

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992201 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.19

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.16

(54) ДОСТАВКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЛЯ МЫШЦ МИКРОДИСТРОФИНА ВЕКТОРАМИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

(31) 62/473,148

(72) Изобретатель:

(32) 2017.03.17

Родио-Клапак Луиза, Менделл
Джерри Р. (US)

(33) US

(86) PCT/US2018/022881

(74) Представитель:

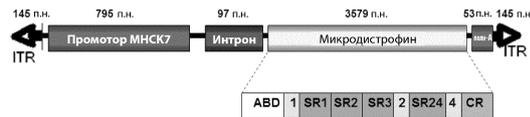
(87) WO 2018/170408 2018.09.20

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ ЭТ
НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕН`С
ХОСПИТАЛ (US)

(57) В данном изобретении предложены генотерапевтические векторы, такие как векторы аденоассоциированного вируса (AAV), экспрессирующие миниатюризированный ген микродистрофина человека, и способ применения этих векторов для экспрессии микродистрофина в скелетной мышце, включая диафрагму и сердечную мышцу, и для защиты мышечных волокон от повреждений, увеличения мышечной силы и уменьшения и/или профилактики фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией.



A1

201992201

201992201

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–558937EA/019

ДОСТАВКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЛЯ МЫШЦ МИКРОДИСТРОФИНА АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫМ ВИРУСНЫМ ВЕКТОРОМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

[001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной патентной заявке США № 62/473148, поданной 17 марта 2017 г., которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ВКЛЮЧЕНИЕ МАТЕРИАЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ, ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[002] Данная заявка содержит, в качестве отдельной части данного изобретения, Перечень последовательностей в машиночитаемой форме, который включен посредством ссылки в полном объеме и идентифицируется следующим образом: Название файла: 51475_Seqlisting.txt, Размер: 29519 байт, создан: 13 марта 2018 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[003] В изобретении предложены векторы генной терапии, такие как векторы аденоассоциированного вируса (AAV), экспрессирующие миниатюризированный ген микродистрофина человека, и способ применения этих векторов для экспрессии микродистрофина в скелетных мышцах, включая диафрагму и сердечную мышцу, и для защиты мышечных волокон от повреждений, увеличения мышечной силы и уменьшения и/или профилактики фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Важность мышечной массы и силы для повседневной деятельности, такой как двигательная активность и дыхание, а также для метаболизма всего тела, является неоспоримой. Дефицит мышечной функции вызывает мышечные дистрофии (MD), которые характеризуются мышечной слабостью и истощением и оказывают серьезное влияние на качество жизни. Наиболее хорошо охарактеризованные MD являются результатом мутаций в генах, кодирующих членов дистрофин–ассоциированного белкового комплекса (DAPC). Эти MD возникают в результате хрупкости мембраны, связанной с потерей связывания сарколеммального цитоскелета с DAPC. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) является одним из самых разрушительных мышечных заболеваний, поражающих 1 из 5000 новорожденных мужского пола.

[005] DMD вызывается мутациями в гене DMD, приводящими к редукции мРНК и отсутствию дистрофина, сарколеммального белка 427 кДа, связанного с дистрофин–ассоциированным белковым комплексом (DAPC) (Hoffman et al., Cell 51 (6): 919–28, 1987). DAPC состоит из множества белков мышечной сарколеммы, которые образуют структурную связь между внеклеточным матриксом (ECM) и цитоскелетом через дистрофин, актин–связывающий белок, и альфа–дистрогликан, ламинин–связывающий белок. Эти структурные связи действуют для стабилизации мембраны мышечных клеток во время сокращения и защиты от повреждения, вызванного сокращением. При потере

дистрофина хрупкость мембран приводит к сарколеммальным разрывам и притоку кальция, вызывая активацию кальциевых протеаз и некроз сегментарного волокна (Straub et al., *Curr Opin. Neurol.* 10 (2): 168–75, 1997). Этот неконтролируемый цикл мышечной дегенерации и регенерации в конечном итоге истощает популяцию мышечных стволовых клеток (Sacco et al., *Cell*, 2010. 143(7): p. 1059–71; Wallace et al., *Annu Rev Physiol*, 2009. 71: p. 37–57), что приводит к прогрессирующей мышечной слабости, эндомиоциальному воспалению и фиброзу рубцеванию.

[006] Без стабилизации мембраны дистрофином или микродистрофином, DMD будет проявлять неконтролируемые циклы повреждения и восстановления ткани, в конечном счете, замены потерянных мышечных волокон фиброзной рубцовой тканью путем пролиферации соединительной ткани. Фиброз характеризуется чрезмерным отложением белков матрикса ЕСМ, включая коллаген и эластин. Белки ЕСМ в основном продуцируются цитокинами, такими как TGF β , который выделяется активированными фибробластами, реагирующими на стресс и воспаление. Хотя основной патологической особенностью DMD является дегенерация миофибрилл и некроз, фиброз как патологическое последствие имеет одинаковые последствия. Чрезмерное производство фиброзной ткани ограничивает регенерацию мышц и способствует прогрессирующей мышечной слабости у пациентов с DMD. В одном исследовании, наличие фиброза на начальных биопсиях мышц с DMD сильно коррелировало с плохим прогнозом двигательной активности при 10-летнем периоде наблюдения (Desguerre et al., *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009. 68(7): p. 762–7). Эти результаты указывают на то, что фиброз является основной причиной мышечной дисфункции DMD, и подчеркивают необходимость раннего вмешательства до возникновения явного фиброза.

[007] Аденоассоциированный вирус (AAV) является дефективным по репликации парвовирусом, одноцепочечный ДНК-геном которого имеет длину около 4,7 т.п.н., включая 145-нуклеотидный инвертированный концевой повтор (ITR). Существует множество серотипов AAV. Известны нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV. Например, нуклеотидная последовательность генома серотипа 2 AAV (AAV2) представлена в Srivastava et al., *J Virol*, 45: 555–564 (1983) as corrected by Ruffing et al., *J Gen Virol*, 75: 3385–3392 (1994). Как и другие примеры, полный геном AAV-1 представлен в GenBank под номером доступа NC_002077, полный геном AAV-3 представлен в GenBank под номером доступа NC_1829, геном AAV-4 представлен в GenBank под номером доступа NC_001829, геном AAV-5 представлен в GenBank под номером доступа AF085716, геном AAV-6 представлен в GenBank под номером доступа NC_001862, по меньшей мере фрагменты геномов AAV-7 и AAV-8 представлены в GenBank под номерами доступа AX753246 и AX753249, соответственно (см. также Патенты США № 7282199 и № 7790449, относящиеся к AAV-8), геном AAV-9 представлен в статье Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381–6388 (2004), геном AAV-10 представлен в *Mol. Ther.*, 13(1): 67–76 (2006) и геном AAV-11 представлен в *Virology*, 330(2): 375–383 (2004). Клонирование серотипа AAVrh.74 описано в Rodino-Klapac., et al. *Journal of*

translational medicine **5**, 45 (2007). Цис-действующие последовательности, управляющие репликацией вирусной ДНК (гер), капсидированием/упаковкой и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR. Три промотора AAV (под названиями p5, p19 и p40 по их относительным положениям на карте) контролируют экспрессию двух открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены гер и сар. Два промотора гер (p5 и p19) в комбинации с дифференциальным сплайсингом одиночного интрона AAV (например, по нуклеотидам AAV2 2107 и 2227) приводят к получению четырех белков гер (гер 78, гер 68, гер 52 и гер 40) из гена гер. Белки гер обладают несколькими ферментативными свойствами, которые в конечном счете 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 транскрипции отвечают за продукцию трех родственных белков капсида. Одиночный консенсусный сайт полиаденилирования находится в положении 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97–129 (1992).

[008] AAV обладает уникальными особенностями, которые делают его привлекательным вектором доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование клеток AAV в культуре является нецитопатическим, а природная инфекция у людей и других животных является латентной и бессимптомной. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что обеспечивает адресное воздействие на различные типы тканей *in vivo*. Кроме того, AAV трансформирует медленно делящиеся и неделящиеся клетки и может присутствовать практически в течение всей жизни этих клеток в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Геном провируса AAV остается инфекционным при клонировании ДНК в плазмиды, что делает возможным конструирование рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV, капсидированием и интеграцией генома, содержатся в ITR генома AAV, приблизительно 4,3 т.п.н. внутренних фрагментов генома (кодирующих белки репликации и структурные белки капсида, гер-сар) можно частично или полностью заменить чужеродной ДНК, например, генной кассетой, содержащей промотор, нужную ДНК и сигнал полиаденилирования. Гер и сар белки могут быть предоставлены *in trans*. Еще одна важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно устойчивым вирусом. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56° С до 65° С в течение нескольких часов), что снижает критичность хранения AAV при низких температурах. AAV можно даже лиофилизировать. Наконец, AAV-инфицированные клетки не являются устойчивыми к суперинфекции.

[009] Многочисленные исследования продемонстрировали длительную (> 1,5 года) рекомбинантную AAV-опосредованную экспрессию белка в мышцах. См. Clark et al., Hum Gene Ther, 8: 659–669 (1997), Kessler et al., Proc Nat. Acad Sc. USA, 93: 14082–14087 (1996) и Xiao et al., J Virol, 70: 8098–8108 (1996). См. также Chao et al., Mol Ther, 2:619–

623 (2000) и Chao et al., Mol Ther, 4:217–222 (2001). Кроме того, поскольку мышцы сильно васкуляризированы, рекомбинантная трансдукция AAV привела к появлению трансгенных продуктов в системном кровообращении после внутримышечной инъекции, как описано в Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 5804–5809 (1997) и Murphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94 : 13921–13926 (1997). Более того, Lewis et al., J. Virol, 76: 8769–8775 (2002) продемонстрировали, что скелетные миофибрилы обладают необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, сворачивания и секреции антител, что указывает на то, что мышцы способны стабильно экспрессировать секретлируемые белковые терапевтические средства.

[0010] Функциональное улучшение у пациентов, страдающих DMD и другими мышечными дистрофиями, требует восстановления генов на ранней стадии заболевания. Существует необходимость в лечении, которое увеличивает мышечную силу и защищает от повреждений мышц у пациентов, страдающих DMD.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] Данное изобретение направлено на векторы генной терапии, например AAV, экспрессирующие ген микродистрофина в скелетных мышцах, включая диафрагму и сердечную мышцу, для защиты мышечных волокон от повреждения, увеличения мышечной силы и уменьшения и/или профилактики фиброза.

[0012] В изобретении предложены способы лечения и подходы для увеличения мышечной силы и/или увеличения мышечной массы с применением векторов генной терапии для введения микродистрофина для устранения дефекта гена, наблюдаемого при DMD. Как продемонстрировано в Примере 2, обработка генной терапией с микродистрофином приводила к большей мышечной силе *in vivo*. Кроме того, доставка генной терапии с микродистрофином внутримышечно и системно продемонстрировала введение дистрофина в мышцы на мышинной модели *in vivo*.

[0013] В одном варианте осуществления в изобретении предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность специфического для мышц регуляторного элемента и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок микродистрофина. Например, нуклеотидная последовательность кодирует функциональный белок микродистрофин, где нуклеотид имеет, например, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более типично по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93% или 94% и еще более типично по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, причем белок сохраняет активность микродистрофина. Белок микродистрофин обеспечивает стабильность мышечной мембраны во время сокращения мышц, например, микродистрофин действует как амортизатор во время сокращения мышц.

[0014] В изобретении также предложены векторы гAAV, в которых нуклеотидная последовательность кодирует функциональный белок микродистрофина, содержащий нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в строгих условиях с

последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или ее комплиментами, и кодирует функциональный белок микродистрофин.

[0015] В одном варианте осуществления вектор rAAV представляет собой нереплицирующийся рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV), называемый rAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin. Этот векторный геном содержит минимальные элементы, необходимые для экспрессии генов, включая инвертированные концевые повторы AAV2 (ITR), микродистрофин, интрон SV40 (SD SA) и сигнал синтетического полиаденилирования (Poly A), все под контролем промотора/энхансера МНСК7. Схема генома вектора и кассеты экспрессии продемонстрирована на Фиг. 1. Серотип AAVrh74 может быть использован для достижения эффективного переноса генов в скелетной и сердечной мышцах после внутривенного введения.

[0016] Термин «строгий» применяется для обозначения условий, которые обычно подразумеваются в данной области техники как строгие. Строгость гибридизации в основном определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих агентов, например, формамида. Примеры строгих условий гибридизации и промывок представляют собой 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при 65–68 °С, или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия, и 50% формамида при температуре 42 °С. См. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Также могут быть использованы более жесткие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокое содержание формамида или другого денатурирующего агента), однако это будет влиять на скорость гибридизации. В случаях, когда речь идет о гибридизации дезоксиолигонуклеотидов, дополнительные иллюстративные жесткие условия гибридизации включают промывание в 6х SSC 0,05% пиррофосфате натрия при 37 °С (для олигонуклеотидов с 14 основаниями), 48 °С (для олигонуклеотидов с 17 основаниями), 55 °С (для олигонуклеотидов с 20 основаниями) и 60° С (для олигонуклеотидов с 23 основаниями).

[0017] Другие агенты могут быть включены в гибридизационные и промывочные буферы с целью снижения неспецифической и/или фоновой гибридизации. Примерами являются 0,1% бычий сывороточный альбумин, 0,1% поливинилпирролидон, 0,1% пиррофосфат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, NaDodSO₄, (SDS), фиколл, раствор Денхардта, обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося (или другая некомплементарная ДНК) и сульфат декстрана, хотя другие подходящие агенты также могут быть использованы. Концентрация и типы этих добавок могут быть изменены без существенного влияния на жесткость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8–7,4, однако в типичных условиях ионной силы скорость гибридизации практически не зависит от pH. См. Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Специалист в данной области может отрегулировать условия гибридизации, чтобы приспособить эти переменные и дать возможность ДНК с различным родством последовательностей

образовывать гибриды.

[0018] Термин «специфический для мышц регуляторный элемент» относится к нуклеотидной последовательности, которая регулирует экспрессию кодирующей последовательности, которая специфична для экспрессии в мышечной ткани. Эти регулирующие элементы включают энхансеры и промоторы. В данном изобретении предложены конструкции, содержащие промотор мышечных специфических регулирующих элементов МСКН7, промотор МСК и энхансер МСК.

[0019] Термин «функционально связанный» относится к позиционированию нуклеотидной последовательности регуляторного элемента, например промоторной нуклеотидной последовательности, для обеспечения экспрессии указанной нуклеотидной последовательности указанным регуляторным элементом.

[0020] В одном аспекте в изобретении предложен вектор гAAV, в котором мышечным специфическим регулирующим элементом является элемент гена скелетного актина человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфический энхансер-связывающий фактор (MEF), мышечная креатинкиназа (МСК), усеченная МСК (tМСК), тяжелая цепь миозина (МНС), гибрид энхансера тяжелой цепи α -миозина/энхансер-промотор-МСК (МНСК7), C5-12, элемент энхансера креатинкиназы мышцы, элемент гена быстро сокращающегося тропонина С скелетных мышц, элемент гена медленно сокращающегося тропонина С сердечных мышц, элемент гена медленно сокращающегося тропонина I, индуцируемые при гипоксии ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

[0021] Например, специфический для мышц регуляторный элемент представляет собой нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2 или специфический для мышц регуляторный элемент представляет собой нуклеотидную последовательность МСК SEQ ID NO: 4. Кроме того, в любом из векторов гAAV по данному изобретению нуклеотидная последовательность специфического для мышц регуляторного элемента, например нуклеотидная последовательность МНСК7 или МСК, функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок микродистрофин. Например, нуклеотидная последовательность промотора МНСК7 (SEQ ID NO: 2) функционально связана с кодирующей последовательностью микродистрофина человека (SEQ ID NO: 1), как представлено в конструкции, представленной на Фиг. 1 или Фиг. 10 (SEQ ID NO: 3). В другом примере, промотор МНСК (SEQ ID NO: 4) функционально связана с кодирующей последовательностью микродистрофина человека (SEQ ID NO: 1), как представлено в конструкции, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 11 (SEQ ID NO: 5) В другом аспекте в изобретении предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В изобретении также предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4.

[0022] В дополнительном аспекте в изобретении предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5.

Например, вектор гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 и продемонстрирован на Фиг. 10. Этот вектор гAAV содержит промотор МНСК7, химерную интронную последовательность, кодирующую последовательность гена микродистрофина человека, поли-А, устойчивость к ампициллину и каркас плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322.

[0023] В изобретении предложен рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 3. Этот вектор гAAV является AAV серотипа AAVrh.74.

[0024] В изобретении также предложен рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность конструкции рAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3. Этот вектор гAAV является AAV серотипа AAVrh.74.

[0025] Векторы гAAV по данному изобретению могут представлять собой любой серотип AAV, такой как серотип AAVrh.74, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

[0026] В изобретении также предложены фармацевтические композиции (или иногда называемые в данном документе просто «композициями»), содержащие любой из векторов гAAV по данному изобретению.

[0027] В другом варианте осуществления в изобретении предложены способы получения векторной частицы гAAV, включающей культивирование клетки, которая была трансфицирована любым вектором гAAV по данному изобретению, и извлечение частиц гAAV из супернатанта трансфицированных клеток. В изобретении также предложены вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению.

[0028] В изобретении предложены способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества любого из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению, экспрессирующих микродистрофин человека.

[0029] В изобретении предложены способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2.

[0030] В изобретении также предложены способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность конструкции рAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3.

[0031] Термин «фиброз» относится к чрезмерному или нерегулируемому отложению компонентов внеклеточного матрикса (ECM) и аномальным процессам восстановления в тканях при повреждении, включая скелетные мышцы, сердечную

мышцу, печень, легкое, почку и поджелудочную железу. Откладываемые компоненты ЕСМ включают фибронектин и коллаген, например коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3.

[0032] В изобретении также предложены способы уменьшения или профилактики фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающие введение терапевтически эффективного количества любого рекомбинантного вектора AAV по данному изобретению.

[0033] В другом варианте осуществления в изобретении предложены способы профилактики фиброза у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV по данному изобретению. Например, любой из гAAV по данному изобретению можно вводить субъектам, страдающим мышечной дистрофией, для профилактики фиброза, например, гAAV по данному изобретению, экспрессирующий белок микродистрофин человека, можно вводить до того, как у субъекта обнаружен фиброз. Кроме того, гAAV по данному изобретению, экспрессирующий ген микродистрофина человека может быть введен субъекту с риском развития фиброза, например, страдающему от мышечной дистрофии или у которого диагностирована мышечная дистрофия, например, DMD. гAAV по данному изобретению можно вводить субъекту, страдающему мышечной дистрофией, для профилактики нового фиброза у этих субъектов.

[0034] В изобретении предложено введение любого из векторов AAV по данному изобретению до того, как у субъекта обнаружен фиброз. Кроме того, гAAV по данному изобретению может быть введен субъекту с риском развития фиброза, например пациенту, страдающему от мышечной дистрофии или у которого диагностирована мышечная дистрофия, например МДД. гAAV по данному изобретению можно вводить субъекту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже развился фиброз, для профилактики нового фиброза у этих субъектов.

[0035] В изобретении также предложены способы увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающие введение терапевтически эффективного количества вектора гAAV по данному изобретению, экспрессирующего ген микродистрофина человека. Эти способы могут дополнительно включать стадию введения гAAV, экспрессирующего микродистрофин.

[0036] В изобретении предложено введение любого из векторов AAV по данному изобретению пациентам с диагнозом DMD до того, как у субъекта был обнаружен фиброз, или до того, как мышечная сила была уменьшена или до того, как мышечная масса была уменьшена.

[0037] В изобретении также предложено введение AAV по данному изобретению субъекту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже развился фиброз, с целью профилактики нового фиброза у этих субъектов или уменьшения фиброза у этих пациентов. В изобретении также предложено введение любого из гAAV по данному изобретению пациенту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже есть уменьшенная мышечная сила или уменьшенная мышечная масса, чтобы защитить мышцу

от дальнейшего повреждения.

[0038] В любом из способов по данному изобретению субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как DMD, или любой другой дистрофин-ассоциированной мышечной дистрофии.

[0039] В другом аспекте вектор гAAV, экспрессирующий белок микродистрофин, содержит кодирующую последовательность гена микродистрофина, функционально связанную с мышечным специфическим регулирующим элементом, отличным от МНСК7 или МСК. Например, в качестве специфического для мышц регуляторного элемента используют элемент гена скелетного актина человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфический энхансер-связывающий фактор (MEF), tМСК (усеченный МСК), тяжелую цепь миозина (МНС), С5-12 (синтетический промотор), элемент энхансера креатинкиназы мыши, элемент гена скелетного быстро сокращающегося тропонина С, элемент гена медленно сокращающегося сердечного тропонина С, элемент гена скелетного медленно изменяющийся элемент гена тропонина I, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

[0040] В любом из способов по данному изобретению вектор или композицию гAAV можно вводить путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

[0041] Кроме того, в любом из способов по данному изобретению вектор или композицию гAAV можно вводить системно. Например, вектор или композиция гAAV могут быть введены парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0042] В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции, содержащей любой из векторов гAAV по данному изобретению, для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом.

[0043] Кроме того, в изобретении предложена композиция, содержащая любой из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению, для профилактики фиброза у пациента, страдающего мышечной дистрофией.

[0044] В изобретении предложены композиции, содержащие любой из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению, для лечения мышечной дистрофии.

[0045] В изобретении предложены композиции, содержащие рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2 для лечения мышечной дистрофии.

[0046] В изобретении предложена композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAV, содержащий конструкцию рAAV.МНСК7.микродистрофин, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, для лечения мышечной дистрофии.

[0047] В изобретении также предложены композиции, содержащие любой из векторов гAAV по данному изобретению, для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией. В дополнительном

варианте осуществления в изобретении предложены композиции, содержащие любой из векторов rAAV по данному изобретению, для лечения мышечной дистрофии.

[0048] Композиции по данному изобретению могут быть составлены для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Композиция по данному изобретению также составлена для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0049] Кроме того, любая из композиций может быть составлена для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как DMD, или любой другой мышечной дистрофией, ассоциированной с дистрофином.

[0050] В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложено применение любого из векторов rAAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Например, нуждающийся субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как DMD или любой другой дистрофин-ассоциированной мышечной дистрофии.

[0051] В другом варианте осуществления в изобретении предложено применение вектора rAAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для профилактики фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

[0052] Кроме того, в изобретении предложено применение рекомбинантного вектора AAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

[0053] В изобретении также предложено применение векторов rAAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

[0054] В изобретении предложено применение рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора MHSK7 SEQ ID NO: 2, для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

[0055] В изобретении предложено применение рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность конструкции rAAV.MHSK7.микродистрофин SEQ ID NO: 3, для лечения мышечной дистрофии.

[0056] В любом из применений данного изобретения лекарственное средство может быть составлено для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом из применений данного изобретения лекарственное средство может быть составлено для системного введения, такого как парентеральное введение, путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0057] Любое из лекарственных средств может быть приготовлено для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как DMD или любая другая мышечная дистрофия, связанная с дистрофином.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0058] На **Фиг. 1** продемонстрирована конструкция рAAV.МНСК7.микродистрофин. В этой конструкции касета экспрессии кДНК фланкирована инвертированными концевыми повторяющимися последовательностями AAV2 (ITR). Конструкция характеризуется *god*-делецией в рамке считывания (R4–R23), в то время как шарниры 1, 2 и 4 (H₁, H₂ и H₄) и богатый цистеином домен остаются продуцирующими белок 138 кДа. Экспрессия белка микродистрофина (3579 п.н.) определяется промотором МНСК7 (795 п.н.). Интрон и 5'-UTR получены из плазмиды рCMVβ (Clontech). Касета с микродистрофином имела консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом ATG и короткий синтетический сигнал поли А 53 п.н. для терминации мРНК. Касета микродистрофина человека содержала домены (R4–R23/Δ71–78), как было описано ранее Harper et al. (Nature Medicine 8, 253–261 (2002)).

[0059] На **Фиг. 2** продемонстрирована экспрессия белка дистрофина после внутримышечного введения конструкции AAVrh74.МНСК7. В переднюю большеберцовую мышцу мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, делали инъекцию 1×10^{11} вг (n=5 в группе). Через шесть недель мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина с помощью N-концевого антитела для окрашивания дистрофина, гематоксилина и эозина.

[0060] На **Фиг. 3А–3С** представлены измерения силы скелетных мышц и количественная оценка экспрессии микродистрофина после внутримышечной инъекции конструкции AAVrh74.МНСК7. (А) В переднюю большеберцовую мышцу мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, делали инъекцию 1×10^{11} вг (n=5) с конструкцией AAVrh74.МНСК7. Через шесть недель передние большеберцовые мышцы собрали и подвергли измерениям силы *in vivo*. Группа с введенной дозой имела значительно большую выработку силы, чем контрольные группы с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, без обработки.

[0061] На **Фиг. 4А–4С** продемонстрирована повсеместная трансдукция волокон скелетных мышц, диафрагмы и сердечных мышц после системного введения конструкции AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин. (А) Мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, обрабатывали системно в возрасте 6 недель через хвостовую вену 6×10^{12} вирусных геномов (2×10^{14} вг/кг) AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин после 12 недель лечения. (В) Окрашивание микродистрофина демонстрирует количественную оценку процентного количества мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин в каждой ткани. (С) Демонстрирует удельную силу, измеренную в диафрагме при слабой и высокой (планируемой терапевтической) дозе. Никаких существенных различий не наблюдалось при слабой дозе, однако при высокой дозе наблюдалось значительное улучшение.

[0062] На **Фиг. 5** продемонстрирована экспрессия белка дистрофина после системного введения конструкции AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин. Мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, (n=5) обрабатывали системно, начиная с возраста 6 недель через хвостовую вену, 6×10^{12} вг

AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин. После 12 недель обработки все мышцы собрали и окрашивали на дистрофин и восстановление компонентов DAPC (продемонстрирован бета-саркогликан).

[0063] На **Фиг. 6А–6D** продемонстрирована токсикологию/безопасность AAVrh.74.МНСК7. Окрашивание гематоксилина и эозина (H&E) проводили на следующих мышечных тканях для анализа токсичности: передняя большеберцовая мышца (TA), икроножная мышца (GAS), квадрицепс (QD), поясничная мышца (PSO), трицепс (TRI) и диафрагма (DIA) (Фиг. 6А). Токсичность не обнаружена. В качестве показателя эффективности было определено количество мышечных волокон с центрально расположенными ядрами (CN) (Фиг. 6В). CN указывают на циклы мышечной дегенерации и регенерации, и, следовательно, уменьшение CN демонстрирует эффект обработки. (Фиг. 6В) демонстрирует, что общее количество волокон остается неизменным при обработке. Количество креатинкиназы продемонстрировано на (Г), демонстрируя улучшение при высокой дозе. Независимые t-тесты были использованы для определения различий ($p < 0,05$); Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

[0064] На **Фиг. 7** продемонстрирована плазмидная конструкция AAV.МСК.микродистрофин.

[0065] На **Фиг. 8** представлены результаты анализа активности AAVrh74.МСК.микродистрофина (человека). В переднюю большеберцовую мышцу мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, делали инъекцию 3×10^9 , 3×10^{10} или 1×10^{11} вг ($n=3$ в группе). Через четыре недели мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина с помощью N-концевого антитела Dys3. Наблюдалась линейная корреляция между экспрессией и дозой с очень малой экспрессией (без эффекта) при 3×10^9 вг и 89% экспрессии при 1×10^{11} вг.

[0066] На **Фиг. 9А–9С** продемонстрировано, что микродистрофин человека улучшает генерацию силы и защиту от повреждения, вызванного эксцентрическим сокращением. (А) Иммуноное окрашивание белка дистрофина в длинном разгибателе пальцев (EDL) и TA демонстрирует экспрессию в mdx-миофибрилах после инъекции rAAVrh.74-МСК-микродистрофина (человека) через бедренную артерию. Мышцы, инфицированные положительным контролем, окрашивали идентичным образом и выдерживали соответствующее количество времени. (В) rAAVrh.74-МСК-микродистрофин значительно увеличивал нормализованную удельную силу по сравнению с mdx-мышцами, обработанными положительным контролем ($P < 0,05$ по сравнению с mdx). (С) mdx-мышцы, инфицированные rAAVrh.74-МСК-микродистрофином (человека), сравнивали с контралатеральными mdx-мышцами EDL, инфицированными положительным контролем, и мышцы EDL дикого типа (ДТ C57Bl/10) для снижения силы во время повторяющихся эксцентрических сокращений через 12 недель после переноса гена. Обработка rAAVrh.74-МСК-микродистрофином (микродистрофин) значительно защищала от потери силы по сравнению с mdx-мышцами, подвергавшимися обработке положительным контролем ($P < 0,001$ по сравнению с mdx). Ошибки являются

стандартными ошибками среднего.

[0067] На **Фиг. 10** представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 3 rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин).

[0068] На **Фиг. 11** представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 5 rAAVrh74.МСК.микродистрофин).

[0069] На **Фиг. 12А–12В** представлен иммунологический ответ на системную доставку AAVrh74.МНСК7.микродистрофина у примата, который не является человеком. (А) Ответ ELISpot на пулы капсидов AAV и микродистрофина. ConA является положительным контролем, а DMSO является отрицательным контролем. Было три пула AAVrh74 и четыре пептидных пула, специфичных для микродистрофина. (В) Положительные ИФА–титры циркулирующих нейтрализующих антител к векторному капсиду. Сыворотку выделяли у приматов раз в две недели и анализировали в ней титр антител. Указанный титр соответствует последнему разведению, при котором отношение ответа ≥ 2 .

[0070] На **Фиг. 13А–В** продемонстрирована системная доставка в макаку–резус AAVrh74.МНСК7.микродистрофина. Иммунофлуоресцентное окрашивание анти–FLAG в левосторонних мышцах демонстрировало устойчивую экспрессию микродистрофина.

[0071] На **Фиг. 14** продемонстрирован эффект системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин на экспрессию трансгена. Иммунофлуоресцентное окрашивание микродистрофина с использованием N–концевого антитела к дистрофину в сердце, диафрагме, поясничной мышце и передней большеберцовой мышце (ТА) демонстрирует устойчивую экспрессию при средней ($6e12$ вирусных геномов; $2e14$ вг/кг) и высокой дозе ($1.2e13$ вг; $6e14$ вг/кг) обработанных животных через 3 месяца после инъекции. Продемонстрированы 20x изображения.

[0072] На **Фиг. 15** продемонстрировано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин на экспрессию трансгена. Иммунофлуоресцентное окрашивание микродистрофина с использованием N–концевого антитела к дистрофину в икроножной мышце, квадрицепсе, трицепсе и ягодичной мышце демонстрируют значительную экспрессию при средней ($6e12$ вг; $2e14$ вг/кг) и высокой дозе ($1.2e13$ вг, $6e14$ вг/кг) обработанных животных через 3 месяца после инъекции. Продемонстрированы 20x изображения.

[0073] На **Фиг. 16** продемонстрировано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин на мышечную патологию. (А) Окрашивание H&E диафрагмы, передней большеберцовой мышцы, икроножной мышцы и квадрицепса мышцей ДТ C57BL/6, mdx–мышцей и мышцей обработанных rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин (средняя доза – $2e14$ вг/кг; высокая доза – $6e14$ вг/кг), (В) Количественная оценка среднего размера волокна продемонстрировала нормализацию размера волокна по всей ткани. **** $p < 0,001$, однофакторный дисперсионный анализ; данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Продемонстрированы 20x изображения.

[0074] На **Фиг. 17** продемонстрировано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин на мышечную патологию. (А) Окрашивание Н&Е трицепса, ягодичной и поясничной мышц мышей ДТ C57BL/6, mdx-мышей и мышей, обработанных rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, (средняя доза – 2×10^{14} вг/кг; высокая доза – 6×10^{14} вг/кг), (В) Количественная оценка среднего размера волокна продемонстрировала большие волокна в зависимости от дозы. **** $p < 0,001$, однофакторный дисперсионный анализ; данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Продемонстрированы 20х изображения.

[0075] На **Фиг. 18** продемонстрировано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин на центральную нуклеацию. Повышение дозы иллюстрирует уменьшение центральной нуклеации во всех скелетных мышцах и диафрагме. Двухфакторный дисперсионный анализ использовали для определения различий ($p < 0,05$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

[0076] На **Фиг. 19** продемонстрировано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин на отложение коллагена. Увеличение дозы иллюстрирует снижение накопления коллагена (%) в диафрагме. * $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ; данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Продемонстрированы 20х изображения.

