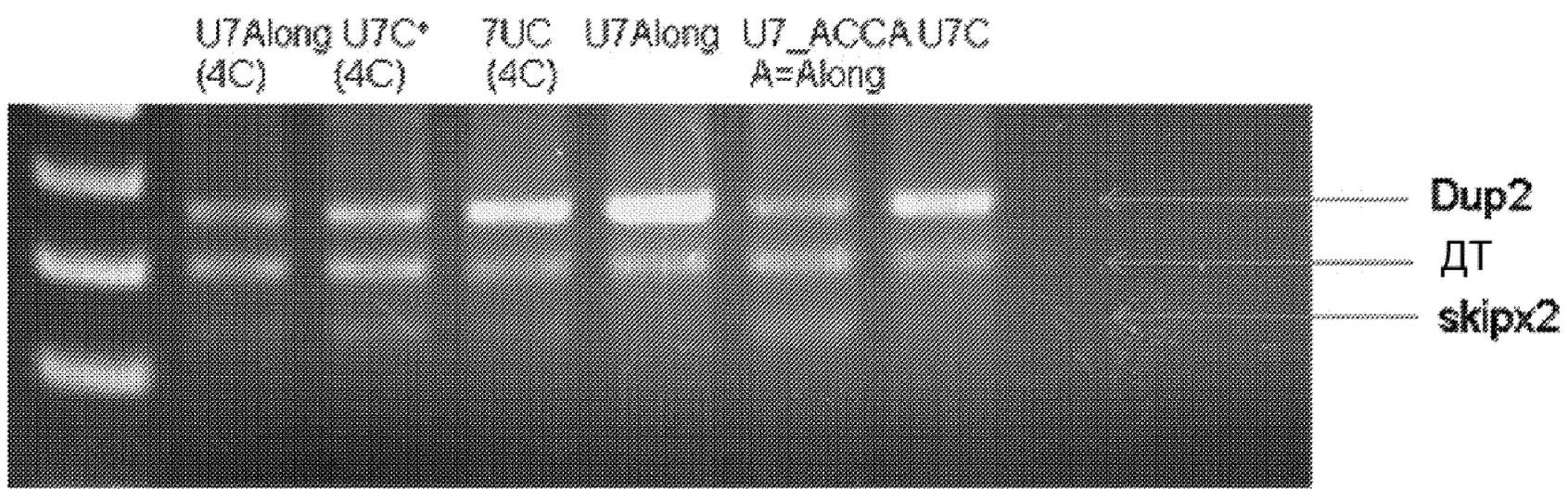


дуп 2	68.80	43.41	37.29	42.15	50.50	53.84	46.77
дт	22.64	34.56	39.37	36.24	25.05	28.63	27.88
дел 2	8.57	22.04	23.34	21.61	24.45	17.52	25.35

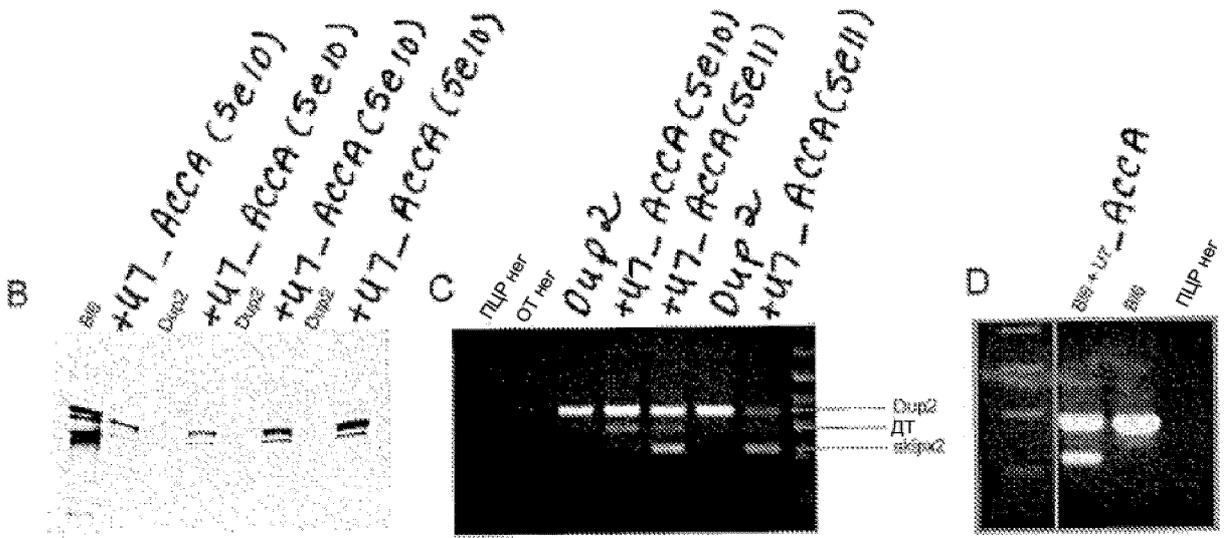
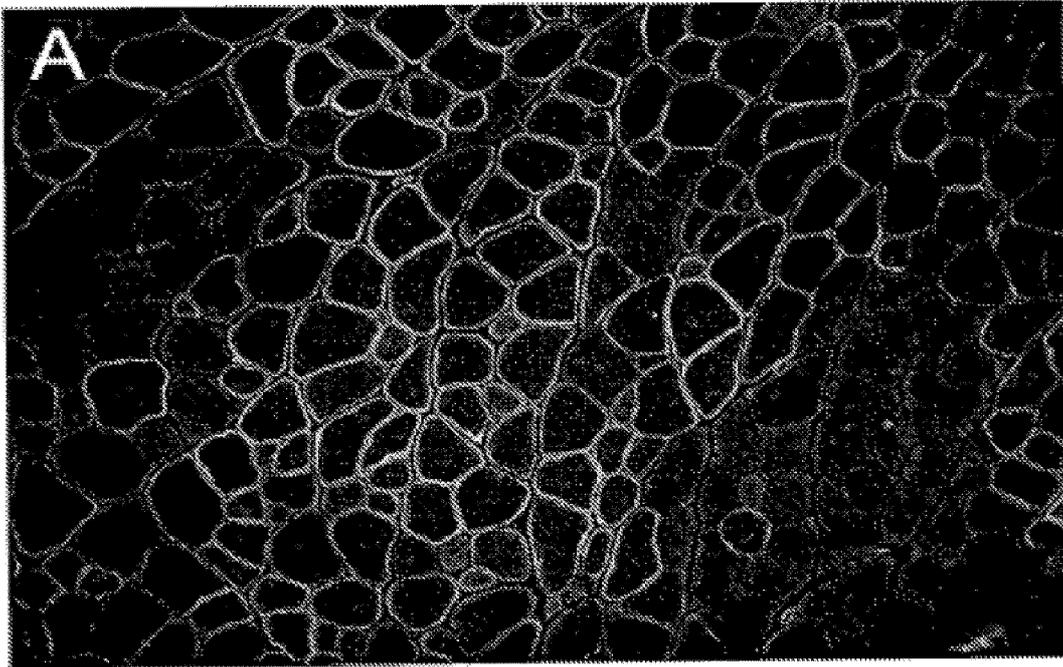
ФИГУРА 3



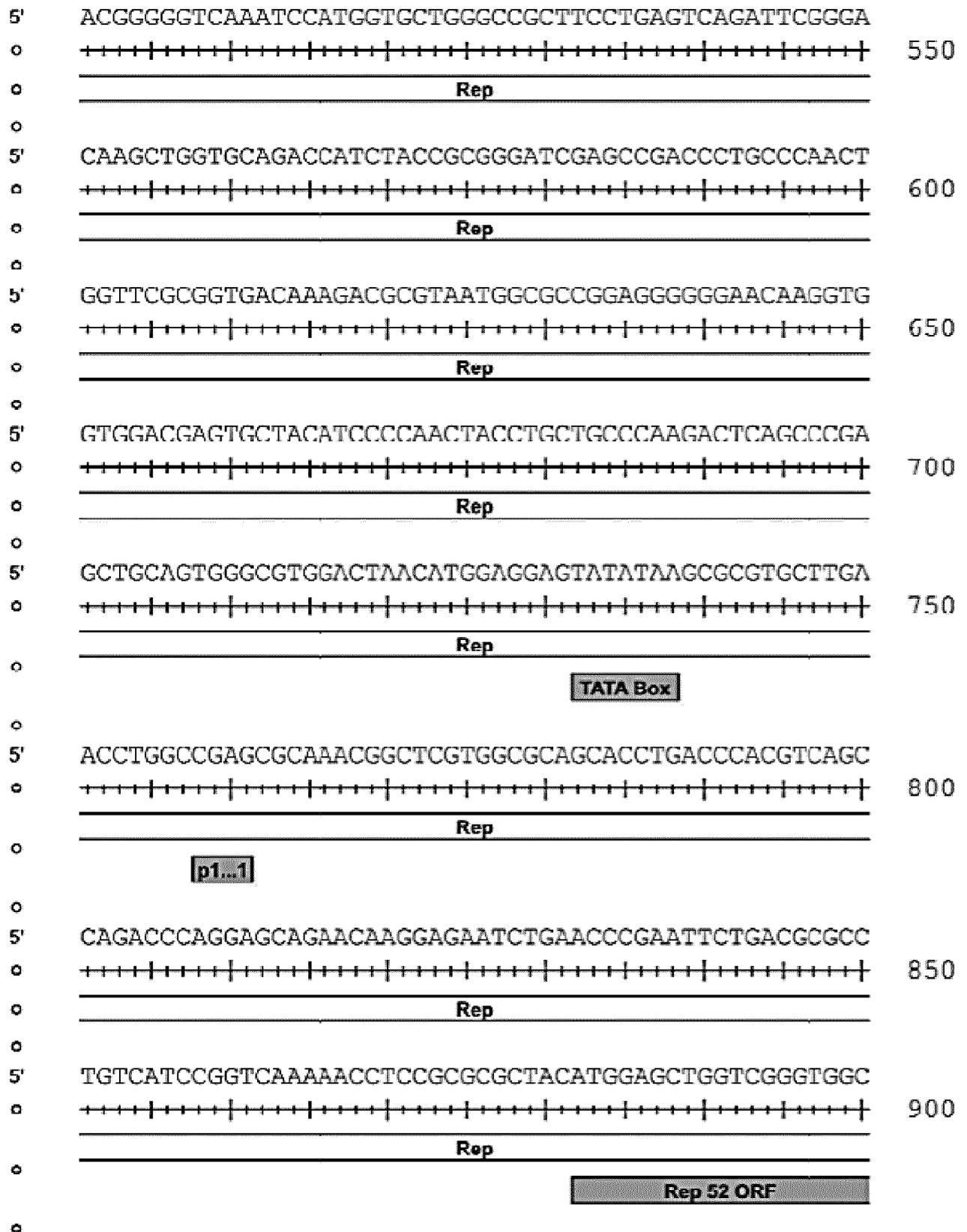
ФИГУРА 4



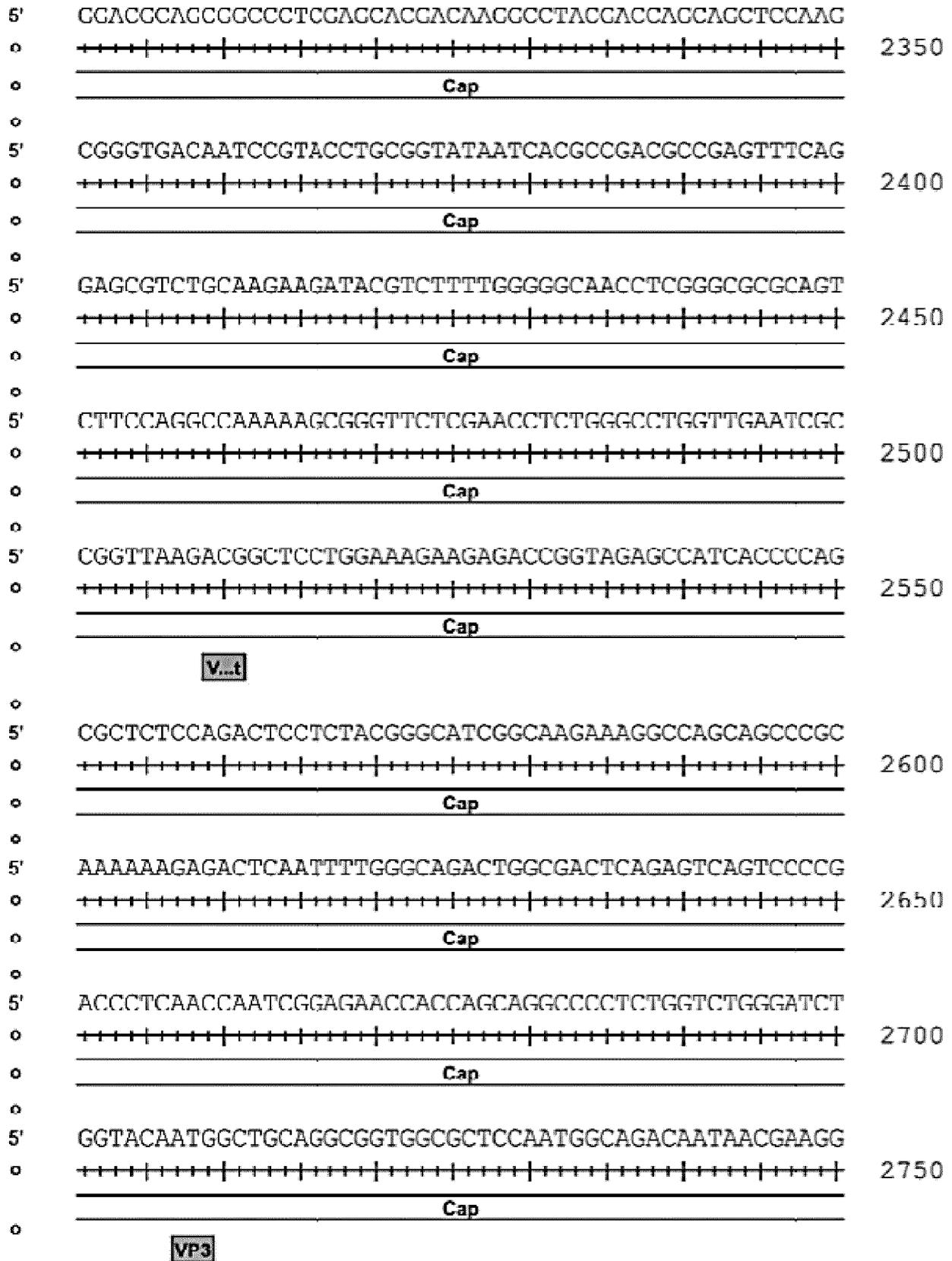
ФИГУРА 5



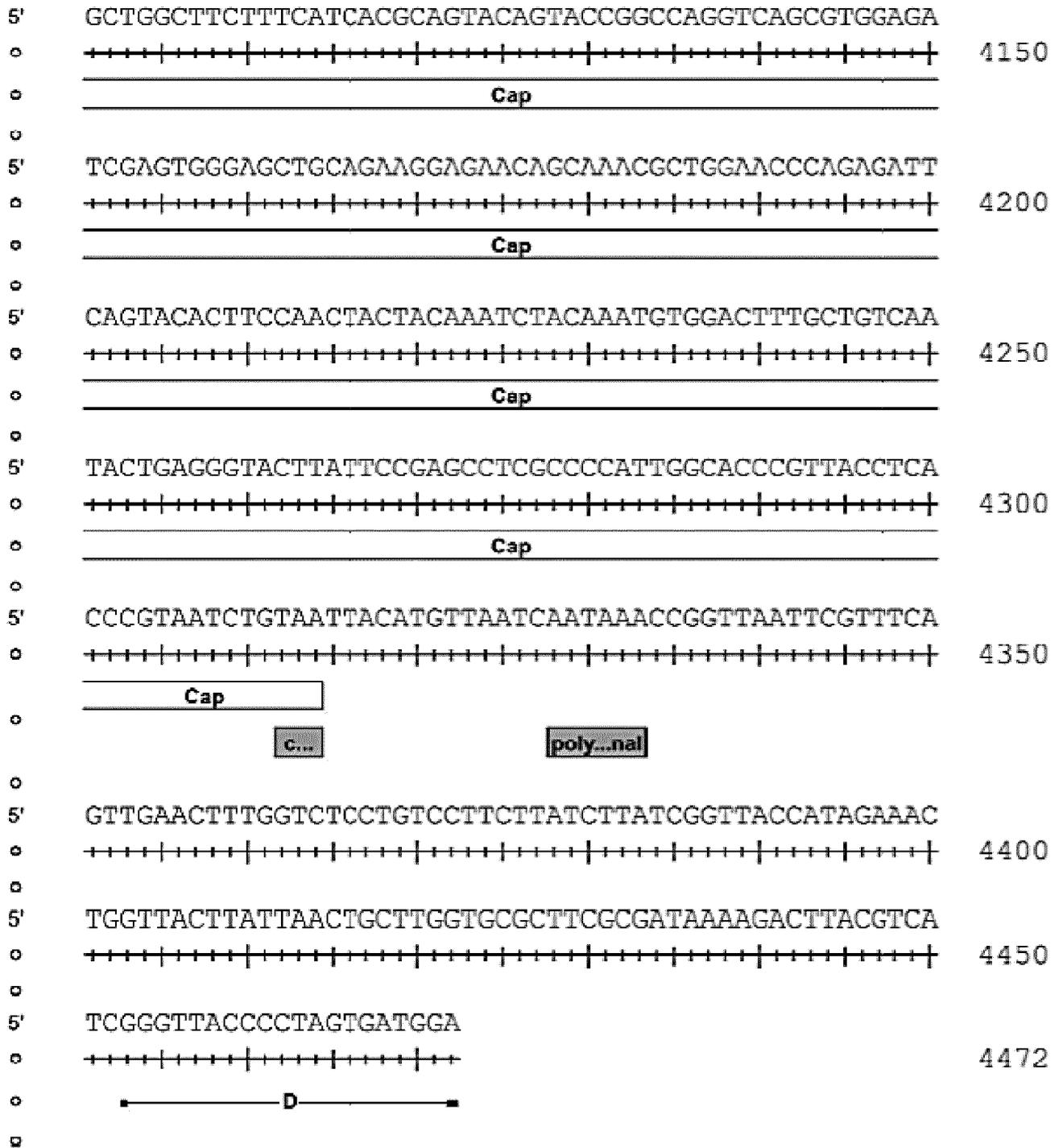
ФИГУРА 6



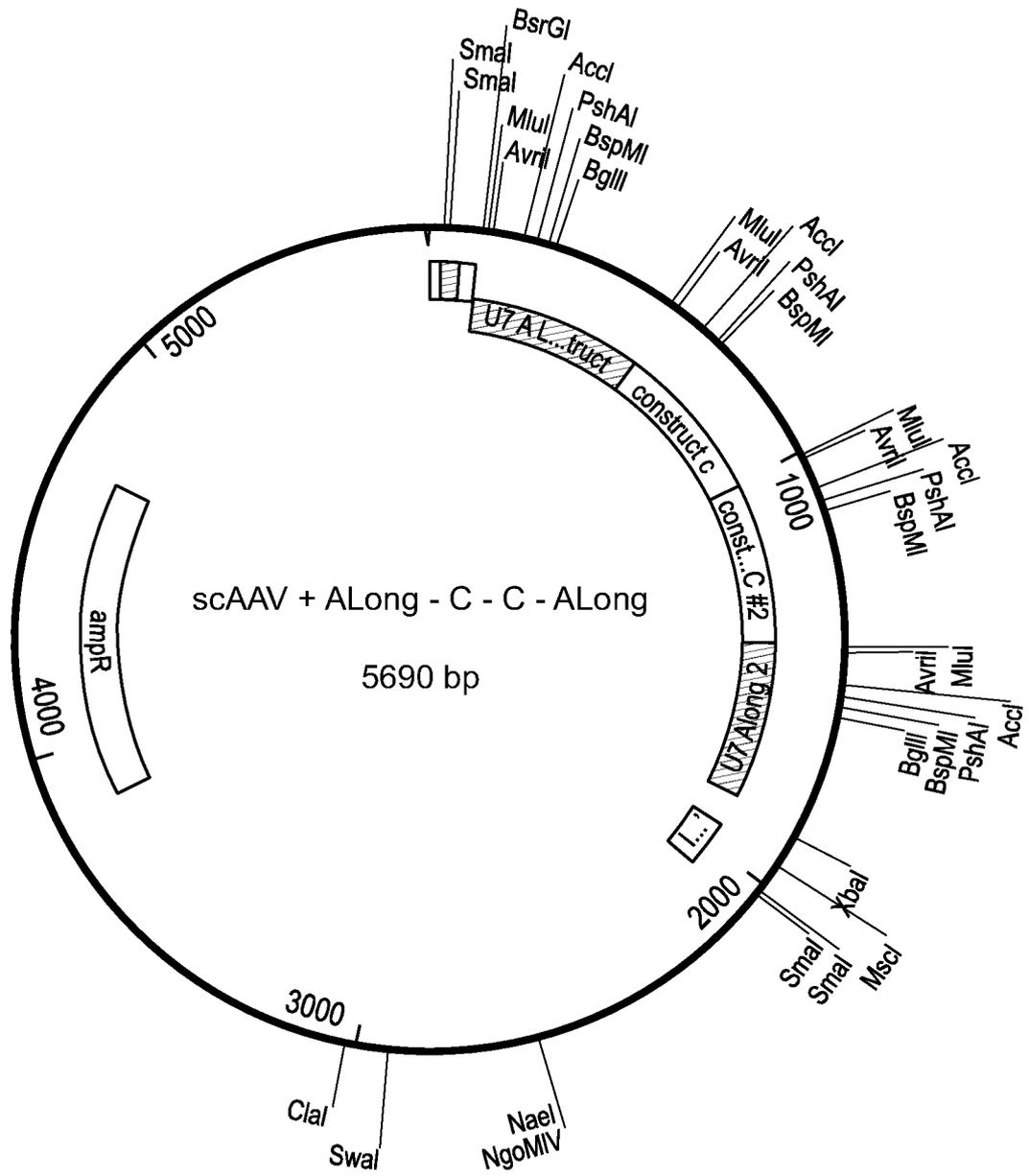
ФИГ. 7В



ФИГ. 7G



ФИГ. 7К



ФИГ. 8

Перечень условных обозначений:

ATCG: Инвертированная концевая последовательность (ИКП)

ATCG:U7-Along (антисмысловая последовательность заглавными буквами) (первая копия)

ATCG: U7-C (антисмысловая последовательность заглавными буквами) (первая копия)

ATCG: U7-C (антисмысловая последовательность заглавными буквами) (вторая копия)

ATCG:U7-Along (антисмысловая последовательность заглавными буквами) (вторая копия)