[0077] На **Фиг. 20** продемонстрирована коррекция дефицита силы в диафрагме. После 3 или 6 месяцев обработки собирали полоски мышц диафрагмы для измерения удельной силы (нормализованной к площади поперечного сечения). Обработка восстановило силу до уровня ДТ. * $p < 0,05$. Для определения отличий от mdx-LR мышей использовали однофакторный дисперсионный анализ.

[0078] На **Фиг. 21** продемонстрирована коррекция дефицита силы в ТА. (А) После 3–6 месяцев обработки мышцы ТА собирали (как левую, так и правую) для измерения удельной силы (нормализованной к весу ТА). Обработка восстановило силу до уровня ДТ. (В) Обработка избавила мышцы ТА от усталости после строгого протокола эксцентрических сокращений. * $p < 0,05$. Для определения отличий от mdx-LR мышей использовали однофакторный дисперсионный анализ.

[0079] На **Фиг. 22** продемонстрировано распределение среднего количества копий вг в различных тканях трех mdx-мышей после внутривенной доставки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин.

[0080] **Фиг. 23.** Химические составы сывороток у мышей, системно инъецированных ssAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, и химические составы сывороток контрольных групп соответствующего возраста анализировали с помощью независимого CRO (Charles River Laboratories), который указывает нормальные значения во всех анализируемых химических веществах. Единственными ненормальными значениями были повышенные значения AST и ALT, отмеченные у mdx-животных, обработанных носителем [MDX-LR (раствор Рингера с лактатом)], которые были нормализованы при обработке. Известно, что AST и ALT повышены при DMD.

ALT=аланинаминотрансфераза, ALP/К=щелочная фосфатаза, AST=аспартатаминотрансфераза, BUN=азот мочевины крови, В/С=соотношение крови и креатинина, CREAT=креатин, GLU=глюкоза, TP=общий белок, TBIL=общий билирубин, DBIL=прямой билирубин.

[0081] На **Фиг. 24** представлено вестерн-блоттинг биораспределение на мышцы и органы от mdx-мышей, системно инъецированных гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин.

[0082] На **Фиг. 25** представлена карта хелперной плазмиды рNLREP2-Caprh74 AAV.

[0083] На **Фиг. 26** представлена хелперная плазида Ad рHELP.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0084] В данном изобретении предложены векторы генной терапии, например векторы гAAV, сверхэкспрессирующие микродистрофин человека, и способы уменьшения и профилактики фиброза у пациентов с мышечной дистрофией. Мышечные биопсии, взятые в самом раннем периоде диагностики DMD, демонстрируют заметную пролиферацию соединительной ткани. Мышечный фиброз вреден во многих отношениях. Он уменьшает нормальный транзит эндомизиальных питательных веществ через барьеры соединительной ткани, уменьшает кровоток и лишает мышцы питательных компонентов, поступающих из сосудов, и функционально способствует ранней потере способности передвижения из-за контрактуры конечностей. Со временем проблемы с лечением увеличиваются в результате выраженного фиброза в мышцах. Это можно наблюдать на биопсии мышц, сравнивая пролиферацию соединительной ткани в последовательные моменты времени. Процесс продолжает усугубляться, приводя к потере способности передвижения и ускорению потере контроля, особенно у пациентов с инвалидной коляской.

[0085] Без раннего лечения, включая параллельный подход к снижению фиброза, маловероятно, что преимущества пропуска экзонов, считывания стоп-кодонов или заместительной генной терапии когда-либо будут полностью достигнуты. Даже низкомолекулярные вещества или стратегии замены белка могут потерпеть неудачу без подхода к снижению мышечного фиброза. Предыдущая работа на старых mdx-мышцах с существующим фиброзом, обработанных AAV.микродистрофином, продемонстрировала, что мы не смогли добиться полной функциональной реставрации (Liu, M., et al., Mol Ther 11, 245–256 (2005)). Также известно, что прогрессирование кардиомиопатии DMD сопровождается рубцеванием и фиброзом в стенке желудочка.

[0086] Используемый в данном документе термин «AAV» означает стандартную аббревиатуру для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК-парвовирус, который растет только в клетках, в которых определенные функции обеспечиваются коинфицирующим вирусом-помощником. В настоящее время охарактеризовано тринадцать серотипов AAV. Общую информацию и обзоры AAV можно найти, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169–228, and Berns, 1990, Virology, pp. 1743–1764, Raven Press,

(New York). Однако вполне ожидаемо, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны как структурно, так и функционально, даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, pp. 165–174 of *Parvoviruses and Human Disease*, J. R. Pattison, ed.; и Rose, *Comprehensive Virology* 3: 1–61 (1974)). Например, все серотипы AAV, по-видимому, проявляют очень похожие свойства репликации, опосредованные гомологичными генами гер, и все они несут три родственных капсидных белка, таких как экспрессированные в AAV2. Степень родства дополнительно подтверждается гетеродуплексным анализом, который выявляет обширную перекрестную гибридизацию между серотипами по всей длине генома, и наличие аналогичных сегментов самоотжига на концах, которые соответствуют «последовательностям инвертированного конечного повтора» (ITR). Подобные паттерны инфекционности также предполагают, что функции репликации в каждом серотипе находятся под сходным регуляторным контролем.

[0087] Используемый в данном документе термин «вектор AAV» относится к вектору, содержащему один или несколько представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевых повторов AAV (ITR). Такие векторы AAV могут реплицироваться и упаковываться в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов гер и сар.

[0088] «Вирион AAV» или «вирусная частица AAV» или «векторная частица AAV» относятся к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного вектора AAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (то есть полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его обычно называют «векторной частицей AAV» или просто «вектором AAV». Таким образом, получение векторной частицы AAV обязательно включает производство вектора AAV, поскольку такой вектор содержится в векторной частице AAV.

AAV

[0089] Рекомбинантные геномы AAV по данному изобретению включают молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению и одну или несколько ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах rAAV может происходить из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая серотипы AAV ARArh.74, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13, но не ограничиваясь ими. Получение псевдотипированного rAAV раскрыто, например, в WO 01/83692. Другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с капсидными мутациями, также предложены. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900–1909 (2014). Как отмечено выше в разделе «Уровень техники», в данной области известны нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV. Для стимулирования специфической экспрессии скелетных мышц можно использовать AAV1,

AAV6, AAV8 или AAVrh.74.

[0090] ДНК–плазмиды по данному изобретению содержат геномы гAAV по данному изобретению. ДНК–плазмиды переносят в клетки, восприимчивые к инфицированию вирусом–помощником AAV (например, аденовирусом, аденовирусом с делецией E1 или герпесвирусом) для сборки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Способы продукции частиц гAAV, при которых в клетку вводят геном AAV, подлежащий упаковке, гены гер и сар и функции вируса–помощника, являются стандартными в данной области техники. Продукция гAAV требует присутствия в одной клетке (называемой в данном документе пакующей клеткой) следующих компонентов: генома гAAV, отделенных от генома гAAV (т.е. не входящих в состав генома) генов гер и сар AAV, и функций вируса–помощника. Гены гер и сар AAV могут принадлежать AAV любого серотипа, для которого можно получить рекомбинантный вирус, и могут принадлежать AAV серотипа, отличающегося от серотипа ITR генома гAAV, включая серотипы AAV AAV–1, AAV–2, AAV–3, AAV–4, AAV–5, AAV–6, AAV–7, AAVrh.74, AAV–8, AAV–9, AAV –10, AAV–11, AAV–12 и AAV–13, но не ограничиваясь ими. Получение псевдотипированного гAAV описано, например, в WO 01/83692, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0091] Способ получения пакующей клетки заключается в создании линии клеток, стабильно экспрессирующих все необходимые компоненты для продукции частиц AAV. Например, плазмиду (или несколько плазмид), содержащих геном гAAV без генов гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV, и маркер селекции, например, ген устойчивости к неомицину, встраивают в геном клетки. Геномы гAAV можно внедрить в бактериальные плазмиды посредством таких процедур, как концевое присоединение GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077–2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления эндонуклеазами рестрикции (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65–73), или прямое лигирование тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661–4666). Пакующую клеточную линию затем заражают вирусом–помощником, таким как аденовирус. Преимущества этого способа заключаются в возможности отбора клеток и в том, что они подходят для крупномасштабной продукции гAAV. Другие примеры подходящих способов задействуют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки.

[0092] Общие принципы получения гAAV рассмотрены, например, Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533–539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97–129). Различные подходы описаны в статьях Ratschin et al., Mol. 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., Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al., J. Virol., 63:3822–3828 (1989); патенте США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте 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. Vaccine 13:1244–1250 (1995); Paul et al. Human Gene Therapy 4:609–615 (1993); Clark et al. Gene Therapy 3:1124–1132 (1996); патенте США № 5786211; патенте США № 5871882; и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы тем самым полностью включены в данный документ посредством ссылок, с особым вниманием на разделы документов, которые касаются продукции гAAV.

[0093] Таким образом, в данном изобретении предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном варианте реализации упаковывающие клетки могут являться стабильно трансформированными раковыми клетками, например, клетками HeLa, клетками 293 и клетками PerC.6 (линии, родственной 293). В еще одном варианте реализации упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, например, клетки 293 после небольшого количества пересевов (клетки почки плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC–5 (фибробласты плода человека), клетки WI–38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL–2 (клетки легкого плода макака–резуса).

[0094] Рекомбинантный AAV (*т.е.* инкапсидированные инфекционные частицы гAAV) по данному изобретению содержат геном гAAV. В иллюстративных вариантах осуществления геномы обоих гAAV лишены ДНК гер и сар AAV, то есть, не содержат ДНК гер и сар AAV между ITR геномов. Примеры гAAV, которые могут быть сконструированы так, чтобы содержать молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению, раскрыты в международной патентной заявке № PCT/US2012/047999 (WO 2013/016352), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0095] В иллюстративном варианте осуществления рекомбинантный вектор AAV по данному изобретению получают методом тройной трансфекции (Xiao et al., J Virol **72**, 2224–2232 (1998) с использованием векторной плазмиды AAV pAAV.МНСК7.микродистрофин, pNLRep2–Caprh74 и pHelp, pAAV содержит каскету экспрессии гена микродистрофина, фланкированную последовательностями инвертированного концевой повтора (ITR) AAV2. Именно эта последовательность инкапсидирована в вирионах AAVrh74. Плазида содержит последовательность микродистрофина и энхансер МНСК7 и элементы основного промотора специфического для мышц промотора для управления экспрессией гена. Кассета экспрессии также содержит интрон SV40 (SD/SA) для обеспечения высокого уровня экспрессии гена и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста используется для эффективной терминации транскрипции.

[0096] PNLREP2–Caprh74 является плазмидой–помощником AAV, которая кодирует 4 белка гер AAV2 дикого типа и 3 белка капсида AAV VP дикого типа из серотипа rh74. Схематическая карта плазмиды pNLREP2–Caprh74 продемонстрирована на Фиг.25.

[0097] Аденовирусная плазида–помощник pHELP имеет 11635 п.н. и была

получена от Applied Viromics. Плазмида содержит области генома аденовируса, которые важны для репликации AAV, а именно E2A, E4ORF6 и VA PНК (функции аденовируса E1 обеспечиваются клетками 293). Последовательности аденовируса, присутствующие в этой плазмиде, представляют только ~ 40% генома аденовируса и не содержат *cis*-элементов, критических для репликации, таких как концевые повторы аденовируса. Следовательно, получение инфекционного аденовируса в такой производственной системе не ожидается.. Схематическая карта плазмиды rHELP продемонстрирована на Фиг. 26.

[0098] rAAV можно очистить стандартными способами, известными в данной области техники, например, колоночной хроматографией или центрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия. Способы очистки векторов rAAV от вируса-помощника известны в данной области техники и включают способы, описанные, например, в статьях Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031–1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69: 427–443 (2002); патенте США № 6566118 и заявке WO 98/09657.

[0099] В другом варианте осуществления изобретения предложены композиции, содержащие rAAV по данному изобретению. Композиции по данному изобретению содержат rAAV и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы и поверхностно-активные вещества, такие как плуроники.

[00100] Титры rAAV, которые можно вводить в способах по данному изобретению, зависят, например, от конкретного rAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток-мишеней; их можно определить посредством способов, стандартно применяемых в данной области техники. Титры rAAV могут варьировать 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} , от около 1×10^{13} до около 1×10^{14} или более устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки можно также выражать в единицах геномов вируса (vg).

[00101] В данном изобретении предложены способы трансформации клетки-мишени с помощью rAAV *in vivo* или *in vitro*. Способы *in vivo* включают стадию введения эффективной дозы или эффективных множественных доз композиции, содержащей rAAV по данному изобретению, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития расстройства/заболевания, введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития расстройства/заболевания, введение является терапевтическим. В вариантах осуществления изобретения эффективная доза представляет собой дозу, которая облегчает (устраняет или уменьшает) по меньшей мере один симптом, связанный с расстройством/болезненным состоянием, которое лечат, которая замедляет или предотвращает прогрессирование расстройства/болезненного состояния, которая замедляет или предотвращает прогрессирование расстройства/болезненного состояния, которая уменьшает степень заболевания, что

приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или продлевает выживаемость. Примером заболевания, предполагаемого для профилактики или лечения способами по данному изобретению, является DMD.

[00102] В данном изобретении также предложена комбинированная терапия. Используемая в данном документе комбинированная терапия включает как одновременное лечение, так и последовательное лечение. В частности, в данном изобретении специально предложены комбинации способов со стандартным медицинским лечением (*например*, кортикостероидами), а также комбинации с новыми терапиями.

[00103] Введение эффективной дозы композиций может осуществляться стандартными в данной области способами, включая внутримышечное, парентеральное, внутривенное, пероральное, буккальное, назальное, легочное, внутричерепное, внутрикостное, внутриглазное, ректальное или вагинальное, но не ограничиваясь ими. Способ(ы) введения и серотип(ы) компонентов AAV rAAV (в частности, ITR AAV и капсидный белок) по данному изобретению могут быть выбраны и/или согласованы специалистами в данной области с учетом инфекции и и/или болезненного состояния, подвергаемых лечению, и клетки-/ткань(и)-мишени, которые должны экспрессировать белок микродистрофин.

[00104] В изобретении предложено местное введение и системное введение эффективной дозы rAAV и композиций по данному изобретению. Например, системное введение – это введение в систему кровообращения для влияния на весь организм. Системное введение включает энтеральное введение, такое как всасывание через желудочно-кишечный тракт, и парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации.

[00105] В частности, фактическое введение rAAV по данному изобретению может быть осуществлено с использованием любого физического способа, который будет транспортировать рекомбинантный вектор rAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно данному изобретению включает инъекцию в мышцу и инъекцию в кровоток, но не ограничивается ими. Было продемонстрировано, что простого ресуспендирования rAAV в физиологическом растворе с фосфатным буфером достаточно для обеспечения носителя, полезного для экспрессии мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений для носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с rAAV (хотя в обычном режиме с rAAV следует избегать композиций, которые деградируют ДНК). Капсидные белки rAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы rAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде составов для инъекции или в виде составов для местного применения для доставки в мышцу посредством трансдермального транспорта. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для трансдермального транспорта, были ранее разработаны и могут быть использованы при практическом применении данного

изобретения. RAAV можно использовать с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обработки.

[00106] Дозировки гAAV, которые можно вводить в способах, описанных в данном документе, зависят, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток-мишеней; их можно определить посредством способов, стандартно применяемых в данной области техники. Титры каждого введенного гAAV могут варьироваться 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} , около 1×10^{14} или до около 1×10^{15} или больше устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки могут быть также выражены в единицах вирусных геномов (вг) (*m.e.* 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, 1×10^{15} соответственно). Дозировки также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (вг) на килограмм (кг) массы тела (*то есть* 1×10^{10} вг/кг, 1×10^{11} вг/кг, 1×10^{12} вг/кг, 1×10^{13} вг/кг, 1×10^{14} вг/кг, 1×10^{15} вг/ кг соответственно). Способы титрования AAV описаны в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031–1039 (1999).

[00107] В частности, фактическое введение гAAV по данному изобретению может быть осуществлено с использованием любого физического способа, который будет транспортировать рекомбинантный вектор гAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно данному изобретению включает инъекцию в мышцу и инъекцию в кровоток, но не ограничивается ими. Было продемонстрировано, что простого ресуспендирования гAAV в физиологическом растворе с фосфатным буфером достаточно для обеспечения носителя, полезного для экспрессии мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений для носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с гAAV (хотя в обычном режиме с гAAV следует избегать композиций, которые деградируют ДНК). Капсидные белки гAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы гAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде составов для инъекции или в виде составов для местного применения для доставки в мышцу посредством трансдермального транспорта. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для трансдермального транспорта, были ранее разработаны и могут быть использованы при практическом применении данного изобретения. RAAV можно использовать с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обработки.

[00108] Для целей внутримышечной инъекции можно использовать растворы в адьюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или в водном пропиленгликоле, а также стерильные водные растворы. Такие водные растворы могут быть забуферены, при желании, и жидкий разбавитель сначала становится изотоническим с солевым раствором или глюкозой. Растворы гAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислотные фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в

воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсию гAAV также можно приготовить в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В этой связи все используемые стерильные водные среды легко доступны стандартными методами, хорошо известными специалистам в данной области.

[00109] Фармацевтические носители, разбавители или наполнители, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное), их подходящие смеси и растительные масла. Подходящее жидкое состояние может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть вызвано различными противобактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобным. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекцируемых композиций может быть достигнута путем использования агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[00110] Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения гAAV в необходимом количестве в соответствующем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией на фильтре. Обычно дисперсии готовят путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и метод сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

[00111] Трансдукция с помощью гAAV также может проводиться *in vitro*. В одном варианте осуществления желаемые мышечные клетки-мишени удаляют у субъекта, трансдуцируют с помощью гAAV и повторно вводят субъекту. Альтернативно, можно

использовать сингенные или ксеногенные мышечные клетки, когда эти клетки не будут генерировать неподходящий иммунный ответ у субъекта.

[00112] В данной области известны подходящие способы трансдукции и повторного введения трансдуцированных клеток субъекту. В одном варианте осуществления клетки могут трансдуцировать *in vitro* путем объединения гAAV с мышечными клетками, *например*, в соответствующих средах, и отбирать те клетки, которые несут интересующую ДНК, с использованием традиционных методов, таких как Саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с использованием селективных маркеров. Затем трансдуцированные клетки могут быть составлены в фармацевтические композиции, и композиция введена субъекту различными способами, такими как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу с использованием, *например*, катетера.

[00113] Трансдукция клеток гAAV по данному изобретению приводит к устойчивой экспрессии белка микродистрофина. Таким образом, в данном изобретении предложены способы введения/доставки гAAV, который экспрессирует белок микродистрофин, животному, предпочтительно человеку. Эти способы включают трансдукцию тканей (включая такие ткани, как мышцы, органы, такие как печень и мозг, и железы, такие как слюнные железы, но не ограничиваясь ими), одним или несколькими гAAV по данному изобретению. Трансдукция может быть осуществлена с помощью генных кассет, содержащих тканеспецифичные регулирующие элементы. Например, в одном варианте осуществления изобретения предложены способы трансформации мышечных клеток и мышечных тканей, управляемые специфичными для мышц регулирующими элементами, включая полученные из семейств генов актина и миозина, таких как из семейства генов *myoD* (см. Weintraub et al., *Science*, 251 : 761–766 (1991)), специфичный для миоцитов энхансер–связывающий фактор MEF–2 (Cserjesi и Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854–4862 (1991)), регулирующие элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека (Muscat et al., *Mol Cell Biol*, 7 : 4089–4099 (1987)), гена актина сердечных мышц, элементы последовательности мышечной креатинкиназы (см. Johnson et al., *Mol Cell Biol*, 9 : 3393–3399 (1989)) и элемент–энхансер креатинкиназы мышцы (mCK), регулирующие элементы, происходящие из быстро сокращающегося гена тропонина С скелетных мышц, медленно сокращающегося гена тропонина С сердечных мышц и медленно сокращающегося гена тропонина I: ядерные факторы, индуцируемые при гипоксии (Semenza et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 : 5680–5684 (1991)), стероид–индуцируемые элементы и промоторы, включающие глюкокортикоид–отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603–5607 (1993)) и другие регулирующие элементы, но не ограничиваясь ими.

[00114] Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. В данном изобретении предложена устойчивая экспрессия микродистрофина трансдуцированными миофибриллами.

[00115] Под «мышечной клеткой» или «мышечной тканью» подразумевают клетку или группу клеток, происходящих из мышц любого вида (например, скелетных мышц и гладких мышц, *например*, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или сердечной ткани). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, такими как миообласты, миоциты, мышечные трубочки, кардиомиоциты и кардиомиообласты.

[00116] Термин «трансдукция» используется для обозначения введения/доставки кодирующей области микродистрофина в реципиентную клетку либо *in vivo*, либо *in vitro* с помощью дефективного по репликации гAAV по данному изобретению, что приводит к экспрессии микродистрофина клеткой реципиента.

[00117] Таким образом, в данном изобретении предложены способы введения эффективной дозы (или доз, вводимых по существу одновременно или доз, вводимых с интервалами) гAAV, которые кодируют микродистрофин, пациенту, нуждающемуся в этом.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Получение конструкции рAAV.МНСК7.микродистрофин

[00118] Плазида рAAV.МНСК7.микродистрофин содержит кассету экспрессии с кДНК микродистрофина человека, фланкированную последовательностям инвертированного концевых повтора AAV2 (ITR) (см. Фиг. 1). Конструкция микродистрофина характеризовалась *god*-делецией в рамке считывания (R4–R23), в то время как шарниры 1, 2 и 4 и богатый цистеином домен остаются продуцирующими белок 138 кДа. Экспрессия белка микродистрофина (3579 п.н.) определялась промотором МНСК7 (795 п.н.). Плазмиду конструировали из плазмиды рAAV.МСК.микродистрофин путем удаления промотора МСК и вставки промотора МНСК7. После основного промотора расположен эндогенный экзон 1 (нетранслируемый) МСК мыши 53 п.н. для эффективной инициации транскрипции, за которым расположены SV40 поздние сигналы сплайсинга 16S/19S (97 п.н.) и короткий 5'UTR (61 п.н.). Интрон и 5'–UTR получены из плазмиды рCMVβ (Clontech). Кассета с микродистрофином имела консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом ATG и короткий синтетический сигнал поли А 53 п.н. для терминации мРНК. Кассета микродистрофина человека содержала домены (R4–R23/Δ71–78), как было описано ранее Harper et al. (*Nature Medicine* **8**, 253–261 (2002)). Комплементарную ДНК оптимизировали по кодону для использования для человека и синтезировали с помощью GenScript (Пискатауэй, Нью-Джерси) (*Mol Ther* **18**, 109–117 (2010)). Единственными вирусными последовательностями, включенными в этот вектор, были инвертированные концевые повторы AAV2, которые необходимы как для репликации вирусной ДНК, так и для ее упаковки. Кассета с микродистрофином имеет короткий 53 т.н. синтетический сигнал поли-А для терминации мРНК.

[00119] В предыдущих исследованиях была подтверждена экспрессия с

использованием промотора МНСК7 в сердечных мышцах (Salva et al. Mol Ther **15**, 320–329 (2007) и экспрессия AAVrh74 в скелетной, сердечной мышцах и диафрагме (Sondergaard et al. Annals of Clinical and Transl Neurology **2**, 256–270 (2015)). Последовательность конструкции на Фиг. 1 была инкапсидирована в вирионы AAVrh.74. Молекулярный клон серотипа AAVrh.74 был клонирован из лимфатического узла макака-резуса и описан в Rodino-Klapac et al. Journal of Translational medicine **5**, 45 (2007).

В **Таблице 1** приведены молекулярные признаки плазмиды рAAV.МНСК7.микродистрофин (SEQ ID NO: 3)

| Таблица 1. Молекулярные признаки плазмиды рAAV.МНСК7.микродистрофин | | | | |
|---|--------|-------|--------------------------|--|
| ТИП | НАЧАЛО | КОНЕЦ | НАЗВАНИЕ | ОПИСАНИЕ |
| ОБЛАСТЬ | 7 | 116 | 5' ITR | Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа |
| ОБЛАСТЬ | 236 | 1036 | МНСК7 | Комплекс тяжелая цепь миозина мышцы – энхансер/промотор слияния мышечной креатинкиназы E-box |
| ОБЛАСТЬ | 1046 | 1195 | Химерный интрон | 5'-донорный сайт гена β -глобина человека и точка ветвления и 3'-акцепторный сайт сплайсинга вариабельной области тяжелой цепи IgG |
| ГЕН | 1206 | 4786 | кДНК дистрофина человека | кДНК микродистрофина человека |
| ОБЛАСТЬ | 4787 | 4842 | Поли-А | Синтетическая поли-А |
| ОБЛАСТЬ | 4933 | 5042 | 3' ITR | Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа |
| ГЕН | 6808 | 7668 | AmpR | ген β -лактамазы |
| ОБЛАСТЬ | 7823 | 8442 | Ori | Точка начала репликации плазмиды |

Пример 2

Исследования внутримышечной экспрессии с использованием рAAV.МНСК7.микродистрофин

[00120] Исследования экспрессии проводили с использованием конструкции микродистрофина человека (rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, описаного в Примере 1) путем внутримышечной инъекции. В переднюю большеберцовую мышцу mdx-мышей

(мутантные мыши со спонтанной DMD^{mdx} , которые не экспрессируют дистрофин) делали инъекцию 1×10^{11} вг кассеты ($n=5$ в группе). Через шесть недель мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина (*Dys3*) с помощью N-концевого антитела для окрашивания дистрофина и гематоксилина и эозина (HE). На Фиг. 2 продемонстрирована диффузная экспрессия генов и снижение центрально расположенных ядер при дозе 1×10^{11} вг по сравнению с мышцами без обработки. Кроме того, наблюдалось снижение центральной нуклеации с увеличением среднего размера волокон/рамки после обработки конструкцией с микродистрофином. Уровни экспрессии конструкции rAAVrh74.MHCK7.микродистрофин были количественно оценены около 73%.

[00121] В дополнение к измерению локализации и уровней экспрессии микродистрофина, силу скелетных мышц измеряли после внутримышечной инъекции кассеты. Внутримышечная экспрессия конструкции rAAV.MHCK7.микродистрофин приводила к значительно большей выработке абсолютной и удельной силы по сравнению с контролями без обработки (Фиг. 3А и 3В, соответственно).

Пример 3

Системная доставка rAAVrh.74.MHCK7.микродистрофин mdx–мышам

[00122] Группе mdx–мышей в возрасте 6 недель вводили инъекцией через хвостовую вену либо 2×10^{12} вг (8×10^{13} вг/кг), либо высокую дозу (планируемую терапевтическую дозу) 6×10^{12} вг (2×10^{14} вг/кг) rAAVrh.74.MHCK7.микродистрофин. После 12 недель обработки все мышцы были собраны и окрашены на дистрофин и восстановление компонентов DAPC. Системно инъецированные (в хвостовую вену) мыши демонстрировали высокий уровень окрашивания дистрофина во всех мышцах. На Фиг. 4А представлена широко распространенная трансдукция скелетных, сердечных мышечных волокон и мышечных волокон диафрагмы после системной дозы 6×10^{12} вг (2×10^{14} вг/кг). На Фиг. 4В продемонстрирована количественная оценка процентного содержания мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин, в каждой ткани. Наконец, диафрагма была проверена на функциональное улучшение (Фиг. 4С). Никаких существенных различий не наблюдалось при слабой дозе, однако при высокой дозе наблюдалось значительное улучшение. Важно отметить, что Фиг. 5 демонстрирует, что другие компоненты DAPC были полностью восстановлены после доставки микродистрофина. Продемонстрирован бета–саркогликан (B–SG).

[00123] Токсикологию/безопасность AAVrh.74.MHCK7.микродистрофин оценивали путем введения вектора посредством внутривенной (iv) инъекции в хвостовую вену mdx–мышей согласно Таблице 2. Не было выявлено токсичности ни в одной из проанализированных мышечных тканей, включая: переднюю большеберцовую мышцу (TA), икроножную мышцу (GAS), квадрицепс (QD), поясничную мышцу (PSO), трицепс (TRI) и диафрагму (DIA) (Фиг. 6А и 6В). Количество центрально расположенных ядер уменьшалось при высокой дозе 6×10^{12} вг (2×10^{14} вг/кг). Исторически, центральная нуклеация в скелетных мышцах у mdx–мышей соответствующего возраста без обработки составляет в среднем $\sim 80\%$. Наконец, предварительные данные из небольшого размера

выборки (n=3) демонстрируют сниженный уровень высвобождения креатинкиназы (Ед/л) в сыворотке мышей, получавших высокую дозу (D). Независимые t-тесты были использованы для определения различий (p < 0,05); Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Таблица 2. План исследования токсикологии/безопасности rAAVrh.74.МНСК7.микродистрофин на мышах.

| Номер Когорты | Исследуемый агент | Доза (вг/кг) | Обработка День 0 | Последующее День 1 | Умерщвление в конечной точке эксперимента | |
|--------------------|--------------------------------|------------------------|---|--|---|---------------|
| | | | | | Неделя 6 | Дополнительно |
| (1) Низкая доза | AAVrh.74.МНСК7 .микродистрофин | 8,0 x 10 ¹³ | Однократная в/в инъекция в хвостовую вену mdx-мышей | Вес через 24 ч, клинические наблюдения | 5М | +2 |
| (2) Высокая доза | AAVrh.74.МНСК7 .микродистрофин | 2,0 x 10 ¹⁴ | | | 5М | +2 |
| (3) Контроль | Носитель (LRS) | 0 | | | 5М | +2 |
| ВСЕГО МЫШЕЙ | | | | | N=21 | |

Пример 4. Получение конструкции rAAV.МСК.микродистрофин

[00124] Плазмиду rAAV.МСК.микродистрофин конструировали, вставляя экспрессионную кассету МСК, управляющую оптимизированной по кодону последовательностью кДНК микродистрофина человека, в клонирующий вектор AAV psub201 (Samulski et al., J. Virol. 61 (10): 3096–3101). Мышечно-специфический регуляторный элемент был включен в конструкцию для стимулирования мышечно-специфической экспрессии генов. Этот регуляторный элемент включал основной энхансер МСК мыши (206 п.н.), слитый с основным промотором МСК 351 п.н. (проксимальный). После основного промотора конструкция включает эндогенный экзон 1 МСК мыши (нетранслируемый) 53 п.н. для эффективной инициации транскрипции, за которым расположены SV40 поздние сигналы сплайсинга 16S/19S (97 п.н.) и короткий 5'UTR (61 п.н.). Интрон и 5'UTR были получены из плазмиды pCMVβ (Clontech). Кассета с микродистрофином имеет консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом АТГ и короткий синтетический сигнал поли-А 53 п.н. для терминации мРНК. Кассета микродистрофина человека содержит домены (R4–R23/Δ71–78), как было описано ранее Harper et al. Nat. Med. 8(3): 253–61, 2002

[00125] Плазмида рAAV.МСК.микродистрофин содержала кассету экспрессии с кДНК микродистрофина человека, фланкированную последовательностями инвертированного концевой повтора AAV2 (ITR) (см. Фиг. 7). Эта последовательность была инкапсидирована в вирионы AAVrh.74. Молекулярный клон серотипа AAVrh.74 был клонирован из лимфатического узла макака–резуса и описан в Rodino–Kларас et al. *Journal of Tran. Med.* 45 (2007).

Пример 5 Анализ активности и дозы с использованием rAAV.МСК.микродистрофина

[00126] Исследования экспрессии проводились с использованием конструкции микродистрофина человека (rAAV.МСК.микродистрофин, описанный в Примере 1) путем внутримышечной инъекции. В переднюю большеберцовую мышцу (ТА) mdx–мышей (мутантные мыши со спонтанной DMDmdx, которые не экспрессируют дистрофин) делали инъекцию 3×10^9 , 3×10^{10} или 1×10^{11} вг (n=3 в группе). Через четыре недели мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина с использованием антител, специфичных для окрашивания N–концевого Dys3 и гематоксилина и эозина (HE). На Фиг. 8 продемонстрирована линейная корреляция между экспрессией и дозой, где очень низкая экспрессия (без эффекта) при 3×10^9 вг и 89% экспрессии при 1×10^{11} вг.