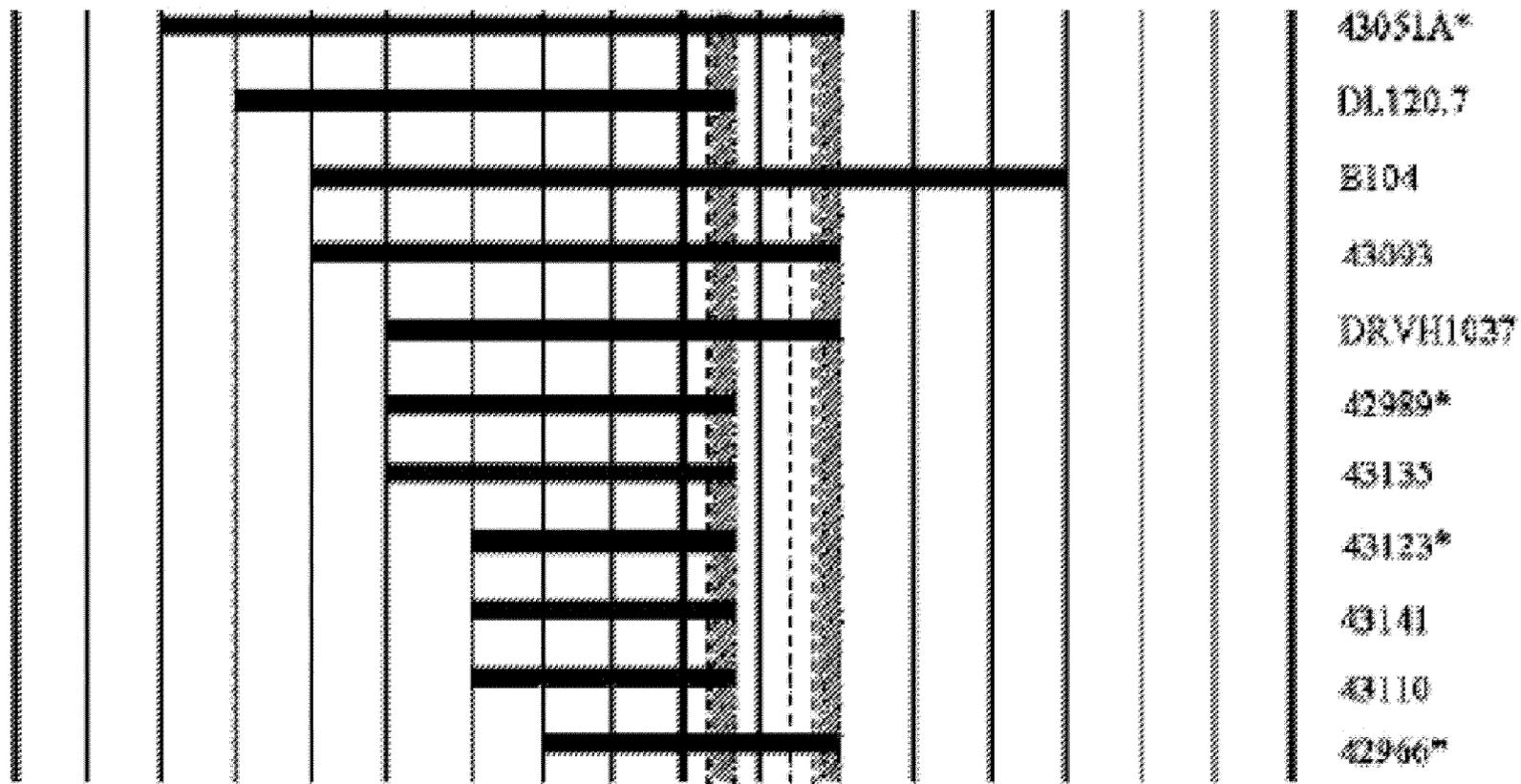
ATCG: Инвертированная концевая последовательность 3' (ИКП)

```
ctgcgcctcgcctcactgagccgccccggcgaagccccggcgtcggcgacccttggcgcgcccgccctcagtgagcgagcgag
cgcgcagagaggggagtggggtgtacacatcgcggttcttaggaaccagagaaggatcaagccccctcaccacaccggggagcgg
ggaagagaactgtttgcttcattgtagaccagtgaattgggaggggtttccgaccgaagtcagaaaacctgCTCCAAAAATTt
agATGAAAGAGAAGATCTTCAAAAGAAAACttgcggaagtgcgtctgtagcgagccagggAaggacatcaa
ctccacttccgatgaggggtgagatcaaggtgccattccacaccctccactgatatgtgaatcacaaagcacagttccttattegggtcgataa
acaatattctaaaagactattaaaaccgctcgtttcttgatttggaccgcttetaaaggctatgcaaatgagTcagtcctgattggctgaaaa
cagccaatcacagctcctatgttctaTCTAGCcacatacgcggttcttaggaaccagagaaggatcaagccccctcaccacaccg
gggagcggggaagagaactgtttgcttcattgtagaccagtgaattgggaggggtttccgaccgaagtcagaaaacctgCTCCA
AAAATTGCACAATTTTCTAAGGTAAGAATTTgcggaagtgcgtctgtagcgagccagggAaggacatcaa
ctccacttccgatgaggggtgagatcaaggtgccattccacaccctccactgatatgtgaatcacaaagcacagttccttattegggtcgataa
acaatattctaaaagactattaaaaccgctcgtttcttgatttggaccgcttetaaaggctatgcaaatgagTcagtcctgattggctgaaaa
cagccaatcacagctcctatgttctaTCTAGCcacatacgcggttcttaggaaccagagaaggatcaagccccctcaccacaccg
gggagcggggaagagaactgtttgcttcattgtagaccagtgaattgggaggggtttccgaccgaagtcagaaaacctgCTCCA
AAAATTGCACAATTTTCTAAGGTAAGAATTTgcggaagtgcgtctgtagcgagccagggAaggacatcaa
ctccacttccgatgaggggtgagatcaaggtgccattccacaccctccactgatatgtgaatcacaaagcacagttccttattegggtcgataa
acaatattctaaaagactattaaaaccgctcgtttcttgatttggaccgcttetaaaggctatgcaaatgagTcagtcctgattggctgaaaa
cagccaatcacagctcctatgttctaTCTAGCcacatacgcggttcttaggaaccagagaaggatcaagccccctcaccacaccg
gggagcggggaagagaactgtttgcttcattgtagaccagtgaattgggaggggtttccgaccgaagtcagaaaacctgCTCCA
AAAATTiagATGAAAGAGAAGATCTTCAAAAGAAAACttgcggaagtgcgtctgtagcgagccagggA
aggacatcaactccacttccgatgaggggtgagatcaaggtgccattccacaccctccactgatatgtgaatcacaaagcacagttccttatt
cgggtcgataaacaatattctaaaagactattaaaaccgctcgtttcttgatttggaccgcttetaaaggctatgcaaatgagTcagtcctga
ttggctgaaaacagccaatcacagctcctatgttctatctagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggttaactaactacaagg
aacccctagtgtatggagttggcactccctctctgcgcgcctcactgagccggggcgaccaaaggtcgcccagcgcgggct
ttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcggccagc
```

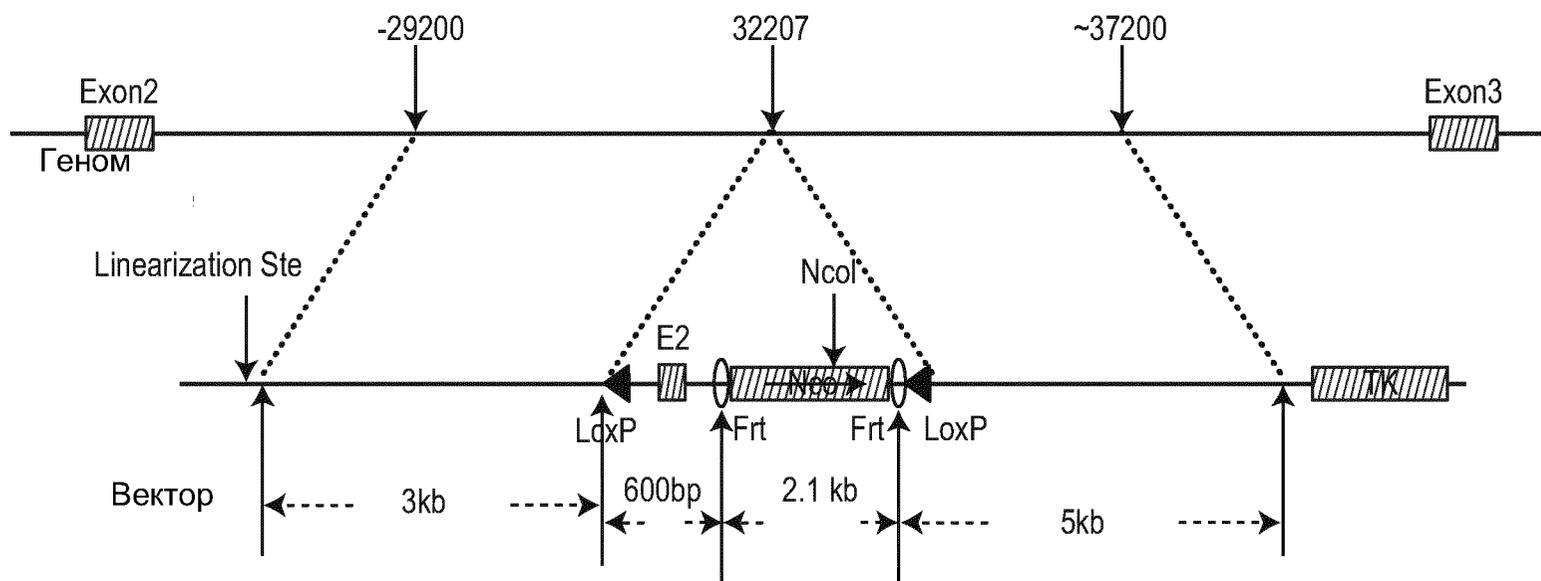
ПМ

ЭКЗ 2

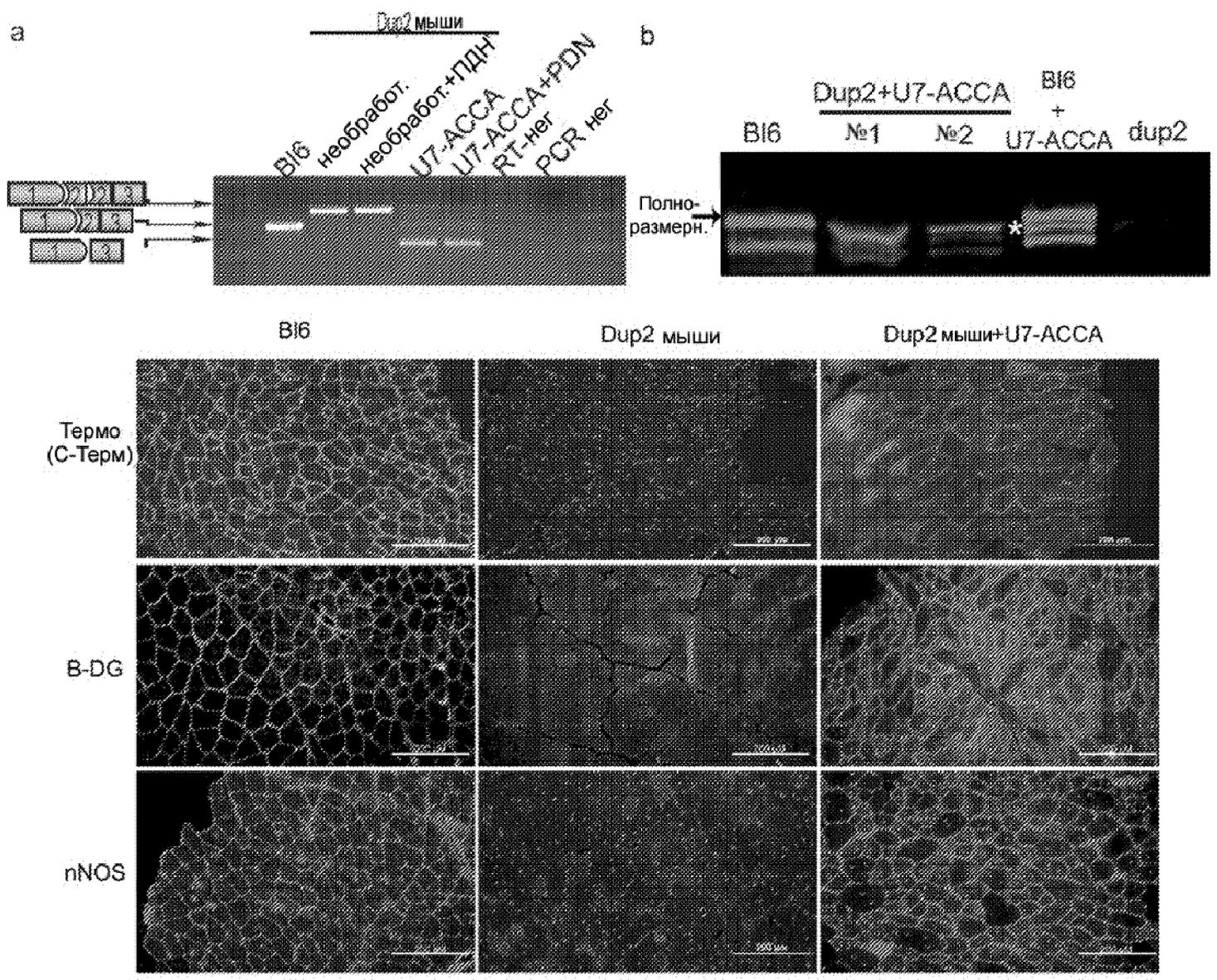
ЭКЗ 3



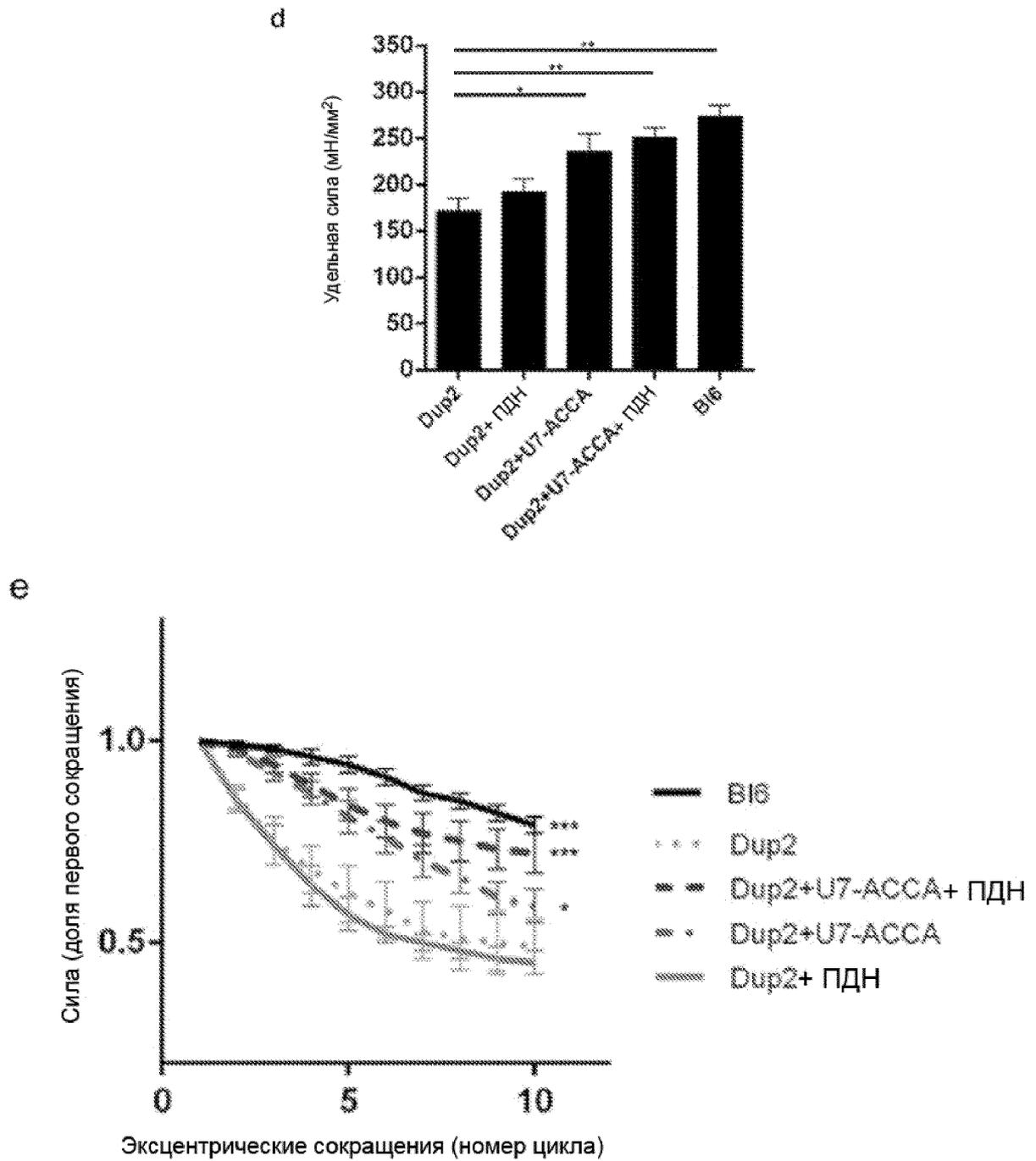