Пример 6 Васкулярная доставка rAAV.МСК.микродистрофина mdx–мышам

[00127] Использование модель перфузии изолированных конечностей (Rodino–Kларас et al., *J. Trans. Med.* 5 (45): 1–11, 2007), mdx–мышам (n=10) делали инъекции с 1×10^{11} вг rAAVrh.74.МСК.микродистрофина через бедренную артерию и проводили анализ результатов. Через три месяца после переноса гена мышцы нижних конечностей были собраны, и исследования эффективности продемонстрировали значительное улучшение как силы, так и устойчивости к повреждению, вызванному эксцентрическим сокращением (Фиг. 9).

[00128] Иммуноокрашивание белка дистрофина в мышцах длинного разгибателя пальцев (EDL) и мышцах ТА демонстрирует экспрессию в mdx–миофибрилах после обработки rAAVrh.74–МСК–микродистрофином (Фиг. 9А). Инфицированные положительным контролем мышцы окрашивали идентичным образом, и выдерживали соответствующее время. Фиг. 9В демонстрирует, что rAAVrh.74–МСК–микродистрофин значительно увеличивал нормализованную удельную силу по сравнению с mdx–мышцами, обработанными положительным контролем (P <0,05 по сравнению с mdx). Кроме того, mdx–мышцы, инфицированные rAAVrh.74–МСК–микродистрофином (человека), сравнивали с контралатеральными mdx–мышцами EDL, инфицированными положительным контролем (синего цвета), и мышцами EDL дикого типа (ДТ C57Bl/10) для снижения силы во время повторяющихся эксцентрических сокращений через 12 недель после переноса гена (Фиг. 9С). Было обнаружено, что обработка rAAVrh.74–МСК–микродистрофином (Микродистрофин) защищала от потери силы по сравнению с mdx–мышцами, подвергавшимися обработке положительным контролем (P <0,001 по сравнению с mdx).

Пример 7 Исследования на приматах

[00129] Чтобы применить доклинические результаты у мышей к клинической парадигме, примату, не являющемуся человеком (NHP), системно вводили дозу, чтобы оценить безопасность и эффективность для будущих клинических испытаний. Эффект суммарной дозы 2×10^{14} вг AAVrh74.MHCK7.микродистрофин. FLAG, доставленной внутривенно через головную вену, изучали на примате, не являющемся человеком. Эта доза была пропорциональна (на основе веса животного) системной дозе, вводимой мышам, и соответствовала средней дозе ($6,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы), вводимой мышам.

[00130] Исходные химические и иммунологические исследования, включая иммуноферментный спот-анализ (ELISpot) проводили для измерения количества Т-клеток против AAVrh.74 капсида и микродистрофина, а также титров антител анти-AAV. Три пептидных пула использовали для капсидного белка AAVrh.74 (Genemed Synthesis, Сан-Антонио, Техас), содержащих 34–36 пептидов, каждый длиной 18 аминокислот и перекрывающийся 11 остатками. Четыре пептидных пула, включающие белок микродистрофин.FLAG (Genemed Synthesis), каждый длиной 18 аминокислот и перекрывающийся 11 остатками. Конканавалин А (ConA) (Sigma, 1 мкг/мл) служил в качестве положительного контроля, а 0,25% диметилсульфоксид (ДМСО) – в качестве отрицательного контроля. Эти исследования повторяли каждые две недели на протяжении всего исследования. Через 3 месяца после обработки животных подвергали эвтаназии для получения аутопсии всех тканей. Иммунологические анализы не продемонстрировали каких-либо неожиданных ответов на капсид или трансген с помощью ELISpot (Фиг. 12А) и никаких неожиданных ответов антител на капсид AAVrh74 с помощью ELISA (Фиг. 12В).

[00131] Кроме того, результаты полного анализа крови и химической панели продемонстрировали небольшое повышение уровня ферментов печени, которые были нормализованы до исходного уровня без вмешательства или обработки, как продемонстрировано в Таблице 3 ниже.

Таблица 3

| <i>Химический анализ крови</i> | | | | | | | |
|---|------------------|---------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| 13–176 | Исходный уровень | 24 часа | 2 недели | 4 недели | 6 недель | 8 недель | 12 недель |
| Общий белок (6,4–7 мг/дл) | 7 | 7 | 6,7 | 6,6 | 6,6 | 6,6 | 6,7 |
| Биллирубин, общий (0,15–0,23 мг/дл) | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,4 |
| ALT (31–50 Ед/л) | 39 | 38 | 75 | 104 | 182 | 172 | 65 |

| | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AST (19–38 Ед/л) | 35 | 63 | 50 | 92 | 98 | 121 | 64 |
| Щелочная фосфатаза (504–821 Ед/л) | 417 | 396 | 332 | 383 | 598 | 608 | 578 |
| GGT | 77 | 77 | 120 | 106 | 131 | 156 | 134 |
| СК | 109 | 504 | 164 | 183 | 137 | 126 | 123 |

[00132] На протяжении всего исследования не было никаких других неожиданных химических показателей. Наконец, полный анализ всех скелетных мышц продемонстрировал обильную экспрессию в мышечных волокнах посредством иммунофлуоресцентного окрашивания специфическим антителом FLAG и обнаружением вестерн-блоттингом с использованием мышинового моноклонального антитела к дистрофину (Фиг. 14А, В).

[00133] Данные в совокупности демонстрируют, что системная доставка AAVrh74.МНСК7.микродистрофин.FLAG обеспечивает безопасность и эффективность при обильной экспрессии во всех скелетных мышцах примата, не являющегося человеком.

Пример 8. Доклиническое исследование для демонстрации эффективности

[00134] Было проведено доклиническое исследование для демонстрации эффективности системной доставки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин при лечении дефицита скелетных и сердечных мышц у mdx-мышей. Для этого исследования использовали вектор AAVrh74, содержащий оптимизированный по кодону трансген микродистрофина человека, управляемый специфичным мышечным и сердечным промотором, МНСК7, как описано в Примере 1.

[00135] Системные инъекции гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин через хвостовую вену mdx-мышам (нулевым дистрофином) были использованы для исследования доза-ответ. Результаты этого исследования продемонстрировали, что системные инъекции mdx-мышам были эффективными для нормализации гистологических и функциональных результатов, измеренных в конечностях и диафрагме в зависимости от дозы. Кроме того, после официальной проверки гистопатологии сертифицированным ветеринарным патологоанатомом не было отмечено значительной токсичности, связанной с вектором.

[00136] Вектор для этого исследования был получен от Национальной детской больницы Viral Vector Core с использованием метода тройной трансфекции клеток НЕК293 в условиях, пригодных для исследования. Характеристика вектора после получения включала определение титра с помощью количественной ПЦР со сверхспиральным стандартом, определение уровня эндотоксина (ЕЭ/мл) и оценку стерильности. Полученный вектор анализировали с помощью SDS-PAGE, чтобы проверить соответствие характер исчерченности с ожидаемым гAAV. Вектор был изготовлен с использованием плазмиды, содержащей конструкцию микродистрофина, специфический для мышц промотор МНСК7 для управления экспрессией, консенсусную

последовательность Козака (ССАСС), химерный интрон SV40, синтетический сайт полиаденилирования (53 п.н.) (Фиг. 1). Экспрессирующая кассета микродистрофина была клонирована между ITR AAV2, упакованными в вектор AAVrh74, для усиленной трансдукции скелетной и сердечной ткани.

[00137] Определение активности испытательного образца rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин было достигнуто путем выполнения внутримышечных инъекций вектора mdx–мышам. Мыши дикого типа служат в качестве положительного контроля, а инъекции стерильного раствора Рингера с лактатом mdx–мышам служат в качестве отрицательного контроля.

| Путь доставки | Штамм животных | Суммарная доза (вг) | № Мышей | Конечная точка обработки | Анализ |
|------------------------|----------------|---------------------|---------|--------------------------|--|
| В/м (Активность) | mdx | 1E+11 | 3 | 1 мес | ИФ, Н&Е |
| В/в (Эффективность) | mdx | 2E+12 | 5 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ. ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг |
| В/в (Эффективность) | mdx | 6E+12 | 8 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг |
| В/в (Эффективность) | mdx | 1,2E+13 | 8 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг |
| В/в (Эффективность) | C57BL/6 | 6E+12 | 5 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат. |
| В/в (Эффективность) | mdx | 6E+12 | 5 | 6 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат. |
| В/в (Эффективность) | mdx | — | 8 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., Пат. |

| | | | | | |
|------------------------|---------|---|---|-------|------------------------------|
| В/в (Эффективность) | C57BL/6 | — | 6 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., Пат. |
|------------------------|---------|---|---|-------|------------------------------|

ИФ: иммунофлуоресценция; Н&Е: окрашивание гематоксилином и эозином; Диаф./ТА Физ.: измерения удельной силы в диафрагме и мышце ТА; Пат: формальная гистопатология; «—»: без инъекции. Все животные, которым вводили инъекцию, обрабатывали в возрасте 4–5 недель и умерщвляли через 3 или 6 месяцев после инъекции. Контрольных мышей умерщвляли в возрасте 4 месяцев и 7 месяцев.

Таблица 4: Обзор плана исследования rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

[00138] Животным, указанным в таблице 4, вводили в указанном возрасте (4–5 недель) инъекцию в хвостовую вену для системной доставки. Чтобы выполнить точную дозировку с помощью внутримышечной инъекции, животных кратковременно анестезировали ингаляцией изофлурана. Дозы вводили путем прямой инъекции в переднюю мышцу большеберцовой нижней задней конечности. Для точного дозирования при системной доставке анестезия не требовалась. Дозы вводились васкулярно через хвостовую вену. Были приняты меры для точного внесения всей дозы вектора в сосуд. После того, как дозирование было выполнено, животных помещали на грелку до восстановления спонтанного движения, а затем возвращали в клетку. Наблюдения за каждым животным проводили еженедельно в течение всей продолжительности исследования.

[00139] В соответствующем возрасте, указанном в Таблице 4, мышей передозировали смесью кетамин/ксилазин (200 мг/кг/20 мг/кг). Кровь собирали с помощью пункции сердца, и цельную кровь отправляли на полный анализ крови (СВС), а сыворотку хранили при -80°C до анализа химического состава сыворотки в лаборатории Charles Rivers. Затем ткани собирали и отправляли на анализ независимому ветеринарному гистопатологу и для хранения.

[00140] Внутримышечная доставка rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин мышам с нулевым дистрофином при суммарной дозе 1×10^{11} вг приводила к $\sim 70\%$ экспрессии дистрофина в инъектированных мышцах ТА. Иммунофлуоресцентная визуализация мыши, получавшей дозированный вектор, подтвердила экспрессию гена микродистрофина.

Восстановление экспрессии дистрофина после системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

[00141] Определение эффективности испытательного образца rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин достигали путем выполнения системных инъекций mdx–мышам (*генотип: C57BL/10ScSn–Dmd^{mdx}/J*), с использованием эскалации дозы при низкой, средней и высокой дозе ($2,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы; $6,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы; $1,2 \times 10^{13}$ вг суммарной дозы) для оценки экспрессии трансгена и эффективности вектора при системной доставке в моменты времени 3 и 6 месяцев после инъекции. Мышам вводили инъекции в возрасте 4–5 недель, а полную аутопсию проводили через 3 и 6 месяцев после инъекции. Исходя из среднего веса животных в группе, эти дозы равны: 8

$\times 10^{13}$ вг/кг, 2×10^{14} вг/кг и 6×10^{14} вг/кг. Инъекция равного объема раствора Рингера с лактатом служила отрицательным контролем. Инъекция равного объема раствора Рингера с лактатом мышам C57BL/6 служила в качестве положительного контроля. Безопасность определяли путем выполнения системных инъекций мышам ДТ в дозе $6,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы (обозначается как группа ДТ ТХ–средняя доза). Иммунофлуоресцентное окрашивание скелетных мышц передней большеберцовой мышцы (ТА), икроножной мышцы (GAS), квадрицепса (QUAD), ягодичной мышцы (GLUT), поясничной мышцы, трицепса (TRI), диафрагмы (DIA) и сердца проводили для определения восстановления дистрофина и для обеспечения эффективности вирусного вектора rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин.

[00142] Скелетные мышцы (ТА, QUAD, GLUT, TRI) были извлечены вместе с сердцем и диафрагмой для анализа. Органы были также удалены для токсикологических исследований и исследований биораспределения. Экспрессия трансгена микродистрофина оставалась высокой после 3–6 месяцев обработки. Это сопровождалось улучшением мышечной гистопатологии и улучшением функции без каких–либо побочных эффектов со стороны органов–мишеней.

Изменение дистрофического фенотипа у mdx–мышей, системно обработанных rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

[00143] Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) скелетных мышц, диафрагмы и сердца было проведено для определения изменения и улучшения дистрофической патологии после системного введения инъекции rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин в суммарной дозе 2×10^{12} вг (низкая доза; n=1) 6×10^{12} вг суммарной дозы (средняя доза; n=8) и $1,2 \times 10^{13}$ вг суммарной дозы (высокая доза; n=8) для каждой дозы с эвтаназией через 12 недель после инъекции. Через 24 недели после инъекции оценивали вторую когорту животных, обработанную средней дозой (6×10^{12} вг суммарной дозы), для выявления и улучшения патологии дистрофина (n=5).

[00144] Иммунофлуоресцентное окрашивание для белка микродистрофина человека использовали для определения экспрессии трансгена микродистрофина в левой и правой сторонах шести скелетных мышц (ТА, GAS, QUAD, GLUT, psoas, TRI), а также диафрагмы и сердца у всех мышей с нулевым дистрофином, которым вводили инъекцию вектора микродистрофина. Это было выполнено, чтобы определить восстановление дистрофина и обеспечить эффективность вирусного вектора rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин при 2×10^{12} вг суммарной дозы (низкая доза; n=2), 6×10^{12} вг суммарной дозы (средняя доза; n=8) и $1,2 \times 10^{13}$ вг суммарной дозы (высокая доза; n=8) для каждой дозы с эвтаназией через 12 недель после инъекции.

[00145] Чтобы оценить эффективность экспрессии и трансдукции, изображения всех трех дозирующих когорт и левой и правой сторон каждой мышцы были использованы для количественной оценки. Для каждой мышцы было получено четыре 20–кратных изображения, и для каждого изображения был определен процент положительных микродистрофиновых волокон, что привело к среднему проценту

трансдукции для каждой мышцы. На Фиг. 14 и 15 представлены репрезентативные изображения обработанных мышцей средней дозой (6×10^{12} вг; 2×10^{14} вг/кг) и высокой дозой ($1,2 \times 10^{13}$ вг; 6×10^{14} вг/кг). Мыши с нулевым дистрофином, которым вводили инъекции раствора Рингера с лактатом, и которые соответствовали по возрасту, были включены как отрицательный контроль, а мышцы дикого типа, которым вводили инъекции раствора Рингера с лактатом, были включены как положительный контроль. Для сердца продемонстрировано $\geq 75\%$ у всех проанализированных животных.

[00146] В мышцах необработанных животных обнаружена обильная миопатия, в том числе жировая инфильтрация, центральная нуклеация, фиброз и очаговые области некроза. Окрашивание Н&Е на Фиг. 16 и Фиг. 17 иллюстрирует этот дистрофический фенотип у мышцей с нулевым дистрофином по сравнению с нормальными мышцами ДТ и улучшение мышечной патологии после обработки средней дозой (6×10^{12} вг; 2×10^{14} вг/кг) или высокой дозой ($1,2 \times 10^{13}$ вг; 6×10^{14} вг/кг). Количественная оценка гистологических параметров продемонстрировала снижение центральной нуклеации (Фиг. 18) и нормализацию среднего диаметра волокна (Фиг. 16 и 17) у обработанных мышцей во всех мышцах в зависимости от дозы. Окрашивание сириусом красным продемонстрировало снижение отложения коллагена в диафрагме как в когорте со средней, так и с высокой дозами по сравнению с необработанными (mdx LR) когортами (Фиг. 19).

Функциональная оценка системной обработки
rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

[00147] Чтобы определить, обеспечивает ли перенос гена микродистрофина функциональную силу поврежденной мышце, оценивали функциональные свойства как диафрагмы, так и передней большеберцовой мышцы у mdx-мышцей, мышцей ДТ и мышцей, которым вводили вектор, при трех уровнях дозы. Повышение дозы включало низкую дозу (8×10^{13} вг/кг), среднюю дозу (2×10^{14} вг/кг) и высокую дозу (6×10^{14} вг/кг). Функциональная оценка системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин с использованием оценки удельной силы ex vivo и снижения выходной силы после эксцентрических сокращений в ТА была использована через 24 недели после инъекции у животных, которым системно вводили инъекции rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин в дозе 6×10^{12} вг (средняя доза). Кроме того, удельная сила выхода в диафрагме была оценена у тех же животных.

[00148] Как продемонстрировано на предыдущих Фигурах, гистопатология демонстрировала более нормализованную среду с улучшениями в центральной нуклеации, отложении коллагена и размере волокон при средних и высоких дозах. Доставка в хвостовую вену rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин привела к постепенному улучшению удельной силы выхода в диафрагме ($176,9$ мН/мм² в группе со средней дозой в сравнении с $227,78$ мН/мм² в группе с высокой дозой). Кроме того, долгосрочно обрабатываемая группа представляет мышцей через 6 месяцев после инъекции (средняя доза 2×10^{14} вг/кг), и не было отклонений при долгосрочном выходной силе в диафрагме ($176,9$ мН/мм² в

сравнении с 194,9 мН/мм²) (Фиг. 20).

[00149] Кроме того, функциональный дефицит в передней большеберцовой мышце у mdx-мышей наблюдался по сравнению с мышцами ДТ. Mdx-мышцы продемонстрировали снижение выходной силы на 50% по сравнению с мышцами ДТ (171,3 мН/мм² в сравнении с 291,65 мН/мм²) и большую потерю силы после эксцентрических сокращений (32% потери в mdx; 5% потери в ДТ). Системная доставка средней дозы rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин приводила к 65,5% дистрофина в передней большеберцовой мышце и восстановлению удельной выходной силы, которая улучшилась до 235,4 мН/мм² и защищала мышцу от повреждения при повторном эксцентрическом сокращении только при уменьшении силы на 25% (Фиг. 21). Группа ДТ средняя доза представляет обработанную группу дикого типа, чтобы продемонстрировать отсутствие токсичности и поддержание функциональных результатов, измеренных после обработки вектором.

Резюме

[00150] После первоначальной демонстрации биоактивности путем внутримышечной инъекции было достигнуто сопоставимое или повышенное восстановление микродистрофина при вазиккулярной доставке при трансдукции скелетных мышц, диафрагмы и сердца. Эффективность продемонстрировала изменение дистрофических признаков в зависимости от дозы путем уменьшения воспаления, уменьшения количества вырождающихся волокон и улучшения функционального восстановления за счет защиты от эксцентрических сокращений в передней большеберцовой мышце и диафрагме. Функциональные преимущества вектора включают поэтапное улучшение до уровней дикого типа при генерации силы в диафрагме и ТА.

Пример 9 Токсикология и биораспределение системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

[00151] Органы и ткани mdx-мышей, которым системно вводили инъекцию rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, собирали для количественной ПЦР в реальном времени для выявления специфических последовательностей ДНК вектора. Белок, извлеченный из всех собранных органов и тканей, использовали для вестерн-блоттинга для обнаружения микродистрофина в органах, не являющихся мишенями.

[00152] В испытательный образец вводили три уровня дозы: низкую (2×10^{12} вг; 8×10^{13} вг/кг), среднюю (6×10^{12} вг; 8×10^{14} вг/кг) и высокую дозу ($1,2 \times 10^{13}$ вг; 6×10^{14} вг/кг) внутривенным путем в возрасте 4–5 недель. Чтобы оценить безопасность вектора, проводили окрашивание Н&Е на криосрезах мышечной ткани и всех основных органов, собранных у тех же самых групп мышей, которые были описаны ранее. Также были включены органы и мышцы мышей C57BL6 ДТ, которых системно обрабатывали вектором при средней дозе. Обработанные раствором Рингера с лактатом mdx-мышцы и мышцы ДТ также были включены для гистопатологического анализа. Эти срезы были официально проверены на токсичность сторонним сертифицированным ветеринарным патологоанатомом, и ни в одной из проб мышей не было обнаружено никаких побочных

эффектов; результаты приведены ниже.

[00153] Детали группы и план исследования показаны в 4 ниже.

Таблица 5: План исследования безопасности гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

| Путь доставки | Штамм животных | Суммарная доза (вг) | Количество мышей | Конечная точка обработки | Номер отчета о патологии |
|---------------|----------------|----------------------|------------------|--------------------------|------------------------------|
| Внутривенно | mdx | 2×10^{12} | 5 | 3 мес | AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.1 |
| Внутривенно | mdx | 6×10^{12} | 7 | 3 мес | AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.1/001.2 |
| Внутривенно | mdx | $1,2 \times 10^{13}$ | 8 | 3 мес | AAVrh74–mdx–MOUSE–001.2 |
| Внутривенно | C57BL/6 | 6×10^{12} | 5 | 3 мес | AAVrh74–mdx–MOUSE–001.2 |
| Внутривенно | mdx | 6×10^{12} | 5 | 6 мес | AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.3 |
| Внутривенно | mdx | — | 8 | 3 мес | AAVrh74–mdx–MOUSE–001.2 |
| Внутривенно | C57BL/6 | — | 6 | 3 мес | AAVrh74–mdx–MOUSE–001.2 |

Гистопатологический обзор трансдуцированной вектором ткани

[00154] В/в инъекция гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин не выявила каких-либо микроскопических изменений в миофибриллах каких-либо исследованных скелетных мышц. Кроме того, никаких повреждений, связанных с обработкой, не было обнаружено

ни в одной из тканей, оцененных гистологически. Любые отмеченные изменения наблюдались как у обработанных, так и у контрольных мышей и считались случайными результатами. Взятые вместе, эти данные указывают на то, что этот испытательный образец хорошо переносился испытуемыми. Кроме того, по сравнению с контрольными образцами от неопознанных по возрасту, необработанных mdx-мышей, введение rAAVrh74.MHCK7.микродистрофин уменьшало атрофию миофибрил у обработанных mdx-мышей, демонстрируя, таким образом, что испытательный образец может улучшить степень миопатии, связанной с дефицитом mdx.

[00155] В дополнение к обзору заболевших mdx-мышей, систематически обработанных вектором, rAAVrh74.MHCK7.микродистрофин системно доставляли пяти мышам ДТ C57BL/6 в дозе, идентичной минимально эффективной дозе (MED), установленной в исследованиях выше для mdx-мышей, 6×10^{12} вг суммарной дозы (2×10^{14} вг/кг). Это позволило при исследовании внутривенной доставки испытуемого изделия у здоровых мышей ДТ более точно определить, являются ли какие-либо побочные эффекты исключительно результатом лечения. В данном документе снова были собраны различные скелетные мышцы, включая диафрагму, а также сердце и пять других органов, и срезы H&E каждой ткани были формально рассмотрены независимым ветеринарным патологоанатомом.

Биораспределение генома вектора

[00156] Наличие специфических последовательностей ДНК испытательного образца исследовали с использованием количественного ПЦР-анализа в реальном времени (кПЦР). Анализ биораспределения проводили на образцах ткани, собранных у mdx-животных, получавших три дозы вектора согласно уровню дозы. Положительным сигналом было что-либо, равное или превышающее 100 копий одноцепочечных ДНК/мкг обнаруженной геномной ДНК. Ткани собирали при аутопсии и использовали наборы векторно-специфических праймерных зондов, специфичных для последовательностей промотора MHCK7. На Фиг. 22 и в Таблице 6 ниже представлены копии векторного генома, обнаруженные в каждом образце ткани у мышей, которым инъецировали rAAVrh74.MHCK7.микродистрофин.

Таблица 6: Количество копий генома вектора в органах и мышцах от mdx-мышей, получавших три дозы вектора согласно уровню дозы. Значения приведены в вг/мкг геномной ДНК.

| Ткань | 2,00E+12 | 6,00E+12 | 1,20E+13 |
|--------------|--|--|--|
| | (среднее количество копий вг/мкг) | (среднее количество копий вг/мкг) | (среднее количество копий вг/мкг) |
| Сердце | 2,84E+04 | 7,65E+05 | 5,35E+06 |
| Легкое | 3,14E+04 | 2,52E+05 | 1,49E+06 |
| Печень | 4,36E+04 | 1,11E+07 | 1,80E+07 |

| | | | |
|-------------------------------|----------|----------|----------|
| Почка | 1,96E+04 | 3,27E+05 | 1,06E+06 |
| Селезенка | 5,69E+04 | 5,27E+05 | 5,78E+05 |
| Гонада | 5,74E+04 | 3,68E+04 | 3,50E+05 |
| Диафрагма | 2,22E+04 | 3,55E+05 | 2,32E+06 |
| Поясничная мышца | 1,28E+05 | 1,60E+05 | 1,57E+06 |
| Трицепс | 1,60E+05 | 5,45E+05 | 2,50E+06 |
| Квадрицепс | 2,66E+06 | 6,57E+05 | 2,29E+06 |
| Икроножная мышца | 1,69E+05 | 5,80E+05 | 2,93E+06 |
| Передняя большеберцовая мышца | 5,86E+05 | 1,25E+05 | 1,32E+06 |

[00157] Транскрипт гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин был обнаружен в разных уровнях во всех собранных тканях. Как и ожидалось, самые высокие уровни были отмечены в скелетных мышцах и сердце. Самые низкие уровни были обнаружены в гонаде, легких, почках и селезенке. Эти данные указывают на то, что испытательный образец эффективно доставлялся во все исследуемые ткани мышей, которым вводили вектор.

[00158] Как демонстрируют результаты кПЦР, приведенные выше, внутривенная доставка гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин привела к распределению транскрипта вектора в разных уровнях в большинстве тканей, причем самые высокие уровни наблюдаются в печени, сердце и мышце квадрицепса (средняя доза) и печени, сердце и икроножной мышце (высокая доза). Следовательно, целью этой части исследования было определение экспрессии белка трансгена микродистрофина человека в указанных тканях для обеспечения функциональности специфического для мышц промотора МНСК7. Вестерн-блоттинг использовали для выявления экспрессии микродистрофина в образцах ткани.

[00159] Экспрессию белка и биораспределение вектора также оценивали с использованием кПЦР и вестерн-блоттинга (Фиг. 23), и эти данные указывают на нормальные уровни вектора в сторонних органах и минимальное обнаружение белка микродистрофина в печени, обработанной высокой дозой. Эти результаты коррелировали с отсутствием токсичности в печени, как определено патологоанатомом. Кроме того, химические составы сыворотки были проанализированы независимыми CRO (Charles River Laboratories), которые указывают нормальные значения во всех проанализированных химических составах. Было три аномальных значения в ферменте печени AST, 2 из которых были продемонстрированы в группе mdx-LR и 1 из которых в группе средней дозы (Фиг. 23). Подгруппа животных подверглась анализу креатинкиназы (СК), однако образцы были проанализированы до и после физиологической оценки. Анализ сыворотки подтверждает отсутствие токсичности после доставки испытательного образца.

[00160] Экспрессия белка микродистрофина наблюдалась в разных количествах во

всех образцах скелетных мышц, а также в образцах сердца (Фиг. 24). Тем не менее, было обнаружено минимальное количество белка в печени в когортах с высокой дозой. Считается, что это доброкачественный результат, и, возможно, присутствие в печени обусловлено экспрессией в гладких мышцах печени. Важно отметить, что не было никаких неблагоприятных гистопатологических эффектов в печени, отмеченных в отчете независимого патологоанатома.

Резюме

[00161] Гистопатологический обзор продемонстрировал, что в когорте mdx-LR обнаружена широко распространенная миопатия, затрагивающая все семь оцениваемых скелетных мышц, а также стенку правого желудочка сердца. Основные результаты гистопатологического обзора включали выраженную и обильную атрофию миофибрилл (30–75% нормального размера миофибрилл), минимальное или легкое воспаление мононуклеарных клеток, увеличение интерстициального пространства и увеличение цитоплазматических минеральных отложений. Диафрагма демонстрирует наиболее заметные изменения в инфильтрации мононуклеарных клеток и атрофии миофибрилл. Сердце демонстрирует несколько небольших очагов минимального накопления мононуклеарных клеток в миокарде желудочков. Когорты, которым вводили вектор, имели значительно уменьшенную миопатию во всех тканях скелетных мышц и сердце. Снижение гистопатологических результатов происходило в зависимости от дозы, в то время как группа с высокой дозой имела значительно меньшую дегенерацию и воспаление. Не было никаких побочных эффектов из-за обработки вектором rAAVrh74.MHCK7.микродистрофин, как было задокументировано в обработанной когорте ДТ, и в mdx-когорте, которой вводили дозу вектора. Были случайные находки в печени и легких у mdx-мышей и мышей ДТ независимо от обработки, при которой у мышей наблюдалась легкая вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов. Следовательно, испытательный образец был безопасным, эффективным, а защитный эффект зависел от дозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr. & Kunkel, L.M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919–928 (1987).
2. Straub, V. & Campbell, K.P. Muscular dystrophies and the dystrophin–glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* **10**, 168–175 (1997).
3. Sacco, A., et al. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* **143**, 1059–1071 (2010).
4. Wallace, G.Q. & McNally, E.M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* **71**, 37–57 (2009).
5. Zhou, L. & Lu, H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 771–776 (2010).
6. Desguerre, I., et al. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**,

762–773 (2009).

7. DiPrimio, N., McPhee, S.W. & Samulski, R.J. Adeno-associated virus for the treatment of muscle diseases: toward clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 553–560 (2010).

8. Mendell, J.R., et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol* **68**, 629–638 (2010).

9. Mendell, J.R., et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* **66**, 290–297 (2009).

10. Mendell, J.R., et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **23**, 192–201 (2015).

11. Carnwath, J.W. & Shotton, D.M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* **80**, 39–54 (1987).

12. Coulton, G.R., Morgan, J.E., Partridge, T.A. & Sloper, J.C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **14**, 53–70 (1988).

13. Cullen, M.J. & Jaros, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* **77**, 69–81 (1988).

14. Dupont-Versteegden, E.E. & McCarter, R.J. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* **15**, 1105–1110 (1992).

15. Stedman, H.H., et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **352**, 536–539 (1991).

16. Deconinck, A.E., et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 717–727 (1997).

17. Grady, R.M., et al. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 729–738 (1997).

18. Love, D.R., et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* **339**, 55–58 (1989).

19. Tinsley, J.M., et al. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591–593 (1992).

20. Tinsley, J., et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* **4**, 1441–1444 (1998).

21. Squire, S., et al. Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet* **11**, 3333–3344 (2002).

22. Rafael, J.A., Tinsley, J.M., Potter, A.C., Deconinck, A.E. & Davies, K.E. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* **19**, 79–82 (1998).

23. Zhou, L., et al. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J Neurol Sci* **264**, 106–111 (2008).
24. Gutpell, K.M., Hrinivich, W.T. & Hoffman, L.M. Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn+/- Mouse Validates Its Suitability as a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PloS one* **10**, e0117306 (2015).
25. Rodino-Klapac, L.R., et al. Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Human molecular genetics* **22**, 4929–4937 (2013).
26. Nevo, Y., et al. The Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), decreases fibrosis and improves muscle strength in dy/dy mouse model of muscular dystrophy. *PloS one* **6**, e18049 (2011).
27. Rodino-Klapac, L.R., et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* **5**, 45 (2007).
28. Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Ittleman, F., Blanchard, E.M. & Alpert, N.R. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* **65**, 1441–1449 (1989).
29. Rodino-Klapac, L.R., et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 109–117 (2010).
30. Grose, W.E., et al. Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. *PloS one* **7**, e39233 (2012).
31. Liu, M., et al. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Curr Opin Mol Ther* **11**, 245–256 (2005).
32. Harper, S.Q., et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. (*Nature Medicine* **8**, 253–261 (2002)).
33. Rodino-Klapac, L.R., et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* **18**, 109–117 (2010).
34. Salva, M.Z., et al. Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. *Mol Ther* **15**, 320–329 (2007).
35. Sondergaard, P.C., et al. AAV.Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Annals of clinical and translational neurology* **2**, 256–270 (2015).
36. De, B.P., et al. High levels of persistent expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10 adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses. *Mol Ther* **13**, 67–76 (2006).
37. Rodino-Klapac, L.R., et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of translational medicine* **5**, 45 (2007).
38. Bulfield et al., X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc*

Natl Acad Sci U S A. 1984; **81**(4): 1189–1192.