ФИГУРА 10



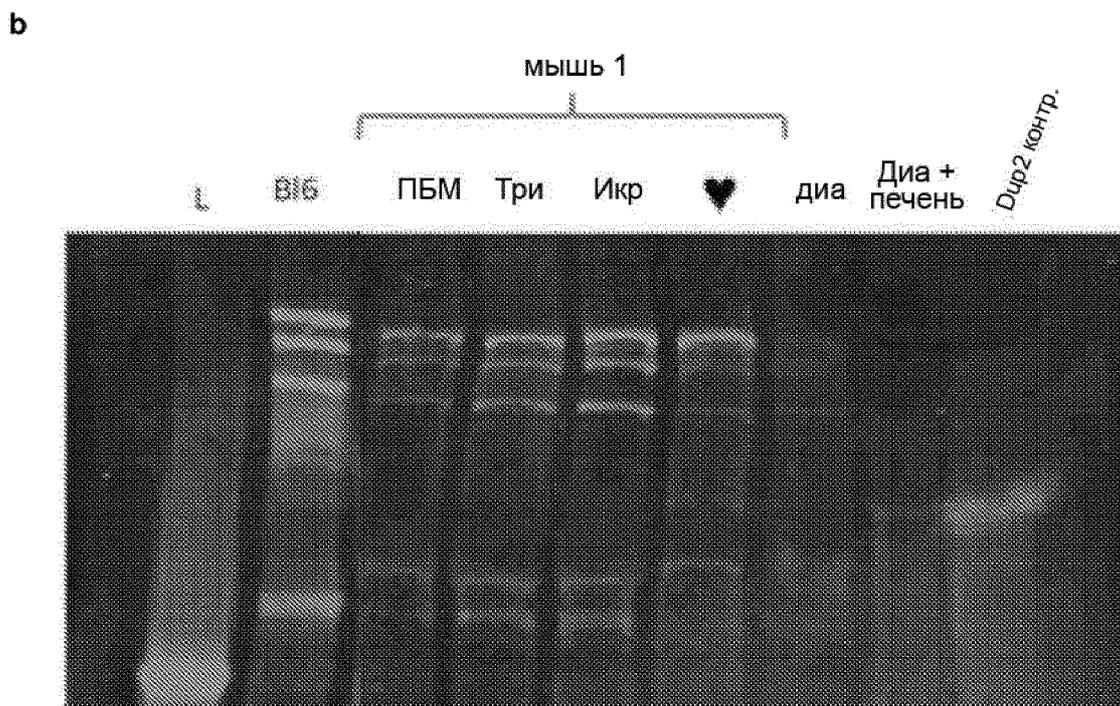
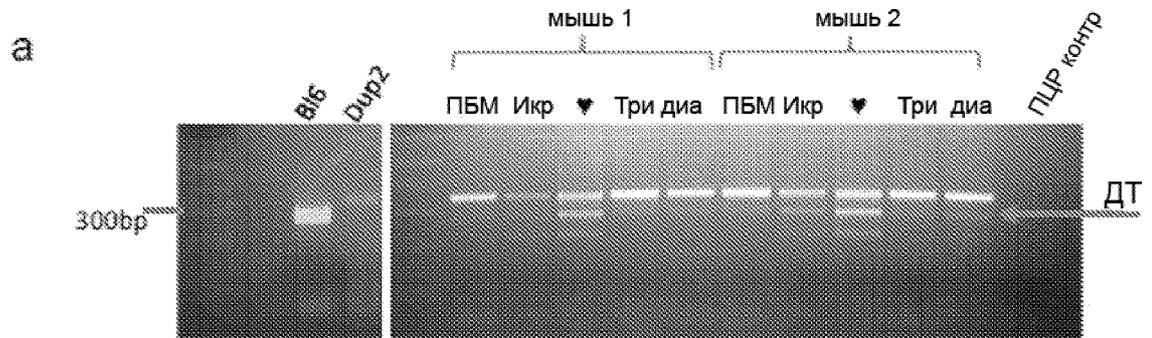
ФИГ. 11