39. Sicinski et al., The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science. 1989 **30**;244(4912):1578–80

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> НАУЧНО–ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ В НАЦИОНАЛЬНОЙ
ДЕТСКОЙ БОЛЬНИЦЕ

<120> ДОСТАВКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЛЯ МЫШЦ МИКРОДИСТРОФИНА
АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫМ ВИРУСНЫМ ВЕКТОРОМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

<130> 28335/51475A PCT

<150> US 62/473148

<151> 2017–03–17

<160> 5

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 3579

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca gaagaagact 60
tttaccagt ggggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat cgagaatctg 120
ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaggact gactggccag 180
aagetgcccc aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt gaacaaagct 240
ctgagagtgc tgcagaaca caactggat ctggtgaata ttggcagtac tgatctctg 300
gacgggaacc acaaaactgac actgggctg atctggaaca ttattctgca ctggcagtg 360
aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga gaagatcctg 420
ctgtcttggg tgcggcagag caccgcaac tatccccagg tgaactgat taacttact 480
acatcctgga gcgacgggct ggcctgaat gctctgattc acagccacag gcctgatctg 540
ttgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgctgga acatgccttc 600
aatatcctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg accagagga tgtggacact 660
acataccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgtcca ggtgctgcca 720
cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tccccgccc ccccaaagt 780
actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgatt acagccagca gattaccgtg 840
agcctggctc agggatatga gcgaccaggt agtccaaaac cacggttcaa gtctacgct 900
tataccag ctgcctacgt gacaactage gaccctacta gatccccctt tccatccag 960
cacctggagg cccagagga caagagcttt gggccagcc tgatggaaag cgaggtgaat 1020
ctggatcgtt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag tgctgaagac 1080
aactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggatgaagga tcagttccac 1140
acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgctggg caatctctg 1200
cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagt aggacagga aacagaagt 1260

caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc tagtatggag 1320
 aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact gaaagagctg 1380
 aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga gccactggga 1440
 cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca ggaggatctg 1500
 gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatattg tgggtggtgt ggacgaatct 1560
 agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg ggaccgggtg 1620
 gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat cctgctgaaa 1680
 tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtctt ggctgagcga gaaagaggac 1740
 gccgtgaaca agatccacac aaccggctt aaggatcaga acgaaatgct gtctagcctg 1800
 cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat gggcaaactg 1860
 tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac ccagaagaca 1920
 gaagcctggc tggataactt tgcccgtgc tgggacaacc tggtcagaa actggagaaa 1980
 agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaaccagc ctagecctgac ccagacaacc 2040
 gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tctggtgaa acatgccag 2100
 gaagagetgc cactccacc tcccagaag aagagaacce tggagcggct gcaggagetg 2160
 caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgt taaggggtct 2220
 tggcagcctg tggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga aaaggtgaag 2280
 gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcattgaa cgatctggct 2340
 agacagctga caacctggg catccagctg agccataca atctgagcac actggaggac 2400
 ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg gcagctgcat 2460
 gaggeccatc gcgactcgg accagccagc cagcacttcc tgagcacatc cgtgcagggg 2520
 ccttgggaga gggccattc tcccacaag gtgccctact atattaatca cgagaccag 2580
 accactgtt gggaccatc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc cgatctgaac 2640
 aacgtgaggt tttagcctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca gaagccctg 2700
 tgctggatc tctgtccct gtcgccgcc tgcgatgcc tggatcagca taatctgaag 2760
 cagaacgatc agccaatgga tatctgcag atcatcaact gctgaccac tatctacgac 2820
 aggtggagc aggagcacia caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga tatgtcctg 2880
 aactggctgc tgaacgtgta tgacctggg cgcaccggcc ggatcagagt gctgagtttt 2940
 aaaactggga ttatctcct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag gtacctgttc 3000
 aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagccc gcctgggact gctgctgcat 3060
 gatagtatcc agattctag acagctggga gaggtggcta gttcggagg atctaacatc 3120
 gaaccagcg tgcgagctg tttccagttt gccataaca aacctgaaat cgaggctgct 3180
 ctgttctgg atggatgcg cctggaacca cagagcatgg tttggctgcc tgtgctgac 3240
 agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg caaggaatgt 3300
 cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aacatttta actacgatat ttgccagagc 3360
 tgettcttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat ggtggaatat 3420
 tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct gaagaataag 3480
 tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgatgg ggtatctgcc agtcagaca 3540
 gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtga 3579

<210> 2

<211> 810

<212> ДНК

<213> Адено-ассоциированный вирус

<400> 2

gtttaaaca gcttgcattg ctaagctaga ccttcagat taaaaataac tgaggttaagg 60
 gcctgggtag gggaggtggt gtgagacgct cctgtctctc ctctatctgc ccatcggecc 120
 tttggggagg aggaatgtgc ccaaggacta aaaaaaggcc atggagccag aggggagagg 180
 gcaacagacc tttcatgggc aaacctggg gccttctgt ctgcatgcc ccaactacggg 240
 tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct ggttataatt 300
 aaccagaca tgtggtgcc cccccccc caacacctgc tgcctctaaa aataacctg 360
 tcctggtg atccctgca tgcgaagatc ttcgaacaag gctgtggggg actgagggca 420
 ggctgtaaca ggcttggggg ccagggtta tacgtgctg ggactccaa agtattactg 480
 ttccatgtc cggggaagg gccagctgc ccccgccagc tagactcagc acttagttta 540
 ggaaccagtg agcaagtcag ccttggggc agccataca aggccatggg gctgggcaag 600
 ctgacgctt gggccgggg tggcacggt gccggggca cgagctgaaa gctcatctgc 660
 tctcagggc cctcctgg ggacagccc tctggctag tcacacctg taggtctctc 720
 tatataacc aggggcacag gggtgcct cattctacca ccacctccac agcacagaca 780
 gactcagg agccagccag cggcgcgcc 810

<210> 3

<211> 8611

<212> ДНК

<213> Адено-ассоциированный вирус

<400> 3

gccaatacg caaacgct ctccccgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60
 ctgctcgt cactgagcc gccggggca agccgggcg tggggcacc tttggtgcc 120
 cggcctcagt gacgagcga gcgcgagag agggagtgg caactccatc actaggggtt 180
 cttgtagt aatgattaac ccgcatgt aattatctac gtagccatgt ctgagttta 240
 aacaagctg catgtctaa gtagacctt cagattaaa ataactgagg taaggcctg 300
 ggtaggggag gtggtgtg acgtctctgt ctctctctc tctgcccac ggcctttg 360
 ggaggaggaa tgtgccaag gactaaaaa agccatgga gccagagggg cgagggcaac 420
 agaccttca tgggcaaac ttggggcctt gctgtctagc atgccccact acgggtctag 480
 gctgcccag taaggaggca aggcctgggg acaccgaga tgcctggtta taattaacc 540
 agacatgtg ctgccccccc ccccccaaca cctgctgct ctaaaaataa cctgtcct 600
 ggtggatccc ctgcatgca agatcttca acaaggctgt gggggactga gggcagctg 660
 taacaggctt gggggccagg gcttatact gctgggact ccaaaagtat tactgtcca 720
 tgtcccgc gaaggccag ctgtccccg ccagctagac tcagactta gtttagaac 780
 cagtgagca gtcagcctt ggggcagccc atacaaggcc atggggctgg gcaagctgca 840
 cgctgggtc cggggtggc acggtcccc ggcaacgagc taaaagctc tctgtctca 900
 ggggcccctc cctggggaca gccctctg gctagtcaca cctgtaggc tctctatat 960
 aaccagggg cacaggggt gccctctc taccaccac tccacagcag acacagacac 1020

tcaggagcca gccagcggcg cgcccaggta agtttagtct tttgtcttt tatttcaggt 1080
 cccggatccg gtggtgggtgc aatcaaaaga actgctcctc agtggatgtt gcctttactt 1140
 ctaggcctgt acggaagtgt tacttctgct ctaaaagctg cggaattgta cccgcggcgg 1200
 ccaccatgct gtggtgggag gaggtggagg attgttatga aagggaggac gtgcagaaga 1260
 agacttttac caagtgggtg aacgctcagt tcagcaaatt tgggaagcag cacatcgaga 1320
 atctgttttc cgacctgcag gatgggagac ggctgctgga tctgctggaa ggactgactg 1380
 gccagaagct gcccaaagag aaggggagca ctagggtgca cgccctgaac aacgtgaaca 1440
 aagctctgag agtgcctgcag aacaacaacg tggatctggt gaattttggc agtactgata 1500
 tctgggacgg gaaccacaaa ctgacctgg gcctgatctg gaacattatt ctgactggc 1560
 aggtgaaaaa tgtgatgaag aacatcatgg ccgggctgca gcagaccaat tccgagaaga 1620
 tctgctgctc ttgggtgctg cagagcaccg gcaactatcc ccaggatgaac gtgattaact 1680
 tcaactacac ctggagcgcac gggctggccc tgaatgctct gattcacagc cacaggcctg 1740
 atctgttcca ctggaatagc gtggtgtgcc agcagtctgc cacacagcgc ctggaacatg 1800
 ccttcaatat cgctcggtag cagctgggga tcaaaaaact gctggacca gaggatgtgg 1860
 aactacata ccagataaa aagtctatc tcatgtacat tactagcctg ttccaggtgc 1920
 tgccacagca ggtgtctatt gaagccatc aggaggtgga aatgctgccc cgcccccca 1980
 aagtactaa agaggagcat ttccagctgc atcatcagat gcattacagc cagcagatta 2040
 ccgtgagcct ggctcaggga tatgagcga ccagtagtcc aaaaccacgg tcaagctct 2100
 acgttatac ccaggctgac tacgtgaca ctagegacc tactagatcc cctttccat 2160
 cccagacct ggaggcccca gaggacaaga gctttgggtc cagcctgatg gaaagcgagg 2220
 tgaatctgga tgggtaccag acagccctgg aggaggtgct gagctggctg ctgagtctg 2280
 aagacacact gcaggccag ggcgaaattt ccaatgacgt ggaagtgggtg aaggatcagt 2340
 tccacacaca cgagggtat atgatggacc tgacagctca ccaggggcgc gtgggcaata 2400
 tctgcagct gggtctaaa ctgatcggca ccgggaaact gagtgaggac gaggaacag 2460
 aagtgcagga gcagatgaac ctgctgaaca gccgctggga gtgtctgaga gtggctagta 2520
 tggagaagca gtccaacctg caccgggtgc tcatggacct gcagaaccag aaactgaaag 2580
 agctgaacga ctggctgaca aagactgagg aacgcacaag gaagatggag gaggagccac 2640
 tgggaccga cctggaggat ctgaagagac aggtgcagca gcataaggtg ctgcaggagg 2700
 atctggaaca ggagcaggtg cgggtgaact cctgacaca tatggtggtg gtggtggacg 2760
 aatctagtgg agatcacgcc accgccgcc tggaggaaca gctgaaggtg ctgggggacc 2820
 ggtgggcca catttgccgg tggaccgagg acaggtgggt gctgctgcag gacatcctgc 2880
 tgaatggca gaggctgacc gaggagcagt gtctgtttag tgcttgctg agcgagaaaag 2940
 aggacgccgt gaacaagatc cacacaaccg gctttaagga tcagaacgaa atgctgtcta 3000
 gcctgcagaa actggctgtg ctgaaggccg atctggagaa aaagaagcag agcatgggca 3060
 aactgtatag cctgaaacag gacctgctga gcacctgaa gaacaagagc gtgaccaga 3120
 agacagaagc ctggctggat aactttgcc gctgctggga caacctggtg cagaaactgg 3180
 agaaaagtac agctcagatc tctaggctg tgaccacaac ccagcctagc ctgaccaga 3240
 caacctgat ggaaacctg accacctga caaccgcga acagatcctg gtgaaacatg 3300
 cccaggaaga gctgccacct ccacctccc agaagaagag aacctggag cggctgcagg 3360
 agctgcagga agccactgac gaactggacc tgaagctgag gcaggccgaa gtgattaagg 3420

ggtcttggca gcctgtgggc gatctgctga ttgattccct gcaggaccac ctggaaaagg 3480
 tgaaggctct gagaggcgaa attgctccac tgaaggagaa cgtgagtcac gtgaacgac 3540
 tggctagaca gctgacaaca ctgggcatcc agctgagccc atacaatctg agcacactgg 3600
 aggacctgaa taccaggtgg aagctgctgc aggtggctgt ggaagaccgg gtgcggcagc 3660
 tgcattgagc ccatcgcgac ttcggaccag ccagccagca cttctgagc acatccctgc 3720
 aggggcccctg ggagagggcc atttctcca acaaggtgcc ctactatatt aatcacgaga 3780
 cccagaccac ttgtggggac catccaaga tgacagaact gtaccagtc ctggccgac 3840
 tgaacaactg gaggtttagc gcttacagaa ccgctatgaa gctgagacgg ctgcagaagg 3900
 cctctgctct ggatctgctg tcctgtccg ccgctgcga tgcctggat cagcataatc 3960
 tgaagcagaa cgatcagcca atggatatcc tgcagatcat caactgctg accactatct 4020
 acgacaggtt ggagcaggag cacaacaacc tggatgaact gcctctgctg gtggatattg 4080
 gcctgaactg gctgctgaac gtglatgaca ctgggcgcac cggccggatc agagtctga 4140
 gttttaaaac tgggattatc tcctgtgta aggcccacct ggaggacaag tacaggtacc 4200
 tgttcaagca ggtggctagt agcactggat tttgtgacca gcgcccctg ggactgctgc 4260
 tgcattgatg tatccagatt cctagacagc tgggagaggt ggctagtctc ggaggatcta 4320
 acatcgaacc cagcgtgcgc agctgttcc agtttgcaca taacaaacct gaaatcgagg 4380
 ctgctctgtt cctggattgg atgcgctgg aaccacagag catgggtgtg ctgcctgtgc 4440
 tgcacagagt ggctcccgc gaaactgcca agcaccaggc taaatgcaac atctgcaagg 4500
 aatgtccat tatcgcttt cgctacagga gtctgaaaca ttttaactac gatatttgc 4560
 agagtctctt ctttccgga agagtggcca aaggacaca gatgcactac cctatgggtg 4620
 aatattgac cccaactaca tctggcgaag atgtgcgca ttttccaag gtgctgaaga 4680
 ataagtctg gactaagagg tacttcgcca agcaccctcg catgggtgat ctgccagtgc 4740
 agacagtctt ggaaggagac aatatggaga ccgatacaat gtgagcggcc gcaataaag 4800
 atctttattt tcattagatc tgtgtgtgg tttttgtgt gtctagagca tggtacgta 4860
 gataagtage atggcgggtt aatcattaac tacaaggaa ccttagtgat ggagttggcc 4920
 actccctctc tgcgcgctcg ctgctcact gaggcggggc gaccaaagt cgcggcagc 4980
 ccgggctttg cccggggcgc ctgagtgagc gagcgcgcgc gccagctggc gtaatagca 5040
 agaggcccgc accgatgcc ctccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggaagt 5100
 ccagacgatt gacgctcaaa atgtaggtat ttcatgagc gttttctg ttgcaatggc 5160
 tggcggtaat attgtctgg atattaccag caaggccgat agtttgattt cttctactca 5220
 ggcaagtgat gttactacta atcaagaag tattgcgaca acggttaatt tgcgtgatgg 5280
 acagactctt ttactcgtg gcctcactga ttataaaaac actctcagg attctggcgt 5340
 accgttctg tctaaaatcc cttaategg cctctgttt agctcccgt ctgattctaa 5400
 cgaggaaaag acgttatac gtctcgtcaa agcaaccata gtacgcgcc tgtagcggcg 5460
 cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgc 5520
 tagcgcgcgc tctttcgtt ttctccctt ctttctcgc cagttcgc gcccttccc 5580
 gtcaagctct aaatcggggg ctcccttag ggttccgatt tagtgattta cggcacctcg 5640
 acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatgcgcc tgatagacgg 5700
 ttttgcgcc ttgacgttg gagtccactt tcttaaatag tggactctg ttccaaactg 5760
 gaacaacact caacctatc tggctctatt cttttgattt ataagggtt ttgccgatt 5820

cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttaacaaaa 5880
 tattaacggt tacaatttaa atattgctt atacaatctt cctgtttttg gggcttttct 5940
 gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt acgattaccg ttcacgatt 6000
 ctctgtttg ctccagactc tcaggcaatg acctgatagc cttttagag acctctcaa 6060
 aatagctacc ctctccggca tgaattatc agctagaacg gttgaatata atattgatgg 6120
 tgattgact gtctccggcc ttctcacc gtttgaatct ttacctacac attactcagg 6180
 cattgcattt aaaatatatg agggttctaa aaattttat ccttgcgttg aaataaaggc 6240
 ttctcccgca aaagtattac agggtcataa tgttttggg acaaccgatt tagctttatg 6300
 ctctgagget ttattgctta attttctaa ttctttgctt tgctgtatg atttattgga 6360
 tgttggaaat tctgatgagc gtattttctc ctacgcac tgtgcggtat ttcacaccg 6420
 atatgggtca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac 6480
 ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttctctgc tcccggcacc cgttacaga 6540
 caagetgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgctagaggt ttccaccgct ataccgaaa 6600
 cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctattttat aggttaatgt catgataata 6660
 atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctattgt 6720
 ttattttctt aaatacttc aaatatgat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 6780
 ctcaataat attgaaaaag gaagagatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt 6840
 ccctttttg cggcattttg ccttctgtt ttgtctacc cagaaacgct ggtgaaagta 6900
 aaagatgctg aagatcagtt ggggtcaccg gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 6960
 ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaa 7020
 gttctgctat gtggcgcggt attatccctt attgacccg ggcaagagca actcggctgc 7080
 cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 7140
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtctgcca taacctagag tgataaact 7200
 gcgcccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc tttttgcac 7260
 aacatggggg atcatgtaac tcgcttggat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 7320
 ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtgcaatgg caacaacgtt gcgcaaaacta 7380
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 7440
 gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gccctccgg ctggctggtt tattgctgat 7500
 aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 7560
 aagccctccc gtatcgtagt tctctacag acggggagtc aggcaactat gmatgaacga 7620
 aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa 7680
 gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag 7740
 gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgtccac 7800
 tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaaa ggtcttctt gagatccttt tttctgcgc 7860
 gtaatctgct gcttgcacac aaaaaaaca ccgctaccag cgggtggttg tttgccggat 7920
 caagagctac caactctttt tccgaaggta actggttca gcagagcgca gataccaat 7980
 actgtcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcgt 8040
 acatacctcg ctctgctaat cctgttaca gtggctgctg ccagtggcga taagctgtgt 8100
 ctaccgggt tggactcaag acgatagta ccgataagg cgcagcggtc ggctgaacg 8160
 gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 8220

cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggga caggtatccg 8280
 gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg 8340
 tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 8400
 tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctctg 8460
 gcccttttgc ggccttttgc tcacatgttc tttctgcgt tateccctga ttctgtgat 8520
 aaccgtatta cggggtttga gtgagctgat accgctgcc gcagccgaac gaccgagcgc 8580
 agcagtcag tgagcgacca agcgggaagag c 8611

<210> 4

<211> 564

<212> ДНК

<213> Адено-ассоциированный вирус

<400> 4

cagccactat gggcttaggc tgcccatgta aggaggcaag gcctggggac accgagatg 60
 cctggttata ataaaccag acatgtggct gctcccccc cccaacacct gctgcctgag 120
 cctcaccccc accccgggtgc ctgggtctta ggctctgtac accatggagg agaagctcgc 180
 tctaaaaata accctgtccc tgggtggctg tgggggactg agggcaggct gtaacaggct 240
 tggggggccag ggcttatacg tgctgggac tccaaagta ttactgttcc atgttcccgg 300
 cgaagggcca gctgtcccc gccagctaga ctcagcactt agtttaggaa ccagtgagca 360
 agtcagccct tggggcagcc catacaaggc catggggctg ggcaagctgc acgctgggt 420
 ccggggtggg cacggtgccc gggcaacgag ctgaaagctc atctgctctc aggggcccct 480
 ccttggggac agccccctct ggctagtcac accctgtagg ctctctata taaccaggg 540
 gcacaggggc tgccccggg tcac 564

<210> 5

<211> 8409

<212> ДНК

<213> Адено-ассоциированный вирус

<400> 5

gccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60
 ctgctcget cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tggggcagc tttggtcgc 120
 cggcctcagt gagcagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180
 cttgtagtt aatgattaac ccgcatgct aattatctac gtagccatgt ctgacagcc 240
 actatgggtc taggctgccc atgtaaggag gcaaggcctg gggacaccgc agatgcctgg 300
 ttataattaa ccagacatg tggtgtctc cccccccaa cacctgctgc ctgagcctca 360
 ccccccccc ggtgctggg tcttaggctc tgtacacat ggaggagaag ctgctctaa 420
 aaataacct gtcctgggtg ggctgtgggg gactgagggc aggtgtaac aggttgggg 480
 gccagggctt atactgctt gggactccca aagtattact gttccatgtt cccggcgaag 540
 ggccagctgt cccccccag ctgactcag cacttagttt aggaaccagt gagcaagca 600
 gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa gctgcacgcc tgggtccggg 660
 gtgggcaggg tgccccggca acgagctgaa agctcatctg ctctcagggg cccctcctg 720
 gggacagccc ctctggteta gtcacacct gtaggctct ctatataacc caggggcaca 780

ggggctgcc cccgggtcacc accacctcca cagcacagac agacactcag gagccagcca 840
gccaggtlaag tttagtcttt ttgtctttta ttccaggtcc cggatccggt ggtggtgcaa 900
atcaaagaac tgctctcag tggatgtgc ctttacttct aggcctgtac ggaagtgtta 960
cttctgctct aaaagctgcg gaattgtacc cgcggcccgc accatgctgt ggtgggagga 1020
ggtggaggat tgttatgaaa gggaggacgt gcagaagaag acttttacc agtgggtgaa 1080
cgctcagttc agcaaattg ggaagcagca catcgagaat ctgtttccg acctgcagga 1140
tgggagacgg ctgctggatc tgctggaagg actgactggc cagaagctgc ccaaagagaa 1200
ggggagcact aggggtgcacg cctgaacaa cgtgaacaaa gctctgagag tgctgcagaa 1260
caacaacgtg gatctggtga atattggcag tactgatatc gtggacggga accacaaact 1320
gacactgggc ctgatctgga acattattct gcaactggcag tgaaaaatg tgatgaagaa 1380
catcatggcc gggctgcagc agaccaatc cgagaagatc ctgctgtctt ggggtcggca 1440
gagcaccgc aactatcccc aggtgaacgt gattaactc actacatcct ggagcgacgg 1500
gctggccctg aatgctctga ttcacagcca caggcctgat ctgttcgact ggaatagcgt 1560
ggtgtgccag cagtctgcca cacagcgct ggaacatgcc ttcaatcgc ctcggtacca 1620
gctggggatc gaaaaactgc tggaccaga ggatgtggac actacatacc cagataaaaa 1680
gtctattctg atgtacatta ctagectgtt ccagggtctg ccacagcagg tgtctattga 1740
agccattcag gaggtggaaa tgctgccccg ccccccaaa gtgactaaag aggagcattt 1800
tcagctgcat catcagatgc attacagcca gcagattacc gtgagcctgg ctcagggata 1860
tgagcgacc agtagtccaa aaccacggtt caagctctac gcttatacc aggetgcta 1920
cgtgacaact agcgacccta ctagatcccc ctttccatcc cagcacctgg aggecccaga 1980
ggacaagagc ttgggtcca gctgatgga aagcgaggtg aatctggatc ggtaccagac 2040
agccctggag gaggtgctga gctggctgct gagtctgaa gacacactgc aggccaggg 2100
cgaaatttc aatgacgtgg aagtgggtgaa ggatcagttc cacacacagc agggctatat 2160
gatggacctg acagctcacc aggggcgcgt gggcaatc ctgcagctgg gctctaaact 2220
gatcggcacc gggaaactga gtgaggacga ggaacagaa gtgcaggagc agatgaacct 2280
gctgaacagc cgctgggagt gctgagagt ggctagtatg gagaagcagt ccaacctgca 2340
ccgggtgctg atggacctgc agaaccagaa actgaaagag ctgaacgact ggctgacaaa 2400
gactgaggaa cgcacaagga agatggagga ggagccactg ggaccgacc tggaggatct 2460
gaagagacag gtgcagcagc ataagtgct gcaggaggat ctggaacagg agcaggtgcg 2520
ggtgaactcc ctgacacata tgggtggtg ggtggacgaa tctagtggag atcacgccac 2580
cgccgcctg gaggaacagc tgaagtgct gggggaccgg tggccaaca ttgcccgtg 2640
gaccgaggac aggtgggtgc tgctgcagga catctgctg aatggcaga ggctgaccga 2700
ggagcagtgt ctgtttagt cttggctgag cgagaaagag gacgccgtga acaagatcca 2760
cacaaccgc ttaaggatc agaacgaaat gctgtctagc ctgcagaaac tggctgtgct 2820
gaaggccat ctggagaaaa agaagcagag catgggcaaa ctgtatagcc tgaacagga 2880
cctgctgagc acctgaaga acaagagcgt gaccagaag acagaagcct ggctggataa 2940
ctttcccgc tgctgggaca acctggtgca gaaactggag aaaagtacag ctcagatctc 3000
tcaggtgtg accacaacc agcctagcct gaccagaca acctgatgg aaacctgac 3060
caccgtgaca acccgcaac agatctggt gaaacatgcc caggaagagc tgcacctcc 3120
acctccccag aagaagagaa cctggagcgc gctgcaggag ctgcaggaag cactgacga 3180

actggacctg aagctgaggc aggccgaagt gattaagggg tcttggcagc ctgtggcgca 3240
tctgctgatt gattccctgc aggaccacct ggaaaaggtg aaggctctga gaggcgaaat 3300
tgctccactg aaggagaacg tgagtcattg gaacgatctg gctagacagc tgacaacact 3360
gggcatccag ctgagcccat acaatctgag cactctggag gacctgaata ccaggtggaa 3420
gctgctgcag gtggtgtgag aagaccgggt gcggcagctg catgagggcc atcgcgactt 3480
cggaccagcc agccagcact ttctgagcac atccgtgcag gggccctggg agagggccat 3540
tttcccaac aaggtgccct actatattaa tcacgagacc cagaccactt gttgggacca 3600
tccaagatg acagaactgt accagtcctt ggccgatctg aacaacgtga ggtttagcgc 3660
ttacagaacc gctatgaagc tgagacggct gcagaaggcc ctgtgcttgg atctgctgtc 3720
cctgtccgcc gcctgcgatg ccttggatca gcataatctg aagcagaacg atcagccaat 3780
ggatatectg cagatcatca actgcctgac cactatctac gacaggttgg agcaggagca 3840
caacaacctg gtgaacgtgc ctctgtgctg ggalatgtgc ctgaactggc tgctgaactg 3900
gtatgacctg gggcgcaccg gccggatcag agtctgagtg tttaaaactg ggattatctc 3960
cctgtglaag gcccaactgg aggacaagta caggtacctg ttcaagcagg tggttagtag 4020
cactggattt tgtgaccagc gccgcctggg actgctgctg catgatagta tccagattcc 4080
tagacagctg ggagaggtgg ctagtctggg aggatctaac atcgaacca gcgtgcgcag 4140
ctgtttccag ttgccaata acaaacctga aatcgaggct gctctgttcc tggattggat 4200
gcgcctggaa ccacagagca tgggtgtgct gcctgtgctg cacagagtgg ctgccgccga 4260
aactgccaag caccaggcta aatgcaacat ctgcaaggaa tctccatta tctgctttcg 4320
ctacaggagt ctgaaacatt ttaactacga tatttgcagc agctgcttct tttccggaag 4380
agtggccaaa ggacacaaga tgcactacc cttggtggaa tattgcacc caactacatc 4440
tggcgaagat gtgcgcgatt ttgccaaggt gctgaagaat aagtttcgga ctaagaggta 4500
cttcgccaag ccccccgca tggggtatct gccagtgcag acagtgttgg aaggagaca 4560
tatggagacc gatacaatgt ggcggccgc aataaaagat ctttatttc attagatctg 4620
tgtttgggt tttgtgtgt ctgagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa 4680
tcattaacta caaggaacc ctagtgtgag agttggccac tccctctctg cgcctcctct 4740
cgctcactga gggcggcgca ccaaggtcg cccgacgcc gggctttgcc cggcggccct 4800
cagtgagcga gcgagcgcgc cagctggcgt aatagcgaag agggccgcac cgateccct 4860
tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggaaattcc agacgattga gcgtcaaaat 4920
gtaggtattt ccatgagcgt ttttctgtt gcaatggctg gcgtaatat tgttctggat 4980
attaccagca agggcgatag ttgagttct tctactcagg caagtgtgt tattactaat 5040
caaagaagta ttgcgacaac ggtaatttg cgtgatggac agactctttt actcgggtgc 5100
ctcactgatt ataaaaacac ttctcaggat tctggcgtac cgttctctc taaaatccct 5160
ttaatcgcc tctgttttag ctcccgtct gattctaac aggaaagcac gttatactg 5220
ctcgtcaag caaccatagt acgcgccgt tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt 5280
ggttacgcgc agcgtgaccg ctacactgc cagcgccta gcgccgctc ctttcgctt 5340
cttccctcc tttctcgca cgttcgccg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct 5400
cccttaggg ttccgattta gtgatttac gcacctgac ccaaaaaaac ttgattagg 5460
tgatggttca cgtagtggc catgcctctg atagacggtt tttccctt tgacgttga 5520
gtccacgttc ttaatatgt gactctgtt ccaaactgga acaactca accctatctc 5580

ggctattct tttgattat aaggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga 5640
 gctgattaa caaaaatfta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttaaat 5700
 atttgettat acaatcttcc tgttttggg gcttttctga ttatcaaccg gggtacatat 5760
 gattgacatg ctagtfttac gattaccgtt catcgattct ctgttttget ccagactctc 5820
 aggcaatgac ctgalagcct ttgtagagac ctctcaaaaa tagctaccct ctccggcatg 5880
 aatttatcag ctagaacggg tgaatatcat attgatggg atttgactgt ctccggcctt 5940
 tctcaccctg ttgaatcttt acctacacat tactcaggca ttgcatttaa aatatatgag 6000
 ggttctaaaa atttttatcc ttgcgttgaa ataaaggctt ctcccgcaaa agtattacag 6060
 ggtcataatg tttttggtac aaccgattta gctttatgct ctgaggcttt attgcttaat 6120
 tttgctaatt ctttgccttg cctglatgat ttattggatg ttggaagttc ctgatgcggg 6180
 attttctct tactgatctg tgcggatttt cacaccgcat atgggtgact ctcagtacaa 6240
 tctgctctga tcccgcatag ttaagccagc cccgacacc gccaacacc gctgacgcgc 6300
 cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg ctacagaca agctgtgacc gtctccggga 6360
 gctgcatgig tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg 6420
 tgatacgcct atttttatag gttaatgca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg 6480
 gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc ctatttgtt atttttctaa atacattcaa 6540
 atatglatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 6600
 agaglatgag tattcaacat ttccgtgctc ccttattcc ctttttgcg gcaftttgcc 6660
 ttctgtttt tctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 6720
 gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagtttc 6780
 gccccgaaga acgtttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcgggat 6840
 tatcccgtat tgacccggg caagagcaac tcggctcggc catacactat tctcagaatg 6900
 acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 6960
 aattatgcag tgctgcata accatgagtg ataactctgc ggccaactta cttctgacaa 7020
 cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt tttgcacaa catgggggat catgtaactc 7080
 gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 7140
 cgatgctgt agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc 7200
 tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc 7260
 tgcgctcggc cttccggct ggctggftta ttctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 7320
 ggtctcggg taccattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 7380
 tctacagac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 7440
 gtgctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 7500
 ttgatttaa acttcatttt taattfaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 7560
 tcatgaccaa aatcccftaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 7620
 agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaacaa 7680
 aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tcccgatca agagctacca actcttttc 7740
 cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaatac tctcttcta gtgtagccgt 7800
 agttaggcca ccaftcaag aactctgtag caccgcgtac atacctcgt ctgctaatcc 7860
 tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtctgtct tactgggttg gactcaagac 7920
 gatagttacc ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc acacagcca 7980

gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg 8040
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 8100
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcttgga tctttatagt cctgtcgggt 8160
ttcgccacct ctgactgag cgtcgatfff tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 8220
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttctggc cttttgctgg cttttgctc 8280
acatgttctt tctgctgta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gggtttgagt 8340
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaccaag 8400
cggaagagc 8409

ИЗМЕНЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-558937EA/019

ДОСТАВКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЛЯ МЫШЦ МИКРОДИСТРОФИНА ВЕКТОРАМИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

[001] Данное изобретение было реализовано при государственной поддержке в рамках гранта № NS055958, выделенного Национальным институтом здравоохранения/Национальным институтом неврологических расстройств и инсульта. Правительство имеет определенные права на изобретение.

[002] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной патентной заявки США № 62/473148, поданной 17 марта 2017 г., которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПО ССЫЛКЕ МАТЕРИАЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[003] Данная заявка содержит, в качестве отдельной части данного изобретения, Перечень последовательностей в машиночитаемой форме, который включен посредством ссылки в полном объеме и идентифицируется следующим образом: Название файла: 51475_Seqlisting.txt, Размер: 29519 байт, создан: 13 марта 2018 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[004] В изобретении предложены векторы генной терапии, такие как векторы аденоассоциированного вируса (AAV), экспрессирующие миниатюризированный ген микродистрофина человека, и способ использования этих векторов для экспрессии микродистрофина в скелетных мышцах, включая диафрагму и сердечную мышцу, и для защиты мышечных волокон от повреждений, увеличения мышечной силы и уменьшения и/или профилактики фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[005] Важность мышечной массы и силы для повседневной деятельности, такой как двигательная активность и дыхание, а также для метаболизма всего тела, является неоспоримой. Дефицит мышечной функции вызывает мышечные дистрофии (MD), которые характеризуются мышечной слабостью и истощением и оказывают серьезное влияние на качество жизни. Наиболее хорошо охарактеризованные MD являются результатом мутаций в генах, кодирующих членов дистрофин-ассоциированного белкового комплекса (DAPC). Эти MD возникают в результате хрупкости мембраны, связанной с потерей связывания сарколеммального цитоскелета с DAPC. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) является одним из самых разрушительных мышечных заболеваний, поражающих 1 из 5000 новорожденных мужского пола.

[006] DMD вызывается мутациями в гене DMD, приводящими к редукции мРНК и отсутствию дистрофина, сарколеммального белка 427 кДа, связанного с дистрофин-ассоциированным белковым комплексом (DAPC) (Hoffman et al., Cell 51 (6): 919–28, 1987). DAPC состоит из множества белков мышечной сарколеммы, которые образуют

структурную связь между внеклеточным матриксом (ЕСМ) и цитоскелетом через дистрофин, актин–связывающий белок, и альфа–дистрогликан, ламинин–связывающий белок. Эти структурные связи действуют для стабилизации мембраны мышечных клеток во время сокращения и защиты от повреждения, вызванного сокращением. При потере дистрофина хрупкость мембран приводит к сарколеммальным разрывам и притоку кальция, вызывая активацию кальциевых протеаз и некроз сегментарного волокна (Straub et al., *Curr Opin. Neurol.* 10 (2): 168–75, 1997). Этот неконтролируемый цикл мышечной дегенерации и регенерации в конечном итоге истощает популяцию мышечных стволовых клеток (Sacco et al., *Cell*, 2010. 143(7): p. 1059–71; Wallace et al., *Annu Rev Physiol*, 2009. 71: p. 37–57), что приводит к прогрессирующей мышечной слабости, эндомиоциальному воспалению и фиброзу рубцеванию.

[007] Без стабилизации мембраны дистрофином или микродистрофином, DMD будет проявлять неконтролируемые циклы повреждения и восстановления ткани, в конечном счете, замены потерянных мышечных волокон фиброзной рубцовой тканью путем пролиферации соединительной ткани. Фиброз характеризуется чрезмерным отложением белков матрикса ЕСМ, включая коллаген и эластин. Белки ЕСМ в основном продуцируются цитокинами, такими как TGF β , который выделяется активированными фибробластами, реагирующими на стресс и воспаление. Хотя основной патологической особенностью DMD является дегенерация миофибрилл и некроз, фиброз как патологическое последствие имеет одинаковые последствия. Чрезмерное производство фиброзной ткани ограничивает регенерацию мышц и способствует прогрессирующей мышечной слабости у пациентов с DMD. В одном исследовании, наличие фиброза на начальных биопсиях мышц с DMD сильно коррелировало с плохим прогнозом двигательной активности при 10–летнем периоде наблюдения (Desguerre et al., *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009. 68(7): p. 762–7). Эти результаты указывают на то, что фиброз является основной причиной мышечной дисфункции DMD, и подчеркивают необходимость раннего вмешательства до возникновения явного фиброза.

[008] Аденоассоциированный вирус (AAV) является дефективным по репликации парвовирусом, одноцепочечный ДНК–геном которого имеет длину около 4,7 т.п.н., включая 145–нуклеотидный инвертированный концевой повтор (ITR). Существует несколько серотипов AAV. Известны нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV. Например, нуклеотидная последовательность генома серотипа 2 AAV (AAV2) представлена в Srivastava et al., *J Virol*, 45: 555–564 (1983) as corrected by Ruffing et al., *J Gen Virol*, 75: 3385–3392 (1994). Как и другие примеры, полный геном AAV–1 представлен в GenBank под номером доступа NC_002077, полный геном AAV–3 представлен в GenBank под номером доступа NC_1829, геном AAV–4 представлен в GenBank под номером доступа NC_001829, геном AAV–5 представлен в GenBank под номером доступа AF085716, геном AAV–6 представлен в GenBank под номером доступа NC_001862, по меньшей мере фрагменты геномов AAV–7 и AAV–8 представлены в GenBank под номерами доступа AX753246 и AX753249, соответственно (см. также

Патенты США № 7282199 и № 7790449, относящиеся к AAV-8), геном AAV-9 представлен в статье Gao et al., J. Virol., 78: 6381–6388 (2004), геном AAV-10 представлен в Mol. Ther., 13(1): 67–76 (2006) и геном AAV-11 представлен в Virology, 330(2): 375–383 (2004). Клонирование серотипа AAVrh.74 описано в Rodino-Klapac., et al. Journal of translational medicine 5, 45 (2007). Цис-действующие последовательности, управляющие репликацией вирусной ДНК (гер), капсидированием/упаковкой и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR. Три промотора AAV (под названиями p5, p19 и p40 по их относительным положениям на карте) контролируют экспрессию двух открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены гер и сар. Два промотора гер (p5 и p19) в комбинации с дифференциальным сплайсингом одиночного интрона AAV (например, по нуклеотидам AAV2 2107 и 2227) приводят к получению четырех белков гер (гер 78, гер 68, гер 52 и гер 40) из гена гер. Белки гер обладают несколькими ферментативными свойствами, которые в конечном счете 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 транскрипции отвечают за продукцию трех родственных белков капсида. Одиночный консенсусный сайт полиаденилирования находится в положении 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97–129 (1992).

[009] AAV обладает уникальными особенностями, которые делают его привлекательным вектором доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование клеток AAV в культуре является нецитопатическим, а природная инфекция у людей и других животных является латентной и бессимптомной. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что обеспечивает адресное воздействие на различные типы тканей *in vivo*. Кроме того, AAV трансформирует медленно делящиеся и неделящиеся клетки и может присутствовать практически в течение всей жизни этих клеток в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Геном провируса AAV остается инфекционным при клонировании ДНК в плазмиды, что делает возможным конструирование рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV, капсидированием и интеграцией генома, содержатся в ITR генома AAV, приблизительно 4,3 т.п.н. внутренних фрагментов генома (кодирующих белки репликации и структурные белки капсида, гер-сар) можно частично или полностью заменить чужеродной ДНК, например, генной кассетой, содержащей промотор, нужную ДНК и сигнал полиаденилирования. Гер и сар белки могут быть предоставлены *in trans*. Еще одна важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно устойчивым вирусом. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56° С до 65° С в течение нескольких часов), что снижает критичность хранения AAV при низких температурах. AAV можно даже лиофилизировать. Наконец, AAV-инфицированные клетки не являются устойчивыми к суперинфекции.

[0010] Многочисленные исследования продемонстрировали длительную (> 1,5 года) рекомбинантную AAV-опосредованную экспрессию белка в мышцах. См. Clark et al., Hum Gene Ther, 8: 659–669 (1997), Kessler et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 14082–14087 (1996) и Xiao et al., J Virol, 70: 8098–8108 (1996). См. также Chao et al., Mol Ther, 2:619–623 (2000) и Chao et al., Mol Ther, 4:217–222 (2001). Кроме того, поскольку мышцы сильно васкуляризированы, рекомбинантная трансдукция AAV привела к появлению трансгенных продуктов в системном кровообращении после внутримышечной инъекции, как описано в Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 5804–5809 (1997) и Murphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94 : 13921–13926 (1997). Более того, Lewis et al., J. Virol, 76: 8769–8775 (2002) продемонстрировали, что скелетные миофибрилы обладают необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, фолдинга и секреции антител, что указывает на то, что мышцы способны стабильно экспрессировать секретируемые белковые терапевтические средства.

[0011] Функциональное улучшение у пациентов, страдающих DMD и другими мышечными дистрофиями, требует восстановления генов на ранней стадии заболевания. Существует необходимость в лечении, которое увеличивает мышечную силу и защищает от повреждений мышц у пациентов, страдающих DMD.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0012] Данное изобретение направлено на векторы генной терапии, например AAV, экспрессирующие ген микродистрофина в скелетных мышцах, включая диафрагму и сердечную мышцу, для защиты мышечных волокон от повреждения, увеличения мышечной силы и уменьшения и/или профилактики фиброза.

[0013] В изобретении предложены способы лечения и подходы для увеличения мышечной силы и/или увеличения мышечной массы с использованием векторов генной терапии для введения микродистрофина для устранения дефекта гена, наблюдаемого при DMD. Как показано в Примере 2, обработка генной терапией с микродистрофином приводила к большей мышечной силе *in vivo*. Кроме того, доставка генной терапии с микродистрофином внутримышечно и системно показало введение дистрофина в мышцы на мышинной модели *in vivo*.

[0014] В одном варианте осуществления в изобретении предложен вектор rAAV, содержащий нуклеотидную последовательность специфического для мышц регуляторного элемента элемента и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок микродистрофина. Например, нуклеотидная последовательность кодирует функциональный белок микродистрофин, где нуклеотид имеет, например, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более типично по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93% или 94% и еще более типично по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, причем белок сохраняет активность микродистрофина. Белок микродистрофин обеспечивает стабильность мышечной мембраны во время сокращения мышц, например, микродистрофин действует

как амортизатор во время сокращения мышц.

[0015] В изобретении также предложены векторы rAAV, в которых нуклеотидная последовательность кодирует функциональный белок микродистрофина, содержащий нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в строгих условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или ее комплиментами, и кодирует функциональный белок микродистрофин.

[0016] В одном варианте осуществления вектор rAAV представляет собой нереплицирующийся рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV), называемый rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin. Этот векторный геном содержит минимальные элементы, необходимые для экспрессии генов, включая инвертированные концевые повторы AAV2 (ITR), микродистрофин, интрон SV40 (SD SA) и сигнал синтетического полиаденилирования (Poly A), все под контролем промотора/энхансера MHCK7. Схема векторного генома и экспрессионной кассеты показана на Фиг. 1. Серотип AAVrh74 может быть использован для достижения эффективного переноса генов в скелетной и сердечной мышцах после внутривенного введения.

[0017] Термин «строгий» применяется для обозначения условий, которые обычно подразумеваются в данной области техники как строгие. Строгость гибридизации в основном определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих агентов, например, формамида. Примеры строгих условий гибридизации и промывок представляют собой 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при 65–68 °С, или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия, и 50% формамида при температуре 42 °С. См. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Также могут быть использованы более жесткие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокое содержание формамида или другого денатурирующего агента), однако это будет влиять на скорость гибридизации. В случаях, когда речь идет о гибридизации дезоксиолигонуклеотидов, дополнительные иллюстративные жесткие условия гибридизации включают промывание в 6х SSC 0,05% пиррофосфате натрия при 37 °С (для олигонуклеотидов с 14 основаниями), 48 °С (для олигонуклеотидов с 17 основаниями), 55 °С (для олигонуклеотидов с 20 основаниями) и 60 °С (для олигонуклеотидов с 23 основаниями).

[0018] Другие агенты могут быть включены в гибридизационные и промывочные буферы с целью снижения неспецифической и/или фоновой гибридизации. Примерами являются 0,1% бычий сывороточный альбумин, 0,1% поливинилпирролидон, 0,1% пиррофосфат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, NaDodSO₄, (SDS), фиколл, раствор Денхардта, обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося (или другая некомплементарная ДНК) и сульфат декстрана, хотя другие подходящие агенты также могут быть использованы. Концентрация и типы этих добавок могут быть изменены без существенного влияния на жесткость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8–7,4, однако в типичных условиях ионной силы

скорость гибридизации практически не зависит от pH. См. Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Специалист в данной области может отрегулировать условия гибридизации, чтобы приспособить эти переменные и дать возможность ДНК с различным родством последовательностей образовывать гибриды.

[0019] Термин «мышечный специфический регулирующий элемент» относится к нуклеотидной последовательности, которая регулирует экспрессию кодирующей последовательности, которая специфична для экспрессии в мышечной ткани. Эти регулирующие элементы включают энхансеры и промоторы. В данном изобретении предложены конструкции, содержащие промотор мышечных специфических регулирующих элементов МСКН7, промотор МСК и энхансер МСК.

[0020] Термин «функционально связанный» относится к позиционированию нуклеотидной последовательности регуляторного элемента, например промоторной нуклеотидной последовательности, для обеспечения экспрессии указанной нуклеотидной последовательности указанным регуляторным элементом.

[0021] В одном аспекте в изобретении предложен вектор гAAV, в котором мышечным специфическим регуливающим элементом является элемент гена скелетного актина человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфический энхансер-связывающий фактор (MEF), мышечная креатинкиназа (МСК), усеченная МСК (tМСК), тяжелая цепь миозина (МНС), гибрид энхансера тяжелой цепи α -миозина/энхансер-промотор-МСК (МНСК7), C5-12, элемент энхансера креатинкиназы мышцы, элемент гена быстро сокращающегося тропонина С скелетных мышц, элемент гена медленно сокращающегося тропонина С сердечных мышц, элемент гена медленно сокращающегося тропонина I, индуцируемые при гипоксии ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

[0022] Например, мышечный специфический регулирующий элемент представляет собой нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2 или мышечный специфический регулирующий элемент представляет собой нуклеотидную последовательность МСК SEQ ID NO: 4. Кроме того, в любом из векторов гAAV по данному изобретению нуклеотидная последовательность специфического для мышц регуляторного элемента, например нуклеотидная последовательность МНСК7 или МСК, функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок микродистрофин. Например, нуклеотидная последовательность промотора МНСК7 (SEQ ID NO: 2) функционально связана с кодирующей последовательностью микродистрофина человека (SEQ ID NO: 1), как представлено в конструкции, представленной на Фиг. 1 или Фиг. 10 (SEQ ID NO: 3). В другом примере, промотор МНСК (SEQ ID NO: 4) функционально связан с кодирующей последовательностью микродистрофина человека (SEQ ID NO: 1), как представлено в конструкции, представленной на Фиг. 7 или Фиг. 11 (SEQ ID NO: 5). В другом аспекте в изобретении предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В изобретении также

предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4.

[0023] В дополнительном аспекте в изобретении предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5. Например, вектор гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 и показан на Фиг. 10. Этот вектор гAAV содержит промотор МНСК7, химерную интронную последовательность, кодирующую последовательность гена микродистрофина человека, поли-А, устойчивость к ампициллину и каркас плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322.

[0024] В изобретении предложен рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 3. Этот вектор гAAV является AAV серотипа AAVrh.74.

[0025] В изобретении также предложен рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность конструкции рAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3. Этот вектор гAAV является AAV серотипа AAVrh.74.

[0026] Векторы гAAV по данному изобретению могут представлять собой любой серотип AAV, такой как серотип AAVrh.74, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

[0027] В изобретении также предложены фармацевтические композиции (или иногда называемые в данном документе просто «композициями»), содержащие любой из векторов гAAV по данному изобретению.

[0028] В другом варианте осуществления в изобретении предложены способы получения векторной частицы гAAV, включающей культивирование клетки, которая была трансфицирована любым вектором гAAV по данному изобретению, и извлечение частиц гAAV из супернатанта трансфицированных клеток. В изобретении также предложены вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению.

[0029] В изобретении предложены способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества любого из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению, экспрессирующих микродистрофин человека.

[0030] В изобретении предложены способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2.

[0031] В изобретении также предложены способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность конструкции

рAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3.

[0032] Термин «фиброз» относится к чрезмерному или нерегулируемому отложению компонентов внеклеточного матрикса (ECM) и аномальным процессам восстановления в тканях при повреждении, включая скелетные мышцы, сердечную мышцу, печень, легкое, почку и поджелудочную железу. Откладываемые компоненты ECM включают фибронектин и коллаген, например коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3.

[0033] В изобретении также предложены способы уменьшения или профилактики фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающие введение терапевтически эффективного количества любого рекомбинантного вектора AAV по данному изобретению.

[0034] В другом варианте осуществления в изобретении предложены способы профилактики фиброза у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV по данному изобретению. Например, любой из гAAV по данному изобретению можно вводить субъектам, страдающим мышечной дистрофией, для профилактики фиброза, например, гAAV по данному изобретению, экспрессирующий белок микродистрофин человека, можно вводить до того, как у субъекта обнаружен фиброз. Кроме того, гAAV по данному изобретению, экспрессирующий ген микродистрофина человека может быть введен субъекту с риском развития фиброза, например, страдающему от мышечной дистрофии или у которого диагностирована мышечная дистрофия, например, DMD. гAAV по данному изобретению можно вводить субъекту, страдающему мышечной дистрофией, для профилактики нового фиброза у этих субъектов.

[0035] В изобретении предложено введение любого из векторов AAV по данному изобретению до того, как у субъекта обнаружен фиброз. Кроме того, гAAV по данному изобретению может быть введен субъекту с риском развития фиброза, например пациенту, страдающему от мышечной дистрофии или у которого диагностирована мышечная дистрофия, например МДД. гAAV по данному изобретению можно вводить субъекту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже развился фиброз, для профилактики нового фиброза у этих субъектов.

[0036] В изобретении также предложены способы увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающие введение терапевтически эффективного количества вектора гAAV по данному изобретению, экспрессирующего ген микродистрофина человека. Эти способы могут дополнительно включать стадию введения гAAV, экспрессирующего микродистрофин.

[0037] В изобретении предложено введение любого из векторов AAV по данному изобретению пациентам с диагнозом DMD до того, как у субъекта был обнаружен фиброз, или до того, как мышечная сила была уменьшена или до того, как мышечная масса была уменьшена.

[0038] В изобретении также предложено введение AAV по данному изобретению субъекту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже развился фиброз, с целью

профилактики нового фиброза у этих субъектов или уменьшения фиброза у этих пациентов. В изобретении также предложено введение любого из гAAV по данному изобретению пациенту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже есть уменьшенная мышечная сила или уменьшенная мышечная масса, чтобы защитить мышцу от дальнейшего повреждения.

[0039] В любом из способов по данному изобретению субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как DMD, или любой другой дистрофин-ассоциированной мышечной дистрофии.

[0040] В другом аспекте вектор гAAV, экспрессирующий белок микродистрофин, содержит кодирующую последовательность гена микродистрофина, функционально связанную с мышечным специфическим регулирующим элементом, отличным от МНСК7 или МСК. Например, в качестве специфического для мышц регуляторного элемента используют элемент гена скелетного актина человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфический энхансер-связывающий фактор (MEF), tМСК (усеченный МСК), тяжелую цепь миозина (МНС), C5-12 (синтетический промотор), элемент энхансера креатинкиназы мышцы, элемент гена скелетного быстро сокращающегося тропонина С, элемент гена медленно сокращающегося сердечного тропонина С, элемент гена скелетного медленно изменяющийся элемент гена тропонина I, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

[0041] В любом из способов по данному изобретению вектор или композицию гAAV можно вводить путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

[0042] Кроме того, в любом из способов по данному изобретению вектор или композицию гAAV можно вводить системно. Например, вектор или композиция гAAV могут быть введены парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0043] В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции, содержащей любой из векторов гAAV по данному изобретению, для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом.

[0044] Кроме того, в изобретении предложена композиция, содержащая любой из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению, для профилактики фиброза у пациента, страдающего мышечной дистрофией.

[0045] В изобретении предложены композиции, содержащие любой из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению, для лечения мышечной дистрофии.

[0046] В изобретении предложены композиции, содержащие рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2 для лечения мышечной дистрофии.

[0047] В изобретении предложена композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAV, содержащий конструкцию рAAV.МНСК7.микродистрофин, содержащую

нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, для лечения мышечной дистрофии.

[0048] В изобретении также предложены композиции, содержащие любой из векторов rAAV по данному изобретению, для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией. В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложены композиции, содержащие любой из векторов rAAV по данному изобретению, для лечения мышечной дистрофии.

[0049] Композиции по данному изобретению могут быть составлены для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Композиция по данному изобретению также составлена для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0050] Кроме того, любая из композиций может быть составлена для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как DMD, или любой другой мышечной дистрофией, ассоциированной с дистрофином.

[0051] В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложено использование любого из векторов rAAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Например, нуждающийся субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как DMD или любой другой дистрофин-ассоциированной мышечной дистрофии.

[0052] В другом варианте осуществления в изобретении предложено использование вектора rAAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для профилактики фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

[0053] Кроме того, в изобретении предложено применение рекомбинантного вектора AAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

[0054] В изобретении также предложено использование векторов rAAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

[0055] В изобретении предложено использование рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2, для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

[0056] В изобретении предложено использование рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность конструкции rAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3, для лечения мышечной дистрофии.

[0057] В любом из применений данного изобретения лекарственное средство может быть составлено для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом из применений данного изобретения лекарственное средство может быть составлено для системного введения, такого как парентеральное введение, путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0058] Любое из лекарственных средств может быть приготовлено для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как DMD или любая другая мышечная дистрофия, связанная с дистрофином.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0059] На **Фиг. 1** показана конструкция рAAV.МНСК7.микродистрофин. В этой конструкции кассета экспрессии кДНК фланкирована инвертированными концевыми повторяющимися последовательностями AAV2 (ITR). Конструкция характеризуется год-делецией в рамке считывания (R4–R23), в то время как шарниры 1, 2 и 4 (H₁, H₂ и H₄) и богатый цистеином домен остаются продуцирующими белок 138 кДа. Экспрессия белка микродистрофина (3579 п.н.) определяется промотором МНСК7 (795 п.н.). Интрон и 5'-UTR получены из плазмиды рCMVβ (Clontech). Кассета с микродистрофином имела консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом ATG и короткий синтетический сигнал поли А 53 п.н. для терминации мРНК. Кассета микродистрофина человека содержала домены (R4–R23/Δ71–78), как было описано ранее Harper et al. (Nature Medicine 8, 253–261 (2002)).

[0060] На **Фиг.2** показана экспрессия белка дистрофина после внутримышечной доставки конструкции AAVrh74.МНСК7. В переднюю большеберцовую мышцу мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, делали инъекцию 1×10^{11} вг (n=5 в группе). Через шесть недель мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина с помощью N-концевого антитела для окрашивания дистрофина, гематоксилина и эозина.

[0061] На **Фиг. 3А–3В** представлены измерения силы скелетных мышц и количественная оценка экспрессии микродистрофина после внутримышечной инъекции конструкции AAVrh74.МНСК7. (А) В переднюю большеберцовую мышцу мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, делали инъекцию 1×10^{11} вг (n=5) с конструкцией AAVrh74.МНСК7. Через шесть недель передние большеберцовые мышцы собрали и подвергли измерениям силы *in vivo*. Группа с введенной дозой имела значительно большую выработку силы, чем контрольные группы с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, без обработки.

[0062] На **Фиг. 4А–4В** показана повсеместная трансдукция волокон скелетных мышц, диафрагмы и сердечных мышц после системного введения конструкции AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин. (А) Мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, обрабатывали системно в возрасте 6 недель через хвостовую вену 6×10^{12} вирусных геномов (2×10^{14} вг/кг) AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин после 12 недель лечения. (В) Окрашивание микродистрофина демонстрирует количественную оценку процентного количества мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин в каждой ткани. (С) Показывает удельную силу, измеренную в диафрагме при слабой и высокой (планируемой терапевтической) дозе. Никаких существенных различий не наблюдалось при слабой дозе, однако при высокой дозе наблюдалось значительное улучшение.

[0063] На **Фиг. 5** показана экспрессия белка дистрофина после системной доставки

конструкции AAVrh.74.MHCK7.микродистрофин. Мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, (n=5) обрабатывали системно, начиная с возраста 6 недель через хвостовую вену, 6×10^{12} вг AAVrh.74.MHCK7.микродистрофин. После 12 недель обработки все мышцы собрали и окрашивали на дистрофин и восстановление компонентов DAPC (показан бета-саркогликан).

[0064] На **Фиг. 6А–6Г** показана токсикологию/безопасность AAVrh.74.MHCK7. Окрашивание гематоксилина и эозина (H&E) проводили на следующих мышечных тканях для анализа токсичности: передняя большеберцовая мышца (TA), икроножная мышца (GAS), квадрицепс (QD), поясничная мышца (PSO), трицепс (TRI) и диафрагма (DIA) (Фиг. 6А). Токсичность не обнаружена. В качестве показателя эффективности было определено количество мышечных волокон с центрально расположенными ядрами (CN) (Фиг. 6Б). CN указывают на циклы мышечной дегенерации и регенерации, и, следовательно, уменьшение CN демонстрирует эффект обработки. (Фиг. 6В) демонстрирует, что общее количество волокон остается неизменным при обработке. Количество креатинкиназы показано на (Г), демонстрируя улучшение при высокой дозе. Независимые t-тесты были использованы для определения различий ($p < 0,05$); Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

[0065] На **Фиг. 7** показана плазмидная конструкция rAAV.MCK.микродистрофин.

[0066] На **Фиг. 8** представлены результаты анализа активности rAAVrh74.MCK.микродистрофин (человека). В переднюю большеберцовую мышцу мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, делали инъекцию 3×10^9 , 3×10^{10} или 1×10^{11} вг (n=3 в группе). Через четыре недели мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина с помощью N-концевого антитела Dys3. Наблюдалась линейная корреляция между экспрессией и дозой с очень малой экспрессией (без эффекта) при 3×10^9 вг и 89% экспрессии при 1×10^{11} вг.

[0067] На **Фиг. 9А–9В** показано, что микродистрофин человека улучшает генерацию силы и защиту от повреждения, вызванного эксцентрическим сокращением. (А) Иммуноное окрашивание белка дистрофина в длинном разгибателе пальцев (EDL) и TA демонстрирует экспрессию в mdx-миофибрилах после инъекции rAAVrh.74-MCK-микродистрофина (человека) через бедренную артерию. Мышцы, инфицированные положительным контролем, окрашивали идентичным образом и выдерживали соответствующее количество времени. (В) rAAVrh.74-MCK-микродистрофин значительно увеличивал нормализованную удельную силу по сравнению с mdx-мышцами, обработанными положительным контролем ($P < 0,05$ по сравнению с mdx). (С) mdx-мышцы, инфицированные rAAVrh.74-MCK-микродистрофином (человека), сравнивали с контралатеральными mdx-мышцами EDL, инфицированными положительным контролем, и мышцы EDL дикого типа (ДТ C57Bl/10) для снижения силы во время повторяющихся эксцентрических сокращений через 12 недель после переноса гена. Обработка rAAVrh.74-MCK-микродистрофином (микродистрофин) значительно защищала от потери силы по сравнению с mdx-мышцами, подвергавшимися обработке

положительным контролем ($P < 0,001$ по сравнению с mdx). Ошибки являются стандартными ошибками среднего.

[0068] На **Фиг. 10** представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 3 rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин).

[0069] На **Фиг. 11** представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 5 rAAVrh74.МСК.микродистрофин).

[0070] На **Фиг. 12А–12Б** представлен иммунологический ответ на системную доставку AAVrh74.МНСК7.микродистрофин у примата, который не является человеком. (А) Ответ ELISpot на пулы капсидов AAV и микродистрофина. ConA является положительным контролем, а DMSO является отрицательным контролем. Было три пула AAVrh74 и четыре пептидных пула, специфичных для микродистрофина. (В) Положительные ИФА–титры циркулирующих нейтрализующих антител к векторному капсиду. Сыворотку выделяли у приматов раз в две недели и анализировали в ней титр антител. Указанный титр соответствует последнему разведению, при котором отношение ответа ≥ 2 .

[0071] На **Фиг. 13А–Б** показана системная доставка в макаку–резус AAVrh74.МНСК7.микродистрофин. Иммунофлуоресцентное окрашивание анти–FLAG в левосторонних мышцах демонстрировало устойчивую экспрессию микродистрофина.

[0072] На **Фиг. 14** показан эффект системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на экспрессию трансгена. Иммунофлуоресцентное окрашивание микродистрофина с использованием N–концевого антитела к дистрофину в сердце, диафрагме, поясничной мышце и передней большеберцовой мышце (ТА) демонстрирует устойчивую экспрессию при средней ($6e12$ вирусных геномов; $2e14$ вг/кг) и высокой дозе ($1.2e13$ вг; $6e14$ вг/кг) обработанных животных через 3 месяца после инъекции. Показаны 20x изображения.

[0073] На **Фиг. 15** показано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на экспрессию трансгена. Иммунофлуоресцентное окрашивание микродистрофина с использованием N–концевого антитела к дистрофину в икроножной мышце, квадрицепсе, трицепсе и ягодичной мышце демонстрируют значительную экспрессию при средней ($6e12$ вг; $2e14$ вг/кг) и высокой дозе ($1.2e13$ вг, $6e14$ вг/кг) обработанных животных через 3 месяца после инъекции. Показаны 20x изображения.

[0074] На **Фиг. 16** показано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на мышечную патологию. (А) Окрашивание Н&Е диафрагмы, передней большеберцовой мышцы, икроножной мышцы и квадрицепса мышцей ДТ C57BL/6, mdx–мышцей и мышцей обработанных rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином (средняя доза – $2e14$ вг/кг; высокая доза – $6e14$ вг/кг), (В) Количественная оценка среднего размера волокна продемонстрировала нормализацию размера волокна по всей ткани. **** $p < 0,001$, однофакторный дисперсионный анализ; данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Показаны 20x изображения.

[0075] На **Фиг. 17** показано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на мышечную патологию. (А) Окрашивание Н&Е трицепса, ягодичной и поясничной мышц мышей ДТ C57BL/6, mdx–мышей и мышей, обработанных rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином, (средняя доза – 2×10^{14} вг/кг; высокая доза – 6×10^{14} вг/кг), (В) Количественная оценка среднего размера волокна продемонстрировала большие волокна в зависимости от дозы. **** $p < 0,001$, однофакторный дисперсионный анализ; данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Показаны 20x изображения.

[0076] На **Фиг. 18** показано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на центральную нуклеацию. Повышение дозы иллюстрирует уменьшение центральной нуклеации во всех скелетных мышцах и диафрагме. Двухфакторный дисперсионный анализ использовали для определения различий ($p < 0,05$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

[0077] На **Фиг. 19** показано влияние системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на отложение коллагена. Увеличение дозы иллюстрирует снижение накопления коллагена (%) в диафрагме. * $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ; данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Показаны 20x изображения.

[0078] На **Фиг. 20** показана коррекция дефицита силы в диафрагме. После 3 или 6 месяцев обработки собирали полоски мышц диафрагмы для измерения удельной силы (нормализованной к площади поперечного сечения). Обработка восстановило силу до уровня ДТ. * $p < 0,05$. Для определения отличий от mdx–LR мышей использовали однофакторный дисперсионный анализ.

[0079] На **Фиг. 21** показана коррекция дефицита силы в ТА. (А) После 3–6 месяцев обработки мышцы ТА собирали (как левую, так и правую) для измерения удельной силы (нормализованной к весу ТА). Обработка восстановило силу до уровня ДТ. (В) Обработка избавила мышцы ТА от усталости после строгого протокола эксцентрических сокращений. * $p < 0,05$. Для определения отличий от mdx–LR мышей использовали однофакторный дисперсионный анализ.

[0080] На **Фиг. 22** показано распределение среднего количества копий вг в различных тканях трех mdx–мышей после внутривенной доставки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин.