ФИГУРА 12

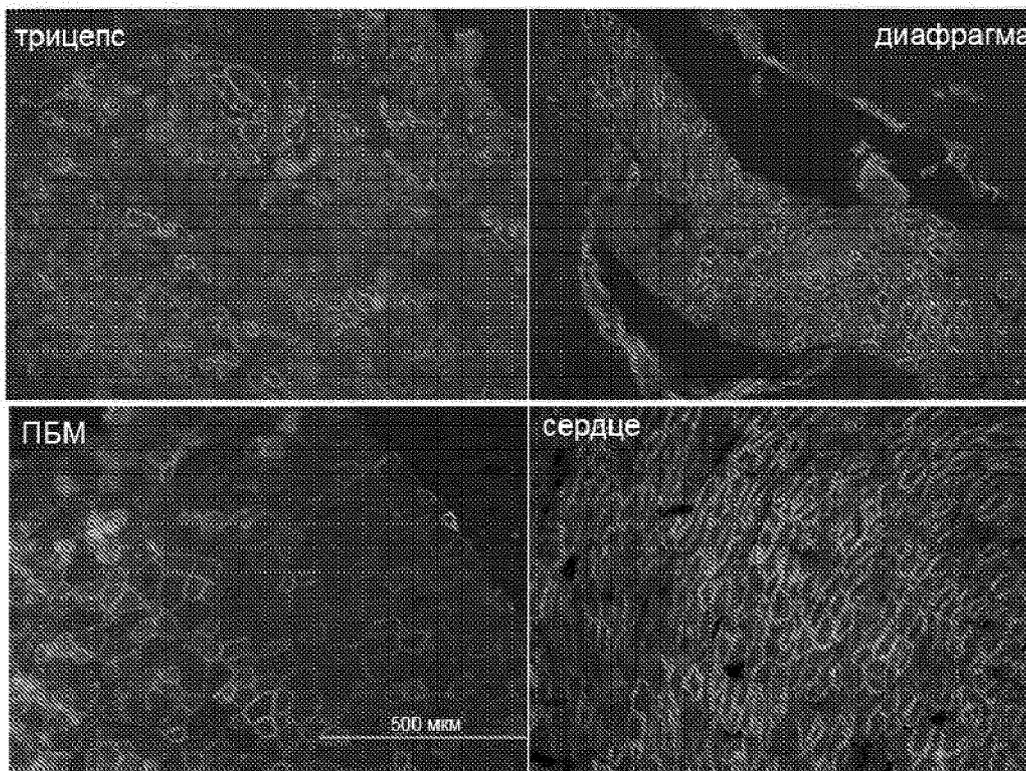


ФИГУРА 12

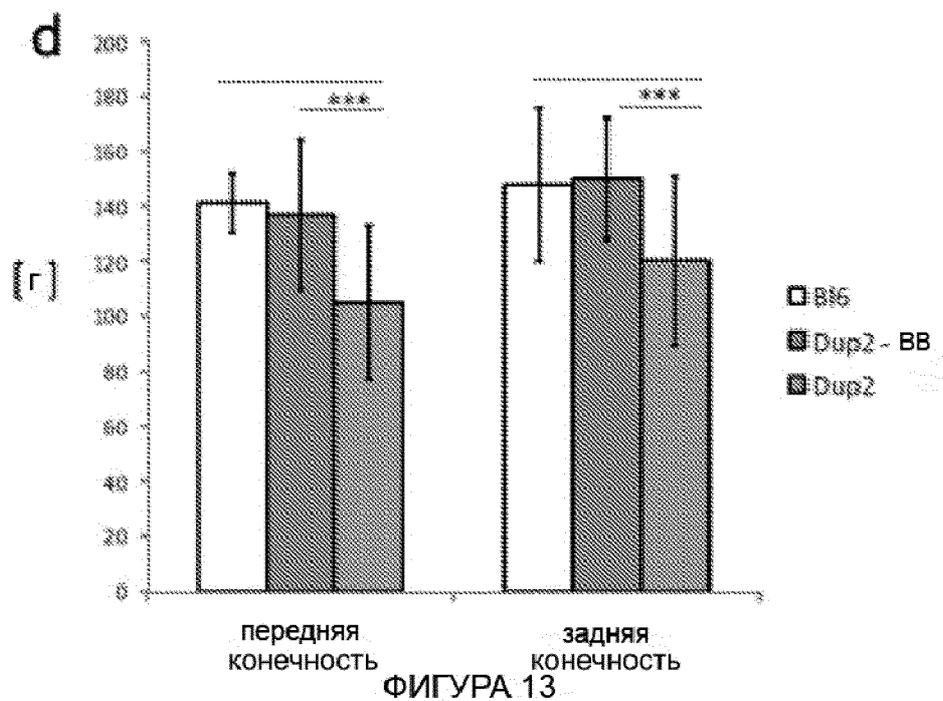


ФИГУРА 13

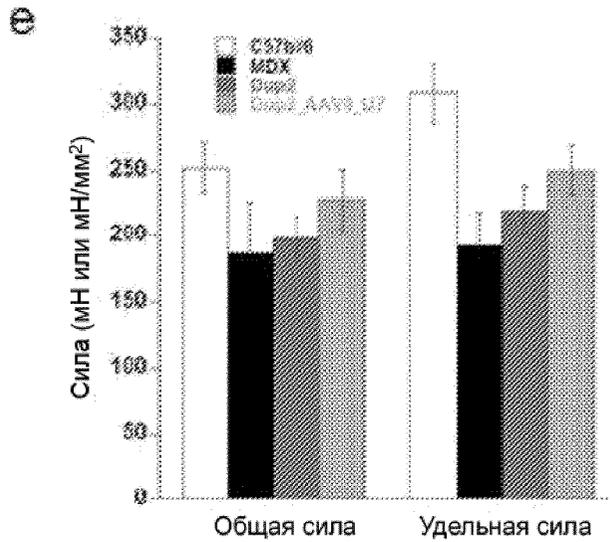
c



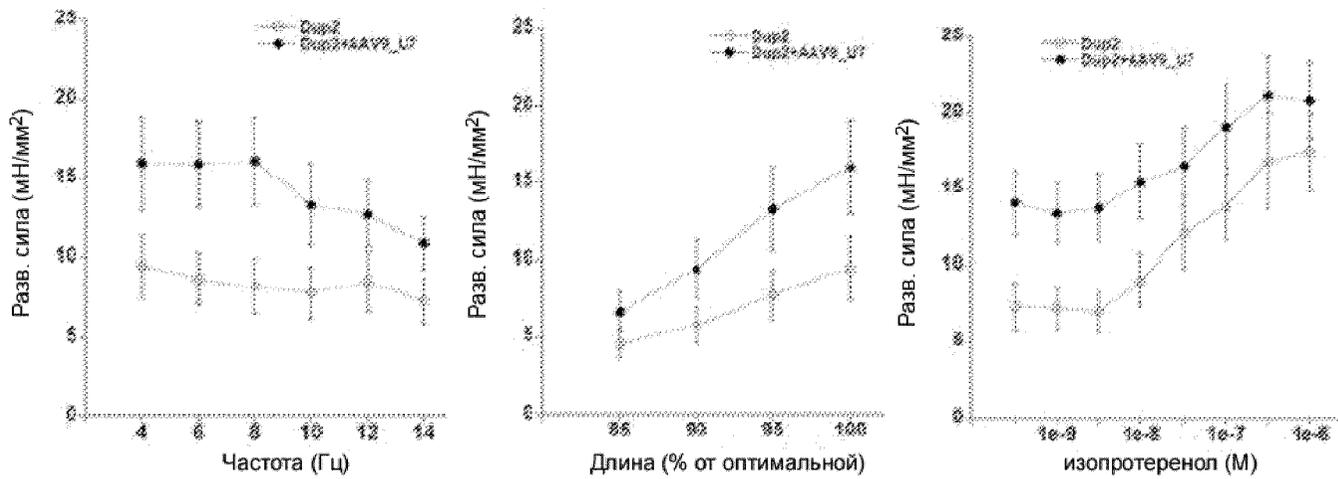
ФИГУРА 12



ФИГУРА 13



f



ФИГУРА 13