[0081] **Фиг. 23.** Химические составы сывороток у мышей, системно инъецированных ssAAVrh74.МНСК7.микродистрофином, и химические составы сывороток контрольных групп соответствующего возраста анализировали с помощью независимого CRO (Charles River Laboratories), который указывает нормальные значения во всех анализируемых химических веществах. Единственными ненормальными значениями были повышенные значения AST и ALT, отмеченные у mdx–животных, обработанных носителем [MDX–LR (раствор Рингера с лактатом)], которые были

нормализованы при обработке. Известно, что AST и ALT повышены при DMD. ALT=аланинаминотрансфераза, ALP/К=щелочная фосфатаза, AST=аспартатаминотрансфераза, BUN=азот мочевины крови, В/С=соотношение крови и креатинина, CREAT=креатин, GLU=глюкоза, TP=общий белок, TBIL=общий билирубин, DBIL=прямой билирубин.

[0082] На **Фиг. 24** представлено вестерн-блоттинг биораспределение на мышцы и органы от mdx-мышей, системно инъецированных rAAVrh74.MHCK7.микродистрофином.

[0083] На **Фиг. 25** представлена карта хелперной плазмиды pNLREP2-Caprh74 AAV.

[0084] На **Фиг. 26** представлена хэлперная плазида Ad pHELP.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0085] В данном изобретении предложены векторы генной терапии, например векторы rAAV, сверхэкспрессирующие микродистрофин человека, и способы уменьшения и профилактики фиброза у пациентов с мышечной дистрофией. Мышечные биопсии, взятые в самом раннем периоде диагностики DMD, показывают заметную пролиферацию соединительной ткани. Мышечный фиброз вреден во многих отношениях. Он уменьшает нормальный транзит эндомизиальных питательных веществ через барьеры соединительной ткани, уменьшает кровоток и лишает мышцы питательных компонентов, поступающих из сосудов, и функционально способствует ранней потере способности передвижения из-за контрактуры конечностей. Со временем проблемы с лечением увеличиваются в результате выраженного фиброза в мышцах. Это можно наблюдать на биопсии мышц, сравнивая пролиферацию соединительной ткани в последовательные моменты времени. Процесс продолжает усугубляться, приводя к потере способности передвижения и ускорению потере контроля, особенно у пациентов с инвалидной коляской.

[0086] Без раннего лечения, включая параллельный подход к снижению фиброза, маловероятно, что преимущества пропуска экзонов, считывания стоп-кодонов или заместительной генной терапии когда-либо будут полностью достигнуты. Даже низкомолекулярные вещества или стратегии замены белка могут потерпеть неудачу без подхода к снижению мышечного фиброза. Предыдущая работа на старых mdx-мышцах с существующим фиброзом, обработанных AAV.микродистрофином, продемонстрировала, что мы не смогли добиться полной функциональной реставрации (Liu, M., et al., Mol Ther 11, 245–256 (2005)). Также известно, что прогрессирование кардиомиопатии DMD сопровождается рубцеванием и фиброзом в стенке желудочка.

[0087] Используемый в данном документе термин «AAV» означает стандартную аббревиатуру для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК-парвовирус, который растет только в клетках, в которых определенные функции обеспечиваются коинфицирующим вирусом-помощником. В настоящее время охарактеризовано тринадцать серотипов AAV. Общую

информацию и обзоры AAV можно найти, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169–228, and Berns, 1990, Virology, pp. 1743–1764, Raven Press, (New York). Однако вполне ожидаемо, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны как структурно, так и функционально, даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, pp. 165–174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; и Rose, Comprehensive Virology 3: 1–61 (1974)). Например, все серотипы AAV, по-видимому, проявляют очень похожие свойства репликации, опосредованные гомологичными генами гер, и все они несут три родственных капсидных белка, таких как экспрессированные в AAV2. Степень родства дополнительно подтверждается гетеродуплексным анализом, который выявляет обширную перекрестную гибридизацию между серотипами по всей длине генома, и наличие аналогичных сегментов самоотжига на концах, которые соответствуют «последовательностям инвертированного концевых повтора» (ITR). Подобные паттерны инфекционности также предполагают, что функции репликации в каждом серотипе находятся под сходным регуляторным контролем.

[0088] Используемый в данном документе термин «вектор AAV» относится к вектору, содержащему один или несколько представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевых повторов AAV (ITR). Такие векторы AAV могут реплицироваться и упаковываться в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов гер и сар.

[0089] «Вирион AAV» или «вирусная частица AAV» или «векторная частица AAV» относятся к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного вектора AAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (то есть полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его обычно называют «векторной частицей AAV» или просто «вектором AAV». Таким образом, получение векторной частицы AAV обязательно включает производство вектора AAV, поскольку такой вектор содержится в векторной частице AAV.

AAV

[0090] Рекомбинантные геномы AAV по данному изобретению включают молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению и одну или несколько ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах rAAV может происходить из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая серотипы AAV ARArh.74, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13, но не ограничиваясь ими. Получение псевдотипированного rAAV раскрыто, например, в WO 01/83692. Другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с капсидными мутациями, также предложены. См., например, Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900–1909 (2014). Как отмечено выше в разделе «Уровень техники», в данной области известны

нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV. Для стимулирования специфической экспрессии скелетных мышц можно использовать AAV1, AAV6, AAV8 или AAVrh.74.

[0091] ДНК-плазмиды по данному изобретению содержат геномы гAAV по данному изобретению. ДНК-плазмиды переносят в клетки, восприимчивые к инфицированию вирусом-помощником AAV (например, аденовирусом, аденовирусом с делецией E1 или герпесвирусом) для сборки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Способы продукции частиц гAAV, при которых в клетку вводят геном AAV, подлежащий упаковке, гены гер и сар и функции вируса-помощника, являются стандартными в данной области техники. Продукция гAAV требует присутствия в одной клетке (называемой в данном документе пакующей клеткой) следующих компонентов: генома гAAV, отделенных от генома гAAV (т.е. не входящих в состав генома) генов гер и сар AAV, и функций вируса-помощника. Гены гер и сар AAV могут принадлежать AAV любого серотипа, для которого можно получить рекомбинантный вирус, и могут принадлежать AAV серотипа, отличающегося от серотипа ITR генома гAAV, включая серотипы AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAVrh.74, AAV-8, AAV-9, AAV -10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13, но не ограничиваясь ими. Получение псевдотипированного гAAV описано, например, в WO 01/83692, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0092] Способ получения пакующей клетки заключается в создании линии клеток, стабильно экспрессирующих все необходимые компоненты для продукции частиц AAV. Например, плазмиду (или несколько плазмид), содержащих геном гAAV без генов гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV, и маркер селекции, например, ген устойчивости к неомицину, встраивают в геном клетки. Геномы гAAV можно внедрить в бактериальные плазмиды посредством таких процедур, как концевое присоединение GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления эндонуклеазами рестрикции (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73), или прямое лигирование тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Пакующую клеточную линию затем заражают вирусом-помощником, таким как аденовирус. Преимущества этого способа заключаются в возможности отбора клеток и в том, что они подходят для крупномасштабной продукции гAAV. Другие примеры подходящих способов задействуют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки.

[0093] Общие принципы получения гAAV рассмотрены, например, Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Различные подходы описаны в статьях Ratschin et al., Mol. 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., Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al., J. Virol., 63:3822-3828 (1989); патенте США №

5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте 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. Vaccine 13:1244–1250 (1995); Paul et al. Human Gene Therapy 4:609–615 (1993); Clark et al. Gene Therapy 3:1124–1132 (1996); патенте США № 5786211; патенте США № 5871882; и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы тем самым полностью включены в данный документ посредством ссылок, с особым вниманием на разделы документов, которые касаются продукции гAAV.

[0094] Таким образом, в данном изобретении предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном варианте реализации упаковывающие клетки могут являться стабильно трансформированными раковыми клетками, например, клетками HeLa, клетками 293 и клетками PerC.6 (линии, родственной 293). В еще одном варианте реализации упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, например, клетки 293 после небольшого количества пересевов (клетки почки плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты плода человека), клетки WI-38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода макака-резуса).

[0095] Рекомбинантный AAV (*m.e.* инкапсидированные инфекционные частицы гAAV) по данному изобретению содержат геном гAAV. В иллюстративных вариантах осуществления геномы обоих гAAV лишены ДНК гер и сар AAV, то есть, не содержат ДНК гер и сар AAV между ITR геномов. Примеры гAAV, которые могут быть сконструированы так, чтобы содержать молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению, раскрыты в международной патентной заявке № PCT/US2012/047999 (WO 2013/016352), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0096] В иллюстративном варианте осуществления рекомбинантный вектор AAV по данному изобретению получают методом тройной трансфекции (Xiao et al., J Virol 72, 2224–2232 (1998) с использованием векторной плазмиды AAV pAAV.МНСК7.микродистрофин, pNLRep2–Caprh74 и pHelp, pAAV содержит каскету экспрессии гена микродистрофина, фланкированную последовательностями инвертированного концевой повтора (ITR) AAV2. Именно эта последовательность инкапсидирована в вирионах AAVrh74. Плазида содержит последовательность микродистрофина и энхансер МНСК7 и элементы основного промотора специфического для мышц промотора для управления экспрессией гена. Каскета экспрессии также содержит интрон SV40 (SD/SA) для обеспечения высокого уровня экспрессии гена и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста используется для эффективной терминации транскрипции.

[0097] PNLREP2–Caprh74 является плазмидой–помощником AAV, которая кодирует 4 белка гер AAV2 дикого типа и 3 белка капсида AAV VP дикого типа из серотипа rh74. Схематическая карта плазмиды pNLREP2–Caprh74 показана на Фиг. Error:

Reference source not found²⁵.

[0098] Аденовирусная плаزمида–помощник рHELP имеет 11635 п.н. и была получена от Applied Viromics. Плазмида содержит области генома аденовируса, которые важны для репликации AAV, а именно E2A, E4ORF6 и VA PНК (функции аденовируса E1 обеспечиваются клетками 293). Последовательности аденовируса, присутствующие в этой плазмиде, представляют только ~ 40% генома аденовируса и не содержат *цис*–элементов, критических для репликации, таких как концевые повторы аденовируса. Следовательно, получение инфекционного аденовируса в такой производственной системе не ожидается. Схематическая карта плазмиды рHELP показана на Фиг. 26.

[0099] rAAV можно очистить стандартными способами, известными в данной области техники, например, колоночной хроматографией или центрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия. Способы очистки векторов rAAV от вируса–помощника известны в данной области техники и включают способы, описанные, например, в статьях Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031–1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69: 427–443 (2002); патенте США № 6566118 и заявке WO 98/09657.

[00100] В другом варианте осуществления изобретения предложены композиции, содержащие rAAV по данному изобретению. Композиции по данному изобретению содержат rAAV и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы и поверхностно–активные вещества, такие как плуроники.

[00101] Титры rAAV, которые можно вводить в способах по данному изобретению, зависят, например, от конкретного rAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(–ов) клеток–мишеней; их можно определить посредством способов, стандартно применяемых в данной области техники. Титры rAAV могут варьировать 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} , от около 1×10^{13} до около 1×10^{14} или более устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки можно также выражать в единицах геномов вируса (вг).

[00102] В данном изобретении предложены способы трансформации клетки–мишени с помощью rAAV *in vivo* или *in vitro*. Способы *in vivo* включают стадию введения эффективной дозы или эффективных множественных доз композиции, содержащей rAAV по данному изобретению, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития расстройства/заболевания, введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития расстройства/заболевания, введение является терапевтическим. В вариантах осуществления изобретения эффективная доза представляет собой дозу, которая облегчает (устраняет или уменьшает) по меньшей мере один симптом, связанный с расстройством/болезненным состоянием, которое лечат, которая замедляет или предотвращает прогрессирование расстройства/болезненного

состояния, которая замедляет или предотвращает прогрессирование расстройства/болезненного состояния, которая уменьшает степень заболевания, что приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или продлевает выживаемость. Примером заболевания, предполагаемого для профилактики или лечения способами по данному изобретению, является DMD.

[00103] В данном изобретении также предложена комбинированная терапия. Используемая в данном документе комбинированная терапия включает как одновременное лечение, так и последовательное лечение. В частности, в данном изобретении специально предложены комбинации способов со стандартным медицинским лечением (*например*, кортикостероидами), а также комбинации с новыми терапиями.

[00104] Введение эффективной дозы композиций может осуществляться стандартными в данной области способами, включая внутримышечное, парентеральное, внутривенное, пероральное, буккальное, назальное, легочное, внутричерепное, внутрикостное, внутриглазное, ректальное или вагинальное, но не ограничиваясь ими. Способ(ы) введения и серотип(ы) компонентов AAV rAAV (в частности, ITR AAV и капсидный белок) по данному изобретению могут быть выбраны и/или согласованы специалистами в данной области с учетом инфекции и и/или болезненного состояния, подвергаемых лечению, и клетки-/ткань(и)-мишени, которые должны экспрессировать белок микродистрофин.

[00105] В изобретении предложено местное введение и системное введение эффективной дозы rAAV и композиций по данному изобретению. Например, системное введение – это введение в систему кровообращения для влияния на весь организм. Системное введение включает энтеральное введение, такое как всасывание через желудочно-кишечный тракт, и парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации.

[00106] В частности, фактическое введение rAAV по данному изобретению может быть осуществлено с использованием любого физического способа, который будет транспортировать рекомбинантный вектор rAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно данному изобретению включает инъекцию в мышцу и инъекцию в кровоток, но не ограничивается ими. Было продемонстрировано, что простого ресуспендирования rAAV в физиологическом растворе с фосфатным буфером достаточно для обеспечения носителя, полезного для экспрессии мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений для носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с rAAV (хотя в обычном режиме с rAAV следует избегать композиций, которые деградируют ДНК). Капсидные белки rAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы rAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде составов для инъекции или в виде составов для местного применения для доставки в мышцу посредством трансдермального транспорта. Многочисленные составы как для

внутримышечной инъекции, так и для трансдермального транспорта, были ранее разработаны и могут быть использованы при практическом применении данного изобретения. RAAV можно использовать с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обработки.

[00107] Дозировки гAAV, которые можно вводить в способах, описанных в данном документе, зависят, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток-мишеней; их можно определить посредством способов, стандартно применяемых в данной области техники. Титры каждого введенного гAAV могут варьироваться 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} , около 1×10^{14} или до около 1×10^{15} или больше устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки могут быть также выражены 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, 1×10^{15} соответственно). Дозировки также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (вг) на килограмм (кг) массы тела (*то есть* 1×10^{10} вг/кг, 1×10^{11} вг/кг, 1×10^{12} вг/кг, 1×10^{13} вг/кг, 1×10^{14} вг/кг, 1×10^{15} вг/ кг соответственно). Способы титрования AAV описаны в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031–1039 (1999).

[00108] В частности, фактическое введение гAAV по данному изобретению может быть осуществлено с использованием любого физического способа, который будет транспортировать рекомбинантный вектор гAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно данному изобретению включает инъекцию в мышцу и инъекцию в кровоток, но не ограничивается ими. Было продемонстрировано, что простого ресуспендирования гAAV в физиологическом растворе с фосфатным буфером достаточно для обеспечения носителя, полезного для экспрессии мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений для носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с гAAV (хотя в обычном режиме с гAAV следует избегать композиций, которые деградируют ДНК). Капсидные белки гAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы гAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде составов для инъекции или в виде составов для местного применения для доставки в мышцу посредством трансдермального транспорта. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для трансдермального транспорта, были ранее разработаны и могут быть использованы при практическом применении данного изобретения. RAAV можно использовать с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обработки.

[00109] Для целей внутримышечной инъекции можно использовать растворы в адьюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или в водном пропиленгликоле, а также стерильные водные растворы. Такие водные растворы могут быть забуферены, при желании, и жидкий разбавитель сначала становится изотоническим с солевым раствором

или глюкозой. Растворы гAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислотные фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсию гAAV также можно приготовить в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В этой связи все используемые стерильные водные среды легко доступны стандартными методами, хорошо известными специалистам в данной области.

[00110] Фармацевтические носители, разбавители или наполнители, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное), их подходящие смеси и растительные масла. Подходящее жидкое состояние может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть вызвано различными противобактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобным. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекируемых композиций может быть достигнута путем использования агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[00111] Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения гAAV в необходимом количестве в соответствующем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией на фильтре. Обычно дисперсии готовят путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и метод сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

[00112] Трансдукция с помощью гAAV также может проводиться *in vitro*. В одном

варианте осуществления желаемые мышечные клетки–мишени удаляют у субъекта, трансдуцируют с помощью гAAV и повторно вводят субъекту. Альтернативно, можно использовать сингенные или ксеногенные мышечные клетки, когда эти клетки не будут генерировать неподходящий иммунный ответ у субъекта.

[00113] В данной области известны подходящие способы трансдукции и повторного введения трансдуцированных клеток субъекту. В одном варианте осуществления клетки могут трансдуцировать *in vitro* путем объединения гAAV с мышечными клетками, *например*, в соответствующих средах, и отбирать те клетки, которые несут интересующую ДНК, с использованием традиционных методов, таких как Саузерн–блоттинг и/или ПЦР, или с использованием селективных маркеров. Затем трансдуцированные клетки могут быть составлены в фармацевтические композиции, и композиция введена субъекту различными способами, такими как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу с использованием, *например*, катетера.

[00114] Трансдукция клеток гAAV по данному изобретению приводит к устойчивой экспрессии белка микродистрофина. Таким образом, в данном изобретении предложены способы введения/доставки гAAV, который экспрессирует белок микродистрофин, животному, предпочтительно человеку. Эти способы включают трансдукцию тканей (включая такие ткани, как мышцы, органы, такие как печень и мозг, и железы, такие как слюнные железы, но не ограничиваясь ими), одним или несколькими гAAV по данному изобретению. Трансдукция может быть осуществлена с помощью генных кассет, содержащих тканеспецифичные регулирующие элементы. Например, в одном варианте осуществления изобретения предложены способы трансформации мышечных клеток и мышечных тканей, управляемые специфичными для мышц регулирующими элементами, включая полученные из семейств генов актина и миозина, таких как из семейства генов *myoD* (см. Weintraub et al., *Science*, 251 : 761–766 (1991)), специфичный для миоцитов энхансер–связывающий фактор MEF–2 (Cserjesi и Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854–4862 (1991)), регулирующие элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека (Muscat et al., *Mol Cell Biol*, 7 : 4089–4099 (1987)), гена актина сердечных мышц, элементы последовательности мышечной креатинкиназы (см. Johnson et al., *Mol Cell Biol*, 9 : 3393–3399 (1989)) и элемент–энхансер креатинкиназы мыши (mCK), регулирующие элементы, происходящие из быстро сокращающегося гена тропонина С скелетных мышц, медленно сокращающегося гена тропонина С сердечных мышц и медленно сокращающегося гена тропонина I: ядерные факторы, индуцируемые при гипоксии (Semenza et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 : 5680–5684 (1991)), стероид–индуцируемые элементы и промоторы, включающие глюкокортикоид–отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603–5607 (1993)) и другие регулирующие элементы, но не ограничиваясь ими.

[00115] Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. В данном

изобретении предложена устойчивая экспрессия микродистрофина трансдуцированными миофибриллами.

[00116] Под «мышечной клеткой» или «мышечной тканью» подразумевают клетку или группу клеток, происходящих из мышц любого вида (например, скелетных мышц и гладких мышц, *например*, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или сердечной ткани). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, такими как миообласты, миоциты, мышечные трубочки, кардиомиоциты и кардиомиообласты.

[00117] Термин «трансдукция» используется для обозначения введения/доставки кодирующей области микродистрофина в реципиентную клетку либо *in vivo*, либо *in vitro* с помощью дефективного по репликации гAAV по данному изобретению, что приводит к экспрессии микродистрофина клеткой реципиента.

[00118] Таким образом, в данном изобретении предложены способы введения эффективной дозы (или доз, вводимых по существу одновременно или доз, вводимых с интервалами) гAAV, которые кодируют микродистрофин, пациенту, нуждающемуся в этом.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Получение конструкции рAAV.МНСК7.микродистрофин

[00119] Плазида рAAV.МНСК7.микродистрофин содержит кассету экспрессии с кДНК микродистрофина человека, фланкированную последовательностям инвертированного концевых повтора AAV2 (ITR) (см. Фиг. 1). Конструкция микродистрофина характеризовалась *god*-делецией в рамке считывания (R4–R23), в то время как шарниры 1, 2 и 4 и богатый цистеином домен остаются продуцирующими белок 138 кДа. Экспрессия белка микродистрофина (3579 п.н.) определялась промотором МНСК7 (795 п.н.). Плазмиду конструировали из плазмиды рAAV.МСК.микродистрофин путем удаления промотора МСК и вставки промотора МНСК7. После основного промотора расположен эндогенный экзон 1 (нетранслируемый) МСК мышцы 53 п.н. для эффективной инициации транскрипции, за которым расположены SV40 поздние сигналы сплайсинга 16S/19S (97 п.н.) и короткий 5'UTR (61 п.н.). Интрон и 5'–UTR получены из плазмиды рCMVβ (Clontech). Кассета с микродистрофином имела консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом ATG и короткий синтетический сигнал поли А 53 п.н. для терминации мРНК. Кассета микродистрофина человека содержала домены (R4–R23/Δ71–78), как было описано ранее Harper et al. (*Nature Medicine* **8**, 253–261 (2002)). Комплементарную ДНК оптимизировали по кодону для использования для человека и синтезировали с помощью GenScript (Пискатауэй, Нью-Джерси) (*Mol Ther* **18**, 109–117 (2010)). Единственными вирусными последовательностями, включенными в этот вектор, были инвертированные концевые повторы AAV2, которые необходимы как для репликации вирусной ДНК, так и для ее упаковки. Кассета с микродистрофином имеет короткий 53 т.н. синтетический сигнал

поли-А для терминации мРНК.

[00120] В предыдущих исследованиях была подтверждена экспрессия с использованием промотора МНСК7 в сердечных мышцах (Salva et al. Mol Ther **15**, 320–329 (2007)) и экспрессия AAVrh74 в скелетной, сердечной мышцах и диафрагме (Sondergaard et al. Annals of Clinical and Transl Neurology **2**, 256–270 (2015)). Последовательность конструкции на Фиг. 1 была инкапсидирована в вирионы AAVrh.74. Молекулярный клон серотипа AAVrh.74 был клонирован из лимфатического узла макака-резуса и описан в Rodino-Klapac et al. Journal of Translational medicine **5**, 45 (2007).

В **Таблице 1** приведены молекулярные признаки плазмиды pAAV.МНСК7.микродистрофин (SEQ ID NO: 3)

| Таблица 1. Молекулярные признаки плазмиды pAAV.МНСК7.микродистрофин | | | | |
|---|--------|-------|--------------------------|---|
| ТИП | НАЧАЛО | КОНЕЦ | НАЗВАНИЕ | ОПИСАНИЕ |
| ОБЛАСТЬ | 7 | 116 | 5' ITR | Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа |
| ОБЛАСТЬ | 236 | 1036 | МНСК7 | Комплекс тяжелая цепь миозина мышцы – энхансер/промотор слияния мышечной креатинкиназы E-box |
| ОБЛАСТЬ | 1046 | 1195 | Химерный интрон | 5'-донорный сайт гена β-глобина человека и точка ветвления и 3'-акцепторный сайт сплайсинга вариабельной области тяжелой цепи IgG |
| ГЕН | 1206 | 4786 | кДНК дистрофина человека | кДНК микродистрофина человека |
| ОБЛАСТЬ | 4787 | 4842 | Поли-А | Синтетическая поли-А |
| ОБЛАСТЬ | 4933 | 5042 | 3' ITR | Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа |
| ГЕН | 6808 | 7668 | AmpR | ген β-лактамазы |
| ОБЛАСТЬ | 7823 | 8442 | Ori | Точка начала репликации плазмиды |

Пример 2

Исследования внутримышечной экспрессии с использованием rAAV.МНСК7.микродистрофин

[00121] Исследования экспрессии проводили с использованием конструкции

микродистрофина человека (rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, описаного в Примере 1) путем внутримышечной инъекции. В переднюю большеберцовую мышцу mdx–мышей (мутантные мыши со спонтанной DMD^{mdx}, которые не экспрессируют дистрофин) делали инъекцию 1×10^{11} вг кассеты (n=5 в группе). Через шесть недель мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина (Dys3) с помощью N–концевого антитела для окрашивания дистрофина и гематоксилина и эозина (HE). На Фиг. 2 показана диффузная экспрессия генов и снижение центрально расположенных ядер при дозе 1×10^{11} вг по сравнению с мышцами без обработки. Кроме того, наблюдалось снижение центральной нуклеации с увеличением среднего размера волокон/рамки после обработки конструкцией с микродистрофином. Уровни экспрессии конструкции rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин были количественно оценены около 73%.

[00122] В дополнение к измерению локализации и уровней экспрессии микродистрофина, силу скелетных мышц измеряли после внутримышечной инъекции кассеты. Внутримышечная экспрессия конструкции rAAV.МНСК7.микродистрофин приводила к значительно большей выработке абсолютной и удельной силы по сравнению с контролями без обработки (Фиг. 3А и 3Б, соответственно).

Пример 3

Системная доставка rAAVrh.74.МНСК7.микродистрофин mdx–мышам

[00123] Группе mdx–мышей в возрасте 6 недель вводили инъекцией через хвостовую вену либо 2×10^{12} вг (8×10^{13} вг/кг), либо высокую дозу (планируемую терапевтическую дозу) 6×10^{12} вг (2×10^{14} вг/кг) rAAVrh.74.МНСК7.микродистрофин. После 12 недель обработки все мышцы были собраны и окрашены на дистрофин и восстановление компонентов DAPC. Системно инъецированные (в хвостовую вену) мыши демонстрировали высокий уровень окрашивания дистрофина во всех мышцах. На Фиг. 4А представлена широко распространенная трансдукция скелетных, сердечных мышечных волокон и мышечных волокон диафрагмы после системной дозы 6×10^{12} вг (2×10^{14} вг/кг). На Фиг. 4Б показана количественная оценка процентного содержания мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин, в каждой ткани. Наконец, диафрагма была проверена на функциональное улучшение (Фиг. 4Б). Никаких существенных различий не наблюдалось при слабой дозе, однако при высокой дозе наблюдалось значительное улучшение. Важно отметить, что Фиг. 5 демонстрирует, что другие компоненты DAPC были полностью восстановлены после доставки микродистрофина. Показан бета–саркогликан (B–SG).

[00124] Токсикологию/безопасность AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин оценивали путем введения вектора посредством внутривенной (iv) инъекции в хвостовую вену mdx–мышей согласно Таблице 2. Не было выявлено токсичности ни в одной из проанализированных мышечных тканей, включая: переднюю большеберцовую мышцу (TA), икроножную мышцу (GAS), квадрицепс (QD), поясничную мышцу (PSO), трицепс (TRI) и диафрагму (DIA) (Фиг. 6А и 6Б). Количество центрально расположенных ядер уменьшалось при высокой дозе 6×10^{12} вг (2×10^{14} вг/кг). Исторически, центральная

нуклеация в скелетных мышцах у mdx–мышей соответствующего возраста без обработки составляет в среднем ~ 80%. Наконец, предварительные данные из небольшого размера выборки (n=3) демонстрируют сниженный уровень высвобождения креатинкиназы (Ед/л) в сыворотке мышей, получавших высокую дозу (D). Независимые t–тесты были использованы для определения различий (p <0,05); Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Таблица 2. План исследования токсикологии/безопасности rAAVrh.74.МНСК7.микродистрофин на мышцах.

| Номер Когорты | Исследуемый агент | Доза (вг/кг) | Обработка День 0 | Через День 1 | Умерщвление в конечной точке эксперимента | |
|--------------------|-------------------------------|------------------------|---|--|---|---------------|
| | | | | | Неделя 6 | Дополнительно |
| (1) Низкая доза | AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин | 8,0 x 10 ¹³ | Однократная в/в инъекция в хвостовую вену mdx–мышей | Вес через 24 ч, клинические наблюдения | 5М | +2 |
| (2) Высокая доза | AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин | 2,0 x 10 ¹⁴ | | | 5М | +2 |
| (3) Контроль | Носитель (LRS) | 0 | | | 5М | +2 |
| ВСЕГО МЫШЕЙ | | | | | N=21 | |

Пример 4. Получение конструкции rAAV.МСК.микродистрофин

[00125] Плазмиду rAAV.МСК.микродистрофин конструировали, вставляя экспрессионную кассету МСК, управляющую оптимизированной по кодону последовательностью кДНК микродистрофина человека, в клонирующий вектор AAV psub201 (Samulski et al., J. Virol. 61 (10): 3096–3101). Мышечно–специфический регуляторный элемент был включен в конструкцию для стимулирования мышечно–специфической экспрессии генов. Этот регуляторный элемент включал основной энхансер МСК мышцы (206 п.н.), слитый с основным промотором МСК 351 п.н. (проксимальный). После основного промотора конструкция включает эндогенный экзон 1 МСК мышцы (нетранслируемый) 53 п.н. для эффективной инициации транскрипции, за которым расположены SV40 поздние сигналы сплайсинга 16S/19S (97 п.н.) и короткий 5'UTR (61 п.н.). Интрон и 5'UTR были получены из плазмиды pCMVβ (Clontech). Кассета с микродистрофином имеет консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом АТG и короткий синтетический сигнал поли–А 53 п.н. для терминации

мРНК. Кассета микродистрофина человека содержит домены (R4–R23/Δ71–78), как было описано ранее Harper et al. *Nat. Med.* 8(3): 253–61, 2002

[00126] Плазмида рAAV.МСК.микродистрофин содержала кассету экспрессии с кДНК микродистрофина человека, фланкированную последовательностями инвертированного концевой повтора AAV2 (ITR) (см. Фиг. 7). Эта последовательность была инкапсидирована в вирионы AAVrh.74. Молекулярный клон серотипа AAVrh.74 был клонирован из лимфатического узла макака–резуса и описан в Rodino–Kларас et al. *Journal of Tran. Med.* 45 (2007).

Пример 5 Анализ активности и дозы с использованием rAAV.МСК.микродистрофин

[00127] Исследования экспрессии проводились с использованием конструкции микродистрофина человека (rAAV.МСК.микродистрофин, описанный в Примере 1) путем внутримышечной инъекции. В переднюю большеберцовую мышцу (ТА) mdx–мышей (мутантные мышцы со спонтанной DMDmdx, которые не экспрессируют дистрофин) делали инъекцию 3×10^9 , 3×10^{10} или 1×10^{11} вг (n=3 в группе). Через четыре недели мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина с использованием антител, специфичных для окрашивания N–концевого Dys3 и гематоксилина и эозина (HE). На Фиг. 8 показана линейная корреляция между экспрессией и дозой, где очень низкая экспрессия (без эффекта) при 3×10^9 вг и 89% экспрессии при 1×10^{11} вг.

Пример 6 Вазкулярная доставка rAAV.МСК.микродистрофин mdx–мышам

[00128] Использование модель перфузии изолированных конечностей (Rodino–Кларас et al., *J. Trans. Med.* 5 (45): 1–11, 2007), mdx–мышам (n=10) делали инъекции с 1×10^{11} вг rAAVrh.74.МСК.микродистрофин через бедренную артерию и проводили анализ результатов. Через три месяца после переноса гена мышцы нижних конечностей были собраны, и исследования эффективности продемонстрировали значительное улучшение как силы, так и устойчивости к повреждению, вызванному эксцентрическим сокращением (Фиг. 9).

[00129] Иммуноокрашивание белка дистрофина в мышцах длинного разгибателя пальцев (EDL) и мышцах ТА демонстрирует экспрессию в mdx–миофибрилах после обработки rAAVrh.74–МСК–микродистрофином (Фиг. 9А). Инфицированные положительным контролем мышцы окрашивали идентичным образом, и выдерживали соответствующее время. Фиг. 9Б демонстрирует, что rAAVrh.74–МСК–микродистрофин значительно увеличивал нормализованную удельную силу по сравнению с mdx–мышцами, обработанными положительным контролем (P <0,05 по сравнению с mdx). Кроме того, mdx–мышцы, инфицированные rAAVrh.74–МСК–микродистрофином (человека), сравнивали с контралатеральными mdx–мышцами EDL, инфицированными положительным контролем (синего цвета), и мышцами EDL дикого типа (ДТ C57Bl/10) для снижения силы во время повторяющихся эксцентрических сокращений через 12 недель после переноса гена (Фиг. 9В). Было обнаружено, что обработка rAAVrh.74–МСК–микродистрофином (Микродистрофин) защищала от потери силы по сравнению с mdx–

мышцами, подвергавшимися обработке положительным контролем ($P < 0,001$ по сравнению с mdx).

Пример 7 Исследования на приматах

[00130] Чтобы применить доклинические результаты у мышей к клинической парадигме, примату, не являющемуся человеком (NHP), системно вводили дозу, чтобы оценить безопасность и эффективность для будущих клинических испытаний. Эффект суммарной дозы 2×10^{14} вг AAVrh74.MHCK7.микродистрофин.FLAG, доставленной внутривенно через головную вену, изучали на примате, не являющемся человеком. Эта доза была пропорциональна (на основе веса животного) системной дозе, вводимой мышам, и соответствовала средней дозе ($6,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы), вводимой мышам.

[00131] Исходные химические и иммунологические исследования, включая иммуноферментный спот-анализ (ELISpot) проводили для измерения количества Т-клеток против AAVrh.74 капсида и микродистрофина, а также титров антител анти-AAV. Три пептидных пула использовали для капсидного белка AAVrh.74 (Genemed Synthesis, Сан-Антонио, Техас), содержащих 34–36 пептидов, каждый длиной 18 аминокислот и перекрывающийся 11 остатками. Четыре пептидных пула, включающие белок микродистрофин.FLAG (Genemed Synthesis), каждый длиной 18 аминокислот и перекрывающийся 11 остатками. Конканавалин А (ConA) (Sigma, 1 мкг/мл) служил в качестве положительного контроля, а 0,25% диметилсульфоксид (ДМСО) – в качестве отрицательного контроля. Эти исследования повторяли каждые две недели на протяжении всего исследования. Через 3 месяца после обработки животных подвергали эвтаназии для получения аутопсии всех тканей. Иммунологические анализы не показали каких-либо неожиданных ответов на капсид или трансген с помощью ELISpot (Фиг. 12А) и никаких неожиданных ответов антител на капсид AAVrh74 с помощью ELISA (Фиг. 12Б).

[00132] Кроме того, результаты полного анализа крови и химической панели показали небольшое повышение уровня ферментов печени, которые были нормализованы до исходного уровня без вмешательства или обработки, как показано в Таблице 3 ниже.

Таблица 3

| <i>Химический анализ крови</i> | | | | | | | |
|---|------------------|---------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| 13–176 | Исходный уровень | 24 часа | 2 недели | 4 недели | 6 недель | 8 недель | 12 недель |
| Общий белок (6,4–7 мг/дл) | 7 | 7 | 6,7 | 6,6 | 6,6 | 6,6 | 6,7 |
| Биллирубин, общий (0,15–0,23 мг/дл) | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,4 |

| | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ALT (31–50 Ед/л) | 39 | 38 | 75 | 104 | 182 | 172 | 65 |
| AST (19–38 Ед/л) | 35 | 63 | 50 | 92 | 98 | 121 | 64 |
| Щелочная фосфатаза (504–821 Ед/л) | 417 | 396 | 332 | 383 | 598 | 608 | 578 |
| GGT | 77 | 77 | 120 | 106 | 131 | 156 | 134 |
| СК | 109 | 504 | 164 | 183 | 137 | 126 | 123 |

[00133] На протяжении всего исследования не было никаких других неожиданных химических показателей. Наконец, полный анализ всех скелетных мышц продемонстрировал обильную экспрессию в мышечных волокнах посредством иммунофлуоресцентного окрашивания специфическим антителом FLAG и обнаружением вестерн-блоттингом с использованием мышинового моноклонального антитела к дистрофину (Фиг. 14А, Б).

[00134] Данные в совокупности демонстрируют, что системная доставка AAVrh74.МНСК7.микродистрофин.FLAG обеспечивает безопасность и эффективность при обильной экспрессии во всех скелетных мышцах примата, не являющегося человеком.

Пример 8. Доклиническое исследование для демонстрации эффективности

[00135] Было проведено доклиническое исследование для демонстрации эффективности системной доставки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин при лечении дефицита скелетных и сердечных мышц у mdx-мышей. Для этого исследования использовали вектор AAVrh74, содержащий оптимизированный по кодону транскрипционный микродистрофина человека, управляемый специфичным мышечным и сердечным промотором, МНСК7, как описано в Примере 1.

[00136] Системные инъекции гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин через хвостовую вену mdx-мышам (нулевым дистрофином) были использованы для исследования доза-ответ. Результаты этого исследования продемонстрировали, что системные инъекции mdx-мышам были эффективными для нормализации гистологических и функциональных результатов, измеренных в конечностях и диафрагме в зависимости от дозы. Кроме того, после официальной проверки гистопатологии сертифицированным ветеринарным патологоанатомом не было отмечено значительной токсичности, связанной с вектором.

[00137] Вектор для этого исследования был получен от Национальной детской больницы Viral Vector Core с использованием метода тройной трансфекции клеток НЕК293 в условиях, пригодных для исследования. Характеристика вектора после получения включала определение титра с помощью количественной ПЦР со сверхспиральным стандартом, определение уровня эндотоксина (ЕЭ/мл) и оценку стерильности. Полученный вектор анализировали с помощью SDS-PAGE, чтобы

проверить соответствие характер исчерченности с ожидаемым гAAV. Вектор был изготовлен с использованием плазмиды, содержащей конструкцию микродистрофина, мышечный специфический промотор МНСК7 для управления экспрессией, консенсусную последовательность Козака (ССАСС), химерный интрон SV40, синтетический сайт полиаденилирования (53 п.н.) (Фиг. 1Error: Reference source not found). Экспрессирующая кассета микродистрофина была клонирована между ITR AAV2, упакованными в вектор AAVrh74, для усиленной трансдукции скелетной и сердечной ткани.

[00138] Определение активности испытательного образца гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин было достигнуто путем выполнения внутримышечных инъекций вектора mdx–мышам. Мыши дикого типа служат в качестве положительного контроля, а инъекции стерильного раствора Рингера с лактатом mdx–мышам служат в качестве отрицательного контроля.

| Путь доставки | Штамм животных | Суммарная доза (вг) | № Мышей | Конечная точка обработки | Анализ |
|------------------------|----------------|---------------------|---------|--------------------------|---|
| В/м (Активность) | mdx | 1E+11 | 3 | 1 мес | ИФ, Н&Е |
| В/в (Эффективность) | mdx | 2E+12 | 5 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг |
| В/в (Эффективность) | mdx | 6E+12 | 8 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг |
| В/в (Эффективность) | mdx | 1,2E+13 | 8 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг |
| В/в (Эффективность) | C57BL/6 | 6E+12 | 5 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат. |
| В/в (Эффективность) | mdx | 6E+12 | 5 | 6 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., |

| | | | | | |
|------------------------|---------|---|---|-------|--------------------------------------|
| В/в (Эффективность) | mdx | — | 8 | 3 мес | Пат. ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., Пат. |
| В/в (Эффективность) | C57BL/6 | — | 6 | 3 мес | ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., Пат. |

ИФ: иммунофлуоресценция; Н&Е: окрашивание гематоксилином и эозином; Диаф./ТА Физ.: измерения удельной силы в диафрагме и мышце ТА; Пат: формальная гистопатология; «—»: без инъекции. Все животные, которым вводили инъекцию, обрабатывали в возрасте 4–5 недель и умерщвляли через 3 или 6 месяцев после инъекции. Контрольных мышей умерщвляли в возрасте 4 месяцев и 7 месяцев.

Таблица 4: Обзор плана исследования гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

[00139] Животным, указанным в таблице 4, вводили в указанном возрасте (4–5 недель) инъекцию в хвостовую вену для системной доставки. Чтобы выполнить точную дозировку с помощью внутримышечной инъекции, животных кратковременно анестезировали ингаляцией изофлурана. Дозы вводили путем прямой инъекции в переднюю мышцу большеберцовой нижней задней конечности. Для точного дозирования при системной доставке анестезия не требовалась. Дозы вводились васкулярно через хвостовую вену. Были приняты меры для точного внесения всей дозы вектора в сосуд. После того, как дозирование было выполнено, животных помещали на грелку до восстановления спонтанного движения, а затем возвращали в клетку. Наблюдения за каждым животным проводили еженедельно в течение всей продолжительности исследования.

[00140] В соответствующем возрасте, указанном в Таблице 4, мышей передозировали смесью кетамин/ксилазин (200 мг/кг/20 мг/кг). Кровь собирали с помощью пункции сердца, и цельную кровь отправляли на полный анализ крови (СВС), а сыворотку хранили при -80°C до анализа химического состава сыворотки в лаборатории Charles Rivers. Затем ткани собирали и отправляли на анализ независимому ветеринарному гистопатологу и для хранения.

[00141] Внутримышечная доставка гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин мышам с нулевым дистрофином при суммарной дозе 1×10^{11} вг приводила к $\sim 70\%$ экспрессии дистрофина в инъектированных мышцах ТА. Иммунофлуоресцентная визуализация мыши, получавшей дозированный вектор, подтвердила экспрессию гена микродистрофина.

Восстановление экспрессии дистрофина после системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином

[00142] Определение эффективности испытательного образца гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин достигали путем выполнения системных инъекций mdx–мышам (*генотип: C57BL/10ScSn–Dmd^{mdx}/J*), с использованием эскалации дозы при низкой, средней и высокой дозе ($2,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы: $6,0 \times 10^{12}$ вг суммарной

дозы; $1,2 \times 10^{13}$ вг суммарной дозы) для оценки экспрессии трансгена и эффективности вектора при системной доставке в моменты времени 3 и 6 месяцев после инъекции. Мышам вводили инъекции в возрасте 4–5 недель, а полную аутопсию проводили через 3 и 6 месяцев после инъекции. Исходя из среднего веса животных в группе, эти дозы равны: 8×10^{13} вг/кг, 2×10^{14} вг/кг и 6×10^{14} вг/кг. Инъекция равного объема раствора Рингера с лактатом служила отрицательным контролем. Инъекция равного объема раствора Рингера с лактатом мышам C57BL/6 служила в качестве положительного контроля. Безопасность определяли путем выполнения системных инъекций мышам ДТ в дозе $6,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы (обозначается как группа ДТ ТХ–средняя доза). Иммуофлуоресцентное окрашивание скелетных мышц передней большеберцовой мышцы (ТА), икроножной мышцы (GAS), квадрицепса (QUAD), ягодичной мышцы (GLUT), поясничной мышцы, трицепса (TRI), диафрагмы (DIA) и сердца проводили для определения восстановления дистрофина и для обеспечения эффективности вирусного вектора rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин.

[00143] Скелетные мышцы (ТА, QUAD, GLUT, TRI) были извлечены вместе с сердцем и диафрагмой для анализа. Органы были также удалены для токсикологических исследований и исследований биораспределения. Экспрессия трансгена микродистрофина оставалась высокой после 3–6 месяцев обработки. Это сопровождалось улучшением мышечной гистопатологии и улучшением функции без каких–либо побочных эффектов со стороны органов–мишеней.

Изменение дистрофического фенотипа у mdx–мышей, системно обработанных rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином

[00144] Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) скелетных мышц, диафрагмы и сердца было проведено для определения изменения и улучшения дистрофической патологии после системного введения инъекции rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин в суммарной дозе 2×10^{12} вг (низкая доза; n=1) 6×10^{12} вг суммарной дозы (средняя доза; n=8) и $1,2 \times 10^{13}$ вг суммарной дозы (высокая доза; n=8) для каждой дозы с эвтаназией через 12 недель после инъекции. Через 24 недели после инъекции оценивали вторую когорту животных, обработанную средней дозой (6×10^{12} вг суммарной дозы), для выявления и улучшения патологии дистрофина (n=5).

[00145] Иммуофлуоресцентное окрашивание для белка микродистрофина человека использовали для определения экспрессии трансгена микродистрофина в левой и правой сторонах шести скелетных мышц (ТА, GAS, QUAD, GLUT, psoas, TRI), а также диафрагмы и сердца у всех мышей с нулевым дистрофином, которым вводили инъекцию вектора микродистрофина. Это было выполнено, чтобы определить восстановление дистрофина и обеспечить эффективность вирусного вектора rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин при 2×10^{12} вг суммарной дозы (низкая доза; n=2), 6×10^{12} вг суммарной дозы (средняя доза; n=8) и $1,2 \times 10^{13}$ вг суммарной дозы (высокая доза; n=8) для каждой дозы с эвтаназией через 12 недель после инъекции.

[00146] Чтобы оценить эффективность экспрессии и трансдукции, изображения

всех трех дозирующих когорт и левой и правой сторон каждой мышцы были использованы для количественной оценки. Для каждой мышцы было получено четыре 20-кратных изображения, и для каждого изображения был определен процент положительных микродистрофиновых волокон, что привело к среднему проценту трансдукции для каждой мышцы. На Фиг. 14 и 15 представлены репрезентативные изображения обработанных мышцей средней дозой (6×10^{12} вг; 2×10^{14} вг/кг) и высокой дозой ($1,2 \times 10^{13}$ вг; 6×10^{14} вг/кг). Мыши с нулевым дистрофином, которым вводили инъекции раствора Рингера с лактатом, и которые соответствовали по возрасту, были включены как отрицательный контроль, а мыши дикого типа, которым вводили инъекции раствора Рингера с лактатом, были включены как положительный контроль. Для сердца показано $\geq 75\%$ у всех проанализированных животных.

[00147] В мышцах необработанных животных обнаружена обильная миопатия, в том числе жировая инфильтрация, центральная нуклеация, фиброз и очаговые области некроза. Окрашивание Н&Е на Фиг. 16 и Фиг. 17 иллюстрирует этот дистрофический фенотип у мышцей с нулевым дистрофином по сравнению с нормальными мышцами ДТ и улучшение мышечной патологии после обработки средней дозой (6×10^{12} вг; 2×10^{14} вг/кг) или высокой дозой ($1,2 \times 10^{13}$ вг; 6×10^{14} вг/кг). Количественная оценка гистологических параметров показала снижение центральной нуклеации (Фиг. 18) и нормализацию среднего диаметра волокна (Фиг. 16 и 17) у обработанных мышцей во всех мышцах в зависимости от дозы. Окрашивание сириусом красным продемонстрировало снижение отложения коллагена в диафрагме как в когорте со средней, так и с высокой дозами по сравнению с необработанными (mdx LR) когортами (Фиг. 19).

Функциональная оценка системной обработки
rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином

[00148] Чтобы определить, обеспечивает ли перенос гена микродистрофина функциональную силу поврежденной мышце, оценивали функциональные свойства как диафрагмы, так и передней большеберцовой мышцы у mdx-мышцей, мышцей ДТ и мышцей, которым вводили вектор, при трех уровнях дозы. Повышение дозы включало низкую дозу (8×10^{13} вг/кг), среднюю дозу (2×10^{14} вг/кг) и высокую дозу (6×10^{14} вг/кг). Функциональная оценка системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином с использованием оценки удельной силы *ex vivo* и снижения выходной силы после эксцентрических сокращений в ТА была использована через 24 недели после инъекции у животных, которым системно вводили инъекции rAAVrh74.МНСК7.микро дистрофина в дозе 6×10^{12} вг (средняя доза). Кроме того, удельная сила выхода в диафрагме была оценена у тех же животных.

[00149] Как показано на предыдущих Фигурах, гистопатология демонстрировала более нормализованную среду с улучшениями в центральной нуклеации, отложении коллагена и размере волокон при средних и высоких дозах. Доставка в хвостовую вену rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин привела к постепенному улучшению удельной силы выхода в диафрагме ($176,9$ мН/мм² в группе со средней дозой в сравнении с $227,78$

мН/мм² в группе с высокой дозой). Кроме того, долгосрочно обрабатываемая группа представляет мышей через 6 месяцев после инъекции (средняя доза 2×10^{14} вг/кг), и не было отклонений при долгосрочном выходной силе в диафрагме (176,9 мН/мм² в сравнении с 194,9 мН/мм²) (Фиг. 20).

[00150] Кроме того, функциональный дефицит в передней большеберцовой мышце у mdx-мышей наблюдался по сравнению с мышами ДТ. Mdx-мышцы продемонстрировали снижение выходной силы на 50% по сравнению с мышами ДТ (171,3 мН/мм² в сравнении с 291,65 мН/мм²) и большую потерю силы после эксцентрических сокращений (32% потери в mdx; 5% потери в ДТ). Системная доставка средней дозы rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин приводила к 65,5% дистрофина в передней большеберцовой мышце и восстановлению удельной выходной силы, которая улучшилась до 235,4 мН/мм² и защищала мышцу от повреждения при повторном эксцентрическом сокращении только при уменьшении силы на 25% (Фиг. 21). Группа ДТ средняя доза представляет обработанную группу дикого типа, чтобы продемонстрировать отсутствие токсичности и поддержание функциональных результатов, измеренных после обработки вектором.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00151] После первоначальной демонстрации биоактивности путем внутримышечной инъекции было достигнуто сопоставимое или повышенное восстановление микродистрофина при вазиккулярной доставке при трансдукции скелетных мышц, диафрагмы и сердца. Эффективность продемонстрировала изменение дистрофических признаков в зависимости от дозы путем уменьшения воспаления, уменьшения количества вырождающихся волокон и улучшения функционального восстановления за счет защиты от эксцентрических сокращений в передней большеберцовой мышце и диафрагме. Функциональные преимущества вектора включают поэтапное улучшение до уровней дикого типа при генерации силы в диафрагме и ТА.

Пример 9 Токсикология и биораспределение системной обработки rAAVrh74.МНСК7.микродистрофином

[00152] Органы и ткани mdx-мышей, которым системно вводили инъекцию rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, собирали для количественной ПЦР в реальном времени для выявления специфических последовательностей ДНК вектора. Белок, извлеченный из всех собранных органов и тканей, использовали для вестерн-блоттинга для обнаружения микродистрофина в органах, не являющихся мишенями.

[00153] В испытательный образец вводили три уровня дозы: низкую (2×10^{12} вг; 8×10^{13} вг/кг), среднюю (6×10^{12} вг; 8×10^{14} вг/кг) и высокую дозу ($1,2 \times 10^{13}$ вг; 6×10^{14} вг/кг) внутривенным путем в возрасте 4–5 недель. Чтобы оценить безопасность вектора, проводили окрашивание Н&Е на криосрезам мышечной ткани и всех основных органов, собранных у тех же самых групп мышей, которые были описаны ранее. Также были включены органы и мышцы мышей C57BL6 ДТ, которых системно обрабатывали вектором при средней дозе. Обработанные раствором Рингера с лактатом mdx-мышцы и

мышь ДТ также были включены для гистопатологического анализа. Эти срезы были официально проверены на токсичность сторонним сертифицированным ветеринарным патологоанатомом, и ни в одной из проб мышей не было обнаружено никаких побочных эффектов; результаты приведены ниже.

[00154] Детали группы и план исследования показаны в 4 ниже.

Таблица 5: План исследования безопасности rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

| Путь доставки | Штамм животных | Суммарная доза (вг) | Количество мышей | Конечная точка обработки | Номер отчета о патологии |
|---------------|----------------|----------------------|------------------|--------------------------|------------------------------|
| Внутривенно | mdx | 2×10^{12} | 5 | 3 мес | AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.1 |
| Внутривенно | mdx | 6×10^{12} | 7 | 3 мес | AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.1/001.2 |
| Внутривенно | mdx | 1.2×10^{13} | 8 | 3 мес | AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.2 |
| Внутривенно | C57BL/6 | 6×10^{12} | 5 | 3 мес | AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.2 |
| Внутривенно | mdx | 6×10^{12} | 5 | 6 мес | AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.3 |
| Внутривенно | mdx | — | 8 | 3 мес | AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.2 |
| Внутривенно | C57BL/6 | — | 6 | 3 мес | AAVrh74– |

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|------------------------|
| | | | | | mdx– МЫШЬ– 001.2 |
|--|--|--|--|--|------------------------|

Гистопатологический обзор трансдуцированной вектором ткани

[00155] В/в инъекция гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин не выявила каких-либо микроскопических изменений в миофибриллах каких-либо исследованных скелетных мышц. Кроме того, никаких повреждений, связанных с обработкой, не было обнаружено ни в одной из тканей, оцененных гистологически. Любые отмеченные изменения наблюдались как у обработанных, так и у контрольных мышечных и считались случайными результатами. Взятые вместе, эти данные указывают на то, что этот испытательный образец хорошо переносился испытуемыми. Кроме того, по сравнению с контрольными образцами от неопознанных по возрасту, необработанных mdx-мышей, введение гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин уменьшало атрофию миофибрила у обработанных mdx-мышей, показывая, таким образом, что испытательный образец может улучшить степень миопатии, связанной с дефицитом mdx.

[00156] В дополнение к обзору заболевших mdx-мышей, систематически обработанных вектором, гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин системно доставляли пяти мышам ДТ C57BL/6 в дозе, идентичной минимально эффективной дозе (MED), установленной в исследованиях выше для mdx-мышей, 6×10^{12} вг суммарной дозы (2×10^{14} вг/кг). Это позволило при исследовании внутривенной доставки испытуемого изделия у здоровых мышечных ДТ более точно определить, являются ли какие-либо побочные эффекты исключительно результатом лечения. В данном документе снова были собраны различные скелетные мышцы, включая диафрагму, а также сердце и пять других органов, и срезы Н&Е каждой ткани были формально рассмотрены независимым ветеринарным патологоанатомом.

Биораспределение генома вектора

[00157] Наличие специфических последовательностей ДНК испытательного образца исследовали с использованием количественного ПЦР-анализа в реальном времени (кПЦР). Анализ биораспределения проводили на образцах ткани, собранных у mdx-животных, получавших три дозы вектора согласно уровню дозы. Положительным сигналом было что-либо, равное или превышающее 100 копий одноцепочечных ДНК/мкг обнаруженной геномной ДНК. Ткани собирали при аутопсии и использовали наборы векторно-специфических праймерных зондов, специфичных для последовательностей промотора МНСК7. На Фиг. 22 и в Таблице 6 ниже представлены копии векторного генома, обнаруженные в каждом образце ткани у мышечных, которым инъецировали гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин.

Таблица 6: Количество копий генома вектора в органах и мышцах от mdx-мышечных, получавших три дозы вектора согласно уровню дозы. Значения приведены в вг/мкг геномной ДНК.

| Ткань | 2,00E+12 | 6,00E+12 | 1,20E+13 |
|-------------------------------|--|--|--|
| | (среднее количество копий вг/мкг) | (среднее количество копий вг/мкг) | (среднее количество копий вг/мкг) |
| Сердце | 2,84E+04 | 7,65E+05 | 5,35E+06 |
| Легкое | 3,14E+04 | 2,52E+05 | 1,49E+06 |
| Печень | 4,36E+04 | 1,11E+07 | 1,80E+07 |
| Почка | 1,96E+04 | 3,27E+05 | 1,06E+06 |
| Селезенка | 5,69E+04 | 5,27E+05 | 5,78E+05 |
| Гонада | 5,74E+04 | 3,68E+04 | 3,50E+05 |
| Диафрагма | 2,22E+04 | 3,55E+05 | 2,32E+06 |
| Поясничная мышца | 1,28E+05 | 1,60E+05 | 1,57E+06 |
| Трицепс | 1,60E+05 | 5,45E+05 | 2,50E+06 |
| Квадрицепс | 2,66E+06 | 6,57E+05 | 2,29E+06 |
| Икроножная мышца | 1,69E+05 | 5,80E+05 | 2,93E+06 |
| Передняя большеберцовая мышца | 5,86E+05 | 1,25E+05 | 1,32E+06 |

[00158] Транскрипт гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин был обнаружен в разных уровнях во всех собранных тканях. Как и ожидалось, самые высокие уровни были отмечены в скелетных мышцах и сердце. Самые низкие уровни были обнаружены в гонаде, легких, почках и селезенке. Эти данные указывают на то, что испытательный образец эффективно доставлялся во все исследуемые ткани мышей, которым вводили вектор.

[00159] Как показывают результаты кПЦР, приведенные выше, внутривенная доставка гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин привела к распределению транскрипта вектора в разных уровнях в большинстве тканей, причем самые высокие уровни наблюдаются в печени, сердце и мышце квадрицепса (средняя доза) и печени, сердце и икроножной мышце (высокая доза). Следовательно, целью этой части исследования было определение экспрессии белка трансгена микродистрофина человека в указанных тканях для обеспечения функциональности специфического для мышц промотора МНСК7. Вестерн-блоттинг использовали для выявления экспрессии микродистрофина в образцах ткани.

[00160] Экспрессию белка и биораспределение вектора также оценивали с использованием кПЦР и вестерн-блоттинга (Фиг. 23), и эти данные указывают на нормальные уровни вектора в сторонних органах и минимальное обнаружение белка микродистрофина в печени, обработанной высокой дозой. Эти результаты коррелировали с отсутствием токсичности в печени, как определено патологоанатомом. Кроме того,

химические составы сыворотки были проанализированы независимыми CRO (Charles River Laboratories), которые указывают нормальные значения во всех проанализированных химических составах. Было три аномальных значения в ферменте печени AST, 2 из которых были продемонстрированы в группе mdx-LR и 1 из которых в группе средней дозы (Фиг. 23). Подгруппа животных подверглась анализу креатинкиназы (СК), однако образцы были проанализированы до и после физиологической оценки. Анализ сыворотки подтверждает отсутствие токсичности после доставки испытательного образца.

[00161] Экспрессия белка микродистрофина наблюдалась в разных количествах во всех образцах скелетных мышц, а также в образцах сердца (Фиг. 24). Тем не менее, было обнаружено минимальное количество белка в печени в когортах с высокой дозой. Считается, что это доброкачественный результат, и, возможно, присутствие в печени обусловлено экспрессией в гладких мышцах печени. Важно отметить, что не было никаких неблагоприятных гистопатологических эффектов в печени, отмеченных в отчете независимого патологонатома.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00162] Гистопатологический обзор показал, что в когорте mdx-LR обнаружена широко распространенная миопатия, затрагивающая все семь оцениваемых скелетных мышц, а также стенку правого желудочка сердца. Основные результаты гистопатологического обзора включали выраженную и обильную атрофию миофибрилл (30–75% нормального размера миофибрилл), минимальное или легкое воспаление мононуклеарных клеток, увеличение интерстициального пространства и увеличение цитоплазматических минеральных отложений. Диафрагма демонстрирует наиболее заметные изменения в инфильтрации мононуклеарных клеток и атрофии миофибрилл. Сердце демонстрирует несколько небольших очагов минимального накопления мононуклеарных клеток в миокарде желудочков. Когорты, которым вводили вектор, имели значительно уменьшенную миопатию во всех тканях скелетных мышц и сердце. Снижение гистопатологических результатов происходило в зависимости от дозы, в то время как группа с высокой дозой имела значительно меньшую дегенерацию и воспаление. Не было никаких побочных эффектов из-за обработки вектором rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, как было задокументировано в обработанной когорте ДТ, и в mdx-когорте, которой вводили дозу вектора. Были случайные находки в печени и легких у mdx-мышей и мышей ДТ независимо от обработки, при которой у мышей наблюдалась легкая вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов. Следовательно, испытательный образец был безопасным, эффективным, а защитный эффект зависел от дозы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность специфического для мышц регуляторного элемента и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок микродистрофина.

2. Рекомбинантный вектор AAV по п. 1, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок микродистрофин, содержит

а) нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 и кодирует функциональный белок микродистрофин, или

б) нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1.

3. Рекомбинантный вектор AAV по п. 1 или 2, отличающийся тем, что специфический для мышц регуляторный элемент является элементом гена скелетного актина человека, элементом гена сердечного актина, миоцит–специфическим энхансер–связывающим фактором (MEF), мышечной креатинкиназой (MCK), усеченной MCK (tMCK), тяжелой цепью миозина (MHC), гибридом энхансера тяжелой цепи α -миозина/энхансера–промотора MCK (MHCK7), C5–12, элементом энхансера креатинкиназы мышцы, элементом гена быстро сокращающегося тропонина C скелетных мышц, элементом гена медленно сокращающегося тропонина C сердечных мышц, элементом гена медленно сокращающегося тропонина I, индуцируемым при гипоксии ядерным фактором, стероид–индуцируемым элементом или глюкокортикоид–отвечающим элементом (GRE).

4. Рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–3, отличающийся тем, что специфический для мышц регуляторный элемент является мышечной креатинкиназой (MCK) или гибридом энхансера тяжелой цепи α -миозина/энхансера–промотора MCK (MHCK7).

5. Рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–4, отличающийся тем, что специфический для мышц регуляторный элемент является мышечной креатинкиназой (MCK), содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, или гибридом энхансера тяжелой цепи α -миозина/энхансера–промотора MCK (MHCK7), содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2.

6. Рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–5, содержащий нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 и 2.

7. Рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–6, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

8. Рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и последовательность промотора MHCK7 SEQ ID NO: 2.

9. Рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность конструкции pAAV.MHCK7.микродистрофин SEQ ID NO: 3.

10. Рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–5, содержащий

нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 и 4.

11. Рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–5 или 10, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5.

12. Рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–11, отличающийся тем, что вектор rAAV представляет собой серотип AAVrh.74, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

13. Рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–12, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность специфического для мышц регуляторного элемента функционально связана с нуклеотидной последовательностью микродистрофина.

14. Композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–13 и фармацевтически приемлемый носитель.

15. Способ увеличения мышечной силы или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV по любому из пп. 1–13 или композиции по п. 14.

16. Способ уменьшения или профилактики фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV по любому из пп. 1–13 или композиции по п. 14.

17. Способ лечения мышечной дистрофии, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV по любому из пп. 1–13 или композиции по п. 14.

18. Способ лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2.

19. Способ лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность конструкции rAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3.

20. Способ по любому из пп. 15–19, в котором мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна.

21. Способ по любому из пп. 15–19, в котором рекомбинантный вектор AAV или композицию вводят внутримышечной инъекцией или внутривенной инъекцией.

22. Способ по любому из пп. 15–19, в котором рекомбинантный вектор AAV или композицию вводят системно.

23. Способ по п. 22, в котором рекомбинантный вектор AAV или композицию вводят парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации.

24. Композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–13 для увеличения мышечной силы или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

25. Композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAV по любому из пп. 1–13

для лечения мышечной дистрофии.

26. Композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2 для лечения мышечной дистрофии.

27. Композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность конструкции рAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3, для лечения мышечной дистрофии.

28. Композиция по любому из пп. 24–27, в которой мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна.

29. Композиция по любому из пп. 24–28, составленная для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

30. Способ по любому из пп. 24–28, в котором рекомбинантный вектор AAV или композицию вводят системно.

31. Способ по п. 30, в котором рекомбинантный вектор AAV или композицию вводят парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации.

32. Применение рекомбинантного вектора AAV по любому из пп. 1–13 или композиции по п. 14 для приготовления лекарственного средства для увеличения мышечной силы или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

33. Применение рекомбинантного вектора AAV по любому из пп. 1–13 или композиции по п. 14 для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

34. Применение рекомбинантного вектора AAV по любому из пп. 1–13 или композиции по п. 14 для приготовления лекарственного средства для уменьшения или профилактики фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

35. Применение рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2, для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

36. Применение рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность конструкции рAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3, для лечения мышечной дистрофии.

37. Применение по любому из пп. 32–36, отличающееся тем, что мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна.

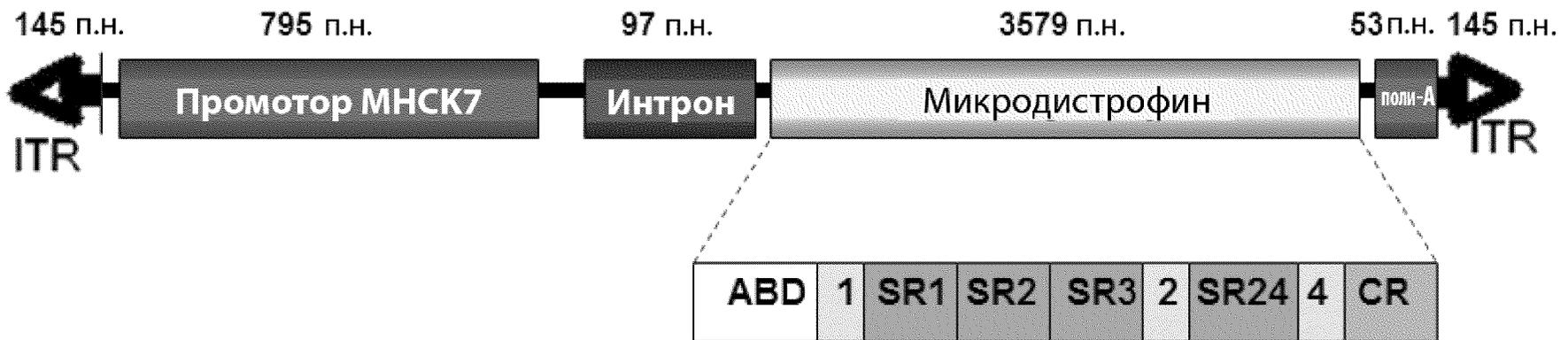
38. Применение по любому из пп. 32–37, отличающееся тем, что лекарственное средство составлено для внутримышечного или внутривенного введения.

39. Применение по любому из пп. 32–37, отличающееся тем, что лекарственное средство составлено для системной доставки.

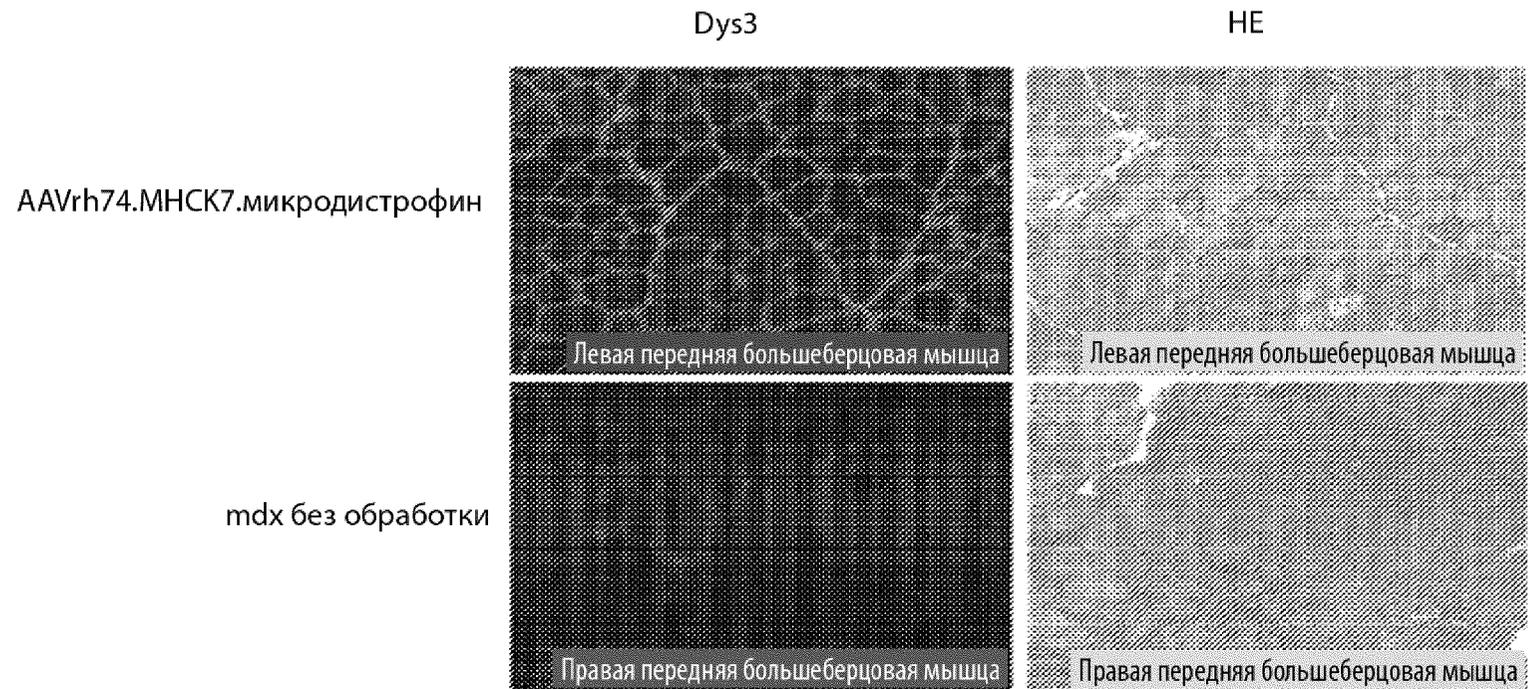
40. Применение по п. 39, отличающееся тем, что лекарственное средство составлено для парентерального введения путем инъекции, инфузии или имплантации.

По доверенности

Фиг. 1

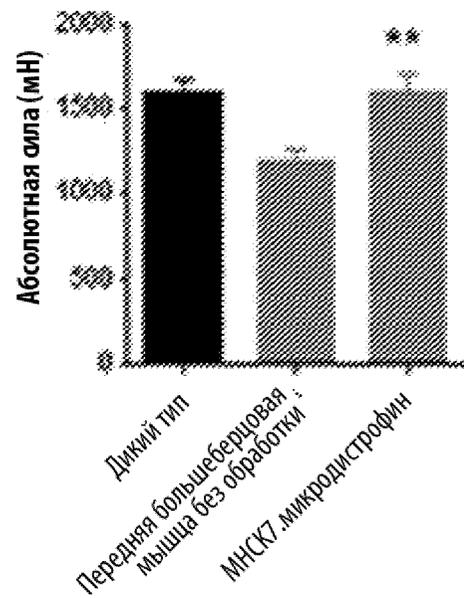


Фиг. 2



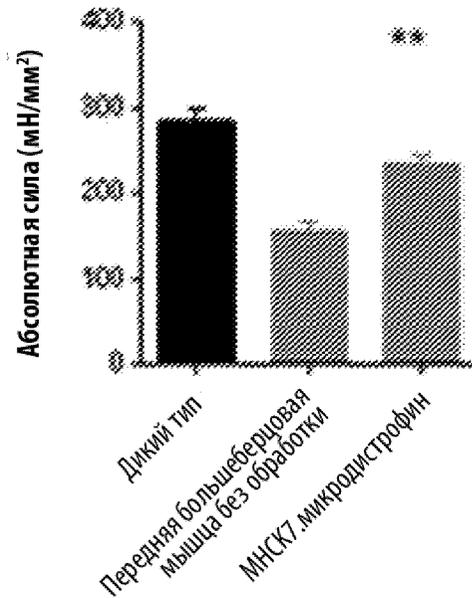
Фиг. 3А

Абсолютная сила



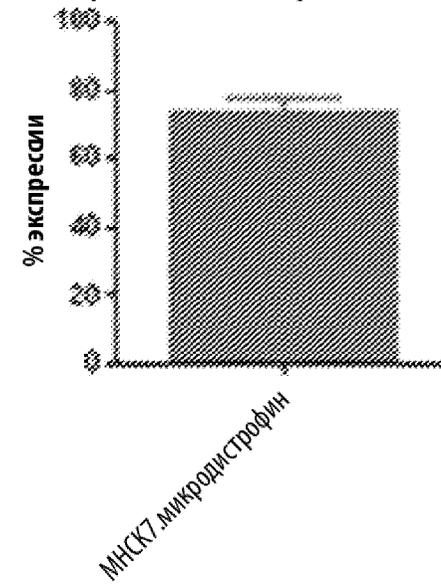
Фиг. 3В

Удельная сила

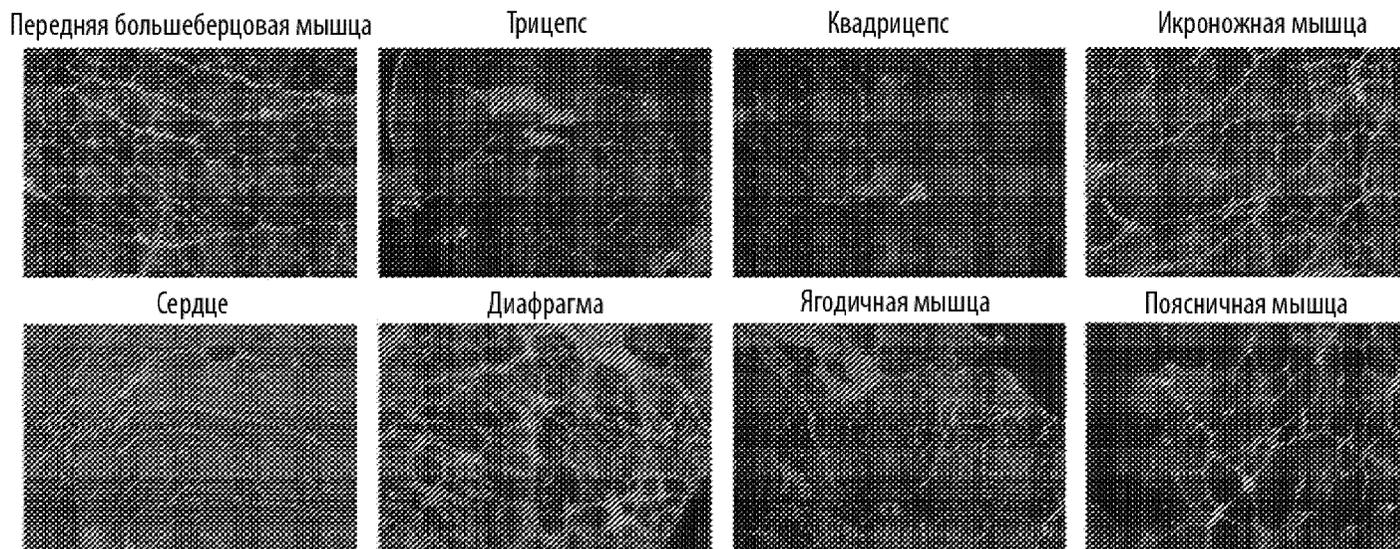


Фиг. 3С

Процент экспрессии - Левая передняя большеберцовая мышца

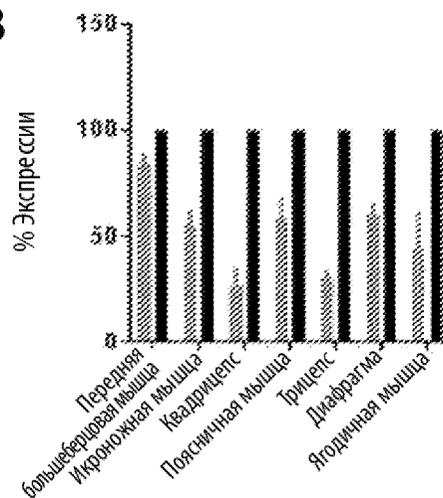


Фиг. 4А



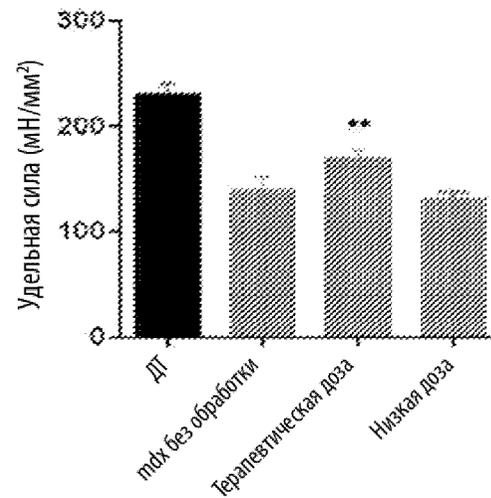
ИФ Экспрессия

Фиг. 4В

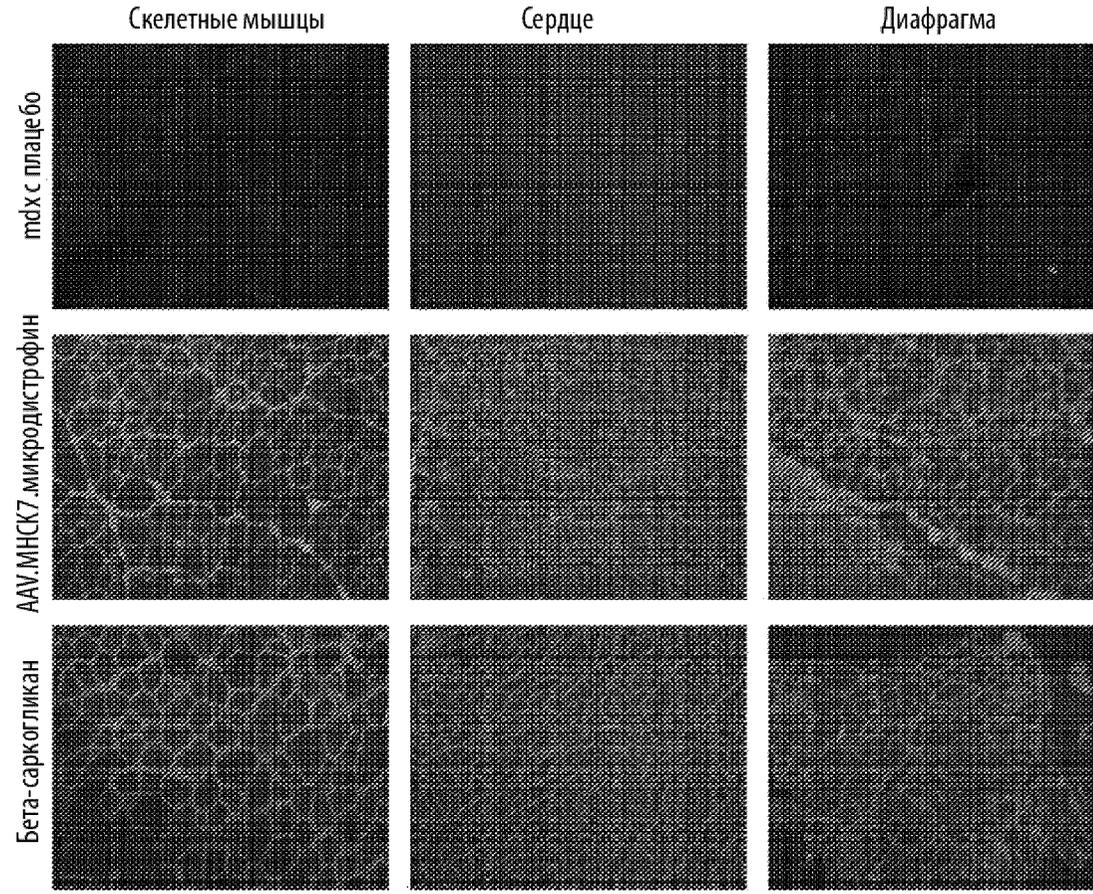


Фиг. 4С

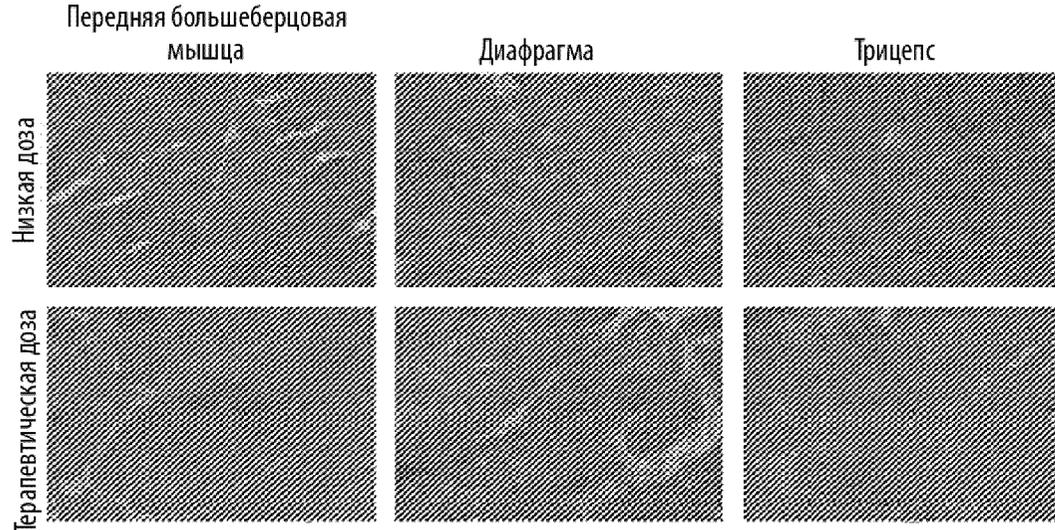
Удельная сила



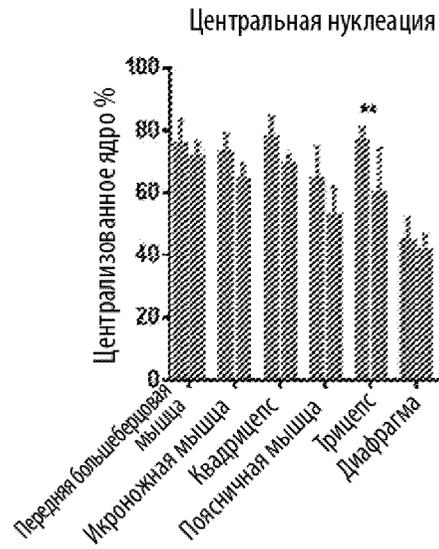
Фиг. 5



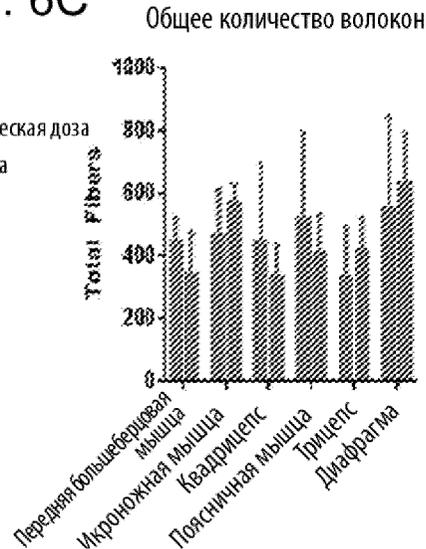
Фиг. 6А



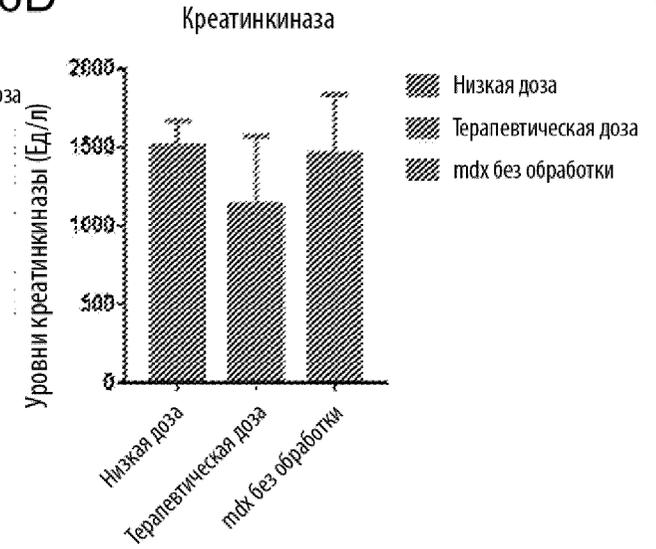
Фиг. 6В



Фиг. 6С



Фиг. 6D

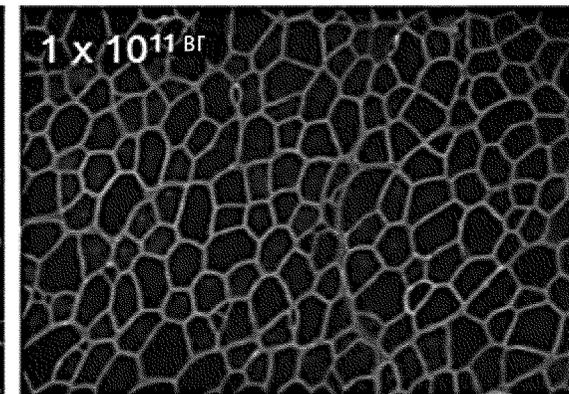
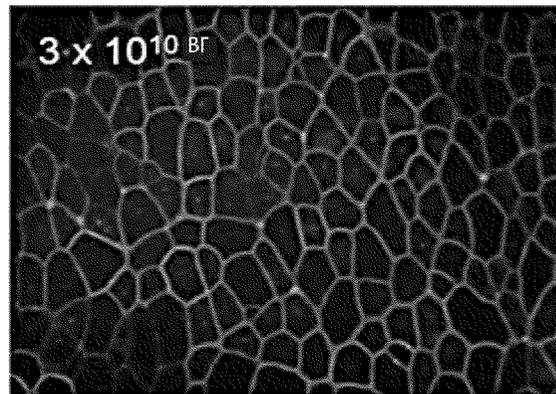
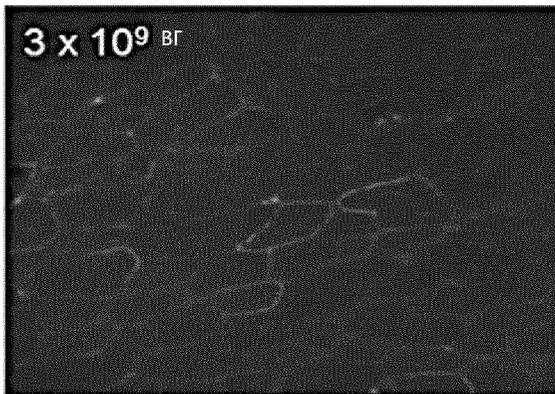
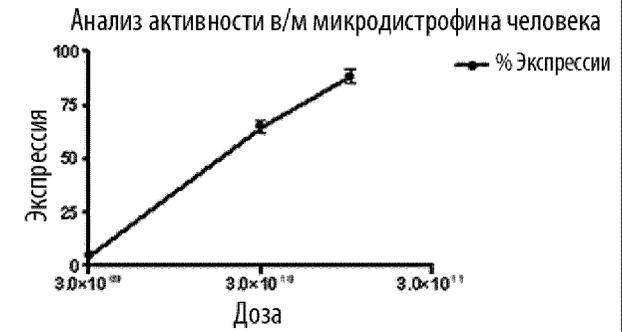


Фиг. 7

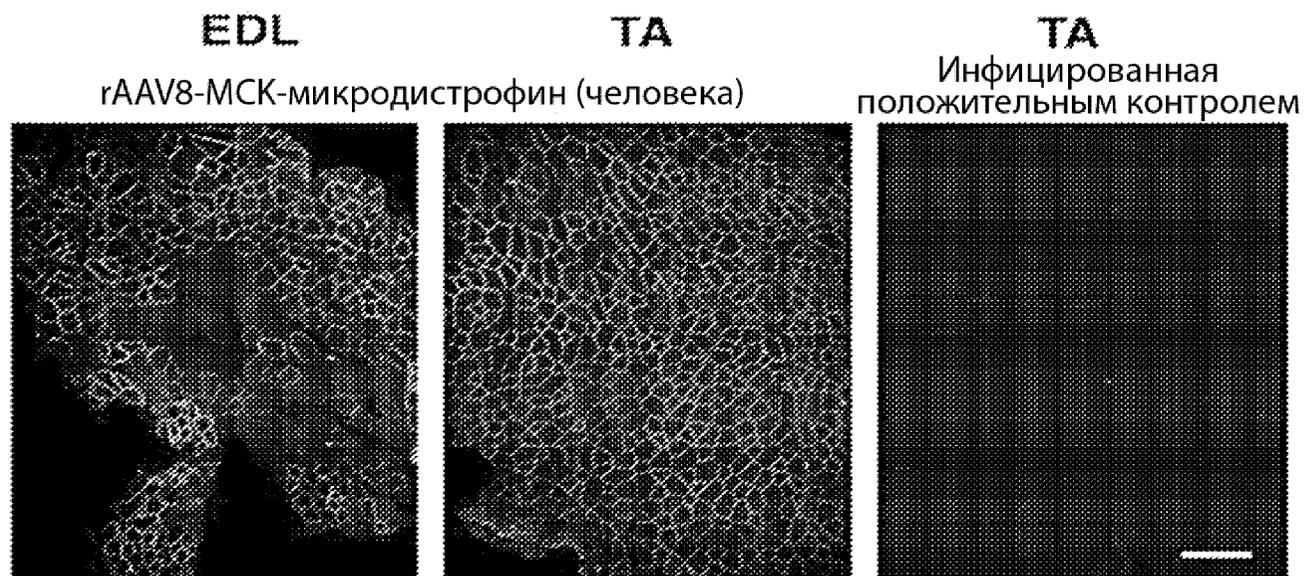


Фиг. 8

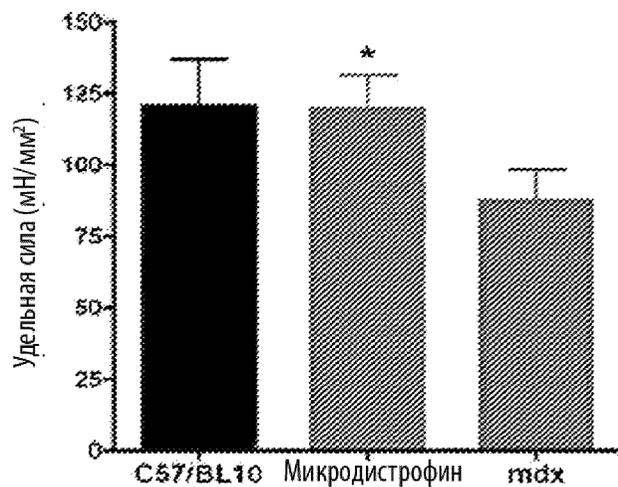
| Когорта | Идентификатор животных # | Мышечный анализ | Положительные волокна/ Общее количество волокон | % Положительных | Средний % трансдуцированных |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|---|-----------------|-----------------------------|
| AAV8.МСК.Микро человека 3e9 | 203 | Левая передняя большеберцовая мышца | 21/404 | 5.2 | 4.6% |
| | 204 | Левая передняя большеберцовая мышца | 22/411 | 5.4 | |
| | 205 | Левая передняя большеберцовая мышца | 12/394 | 3.1 | |
| 3e10 | 206 | Левая передняя большеберцовая мышца | 299/460 | 65.0 | 65.0% |
| | 207 | Левая передняя большеберцовая мышца | 282/403 | 69.6 | |
| | 208 | Левая передняя большеберцовая мышца | 213/361 | 60.0 | |
| 1e11 | 210 | Левая передняя большеберцовая мышца | 392/481 | 81.5 | 89.0% |
| | 211 | Левая передняя большеберцовая мышца | 434/473 | 91.6 | |
| | 212 | Левая передняя большеберцовая мышца | 507/545 | 93.1 | |



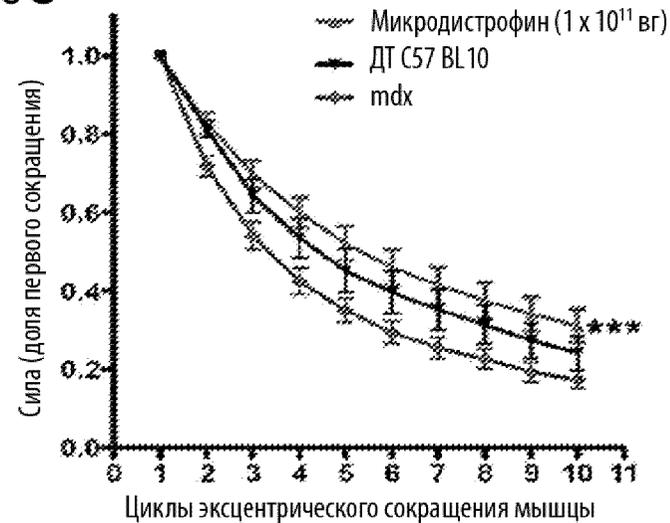
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9С



Фиг. 10

SEQ ID NO: 3

rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

Основные признаки:Промотор МНСК7Химерная интронная последовательностьКодон-оптимизированная последовательность микродистрофина человека**Хвост поли-А**Устойчивость к ампициллинуКаркас плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCGCGCTCGCTC
 GCTCACTGAGGCCGCCGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGCCTCAGTGAG
 CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCATCACTAGGGGTTCTTGATGTAATGATTAA
 CCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGCCATGTCTAGAgtttaacaagcttgcctgtctaaagctagacccttcagatta
aaaataactgaggttaagggcctgggttaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctctctatctgcccaicggccctttggggagg
aggaatgtgcccaaggactaaaaaaaggccatggagccagaggggaggggcaacagaccttcatgggcaaaccttggggccc
tgctcttagcatgccccactacgggtctaggctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgctggttataatta
accagacatgtggctgcccccccccccccaacacctgctgctctaaaaataaccctgtccctgtggaaccctgcatgcaagat
cttgaacaaggctgtggggactgagggcaggctgtaacaggcttggggccagggttatacctgctgggactcccaagatt
actgttccatgttcccggaaggccagctgtccccgccagctagactcagcacttagtttaggaaccagttagcaagttagccct
tggggcagccatacaaggccatggggctgggcaagctgcacgcctgggtccgggtgggcacggtgccgggcaacgagctgaa
agctcatctgctctcaggggccccctcctggggacagccccctcggctagctcacaccctgtaggctcctctatataaccaggggca
caggggctgccccctattctaccaccacctccacagcacagacagacactcaggagccagccagcggcgcgccAGGTAAGTTT
 AGTCTTTTGTCTTTTATTTAGGTCCTCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGT
 GGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTAC
 CCGCGGCCGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAG
 AAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGAAGCAGCACATCGAGAAT
 CTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGACTGACTGGCCAGAAG
 CTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGACGCCCTGAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGT
 GCTGCAGAACAACAACGTGGATCTGGTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCCACAA
 ACTGACACTGGGCCTGATCTGGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAATC
 ATGGCCGGGCTGCAGCAGACCAATCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGC
 AACTATCCCAGGTGAACGTGATTAACCTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGCCCTGAATGCTC
 TGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTGACTGGAATAGCGTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACA
 GCGCCTGGAACATGCCTCAATATCGCTCGGTACCAGCTGGGGATCGAAAACTGCTGGACCCAGA
 GGATGTGGACACTACATACCCAGATAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGC
 TGCCACAGCAGGTGTCTATTGAAGCCATTGAGGAGGTGGAAATGCTGCCCGCCCCCCCCAAAGTGAC
 TAAAGAGGAGCATTTTCACTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCCTGGCT
 CAGGGATATGAGCGCACCAAGTAGTCCAAAACACGGTCAAGTCTACGCTTATACCCAGGCTGCCT
 ACGTGACAACACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTCCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAA
 GAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGA
 GGTGCTGAGCTGGCTGCTGAGTGTGAAGACACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGT

GGAAGTGGTGAAGGATCAGTTCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGGG
GCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAACTGATCGGCACCGGAACTGAGTGAGGACGA
GGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTA
GTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTCTGATGGACCTGCAGAACCAGAACTGAAAGAGC
TGAACGACTGGCTGACAAAGACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCC
GACCTGGAGGATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGA
GCAGGTGCGGGTGAACCTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGC
CACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGGGCCAACATTTGCCGGTGA
CCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAG
TGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTA
AGGATCAGAACGAAATGCTGTCTAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAA
AGAAGCAGAGCATGGGCAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCTGAAGAACAAGA
GCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGTCTGGGACAACCTGGTGCAGA
AACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGAC
AACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAACCCGCGAACAGATCCTGGTGAACATGCCAGGA
AGAGCTGCCACCTCCACCTCCCCAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGC
CACTGACGAACTGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGTCTTGGCAGCCTGTGGG
CGATCTGCTGATTGATCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGGCGAAATTGCT
CCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAG
CTGAGCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCT
GTGGAAGACCGGGTGCAGGAGCTGCATGAGGCCATCGCGACTTCGACCAGCCAGCCAGCACTTT
CTGAGCACATCCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCAACAAGGTGCCCTACTATATTA
ATCACGAGACCCAGACCCTTGTGGGACCATCCCAAGATGACAGAAGTGTACCAGTCCCTGGCCGA
TCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGTTACAGAACCCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCT
GTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAAC
GATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGG
AGCACAACAACCTGGTGAACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGA
TGACACTGGGCGCACCGGCCGGATCAGAGTGTGAGTTTTAAACTGGGATTATCTCCTGTGTAAG
GCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACC
AGCGCCGCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTA
GTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCAGCTGTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGA
AATCGAGGCTGCTCTGTTCTGGATTGGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTG
CTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGT
CCCATTATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTCTTT
TCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGAATATTGCACCCCAACTACAT
CTGGCGAAGATGTGCGGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGC
CAAGCACCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGA
TACAATGTGAGCGGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTG
CTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGA
TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCG
ACGCCCCGGCTTTGCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTCCAGACG
ATTGAGCGTCAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGTAATATTGT
TCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTACTAATC
AAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCCTCACTGA

TTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTAAATCGGCCTCCTGTT
TAGCTCCCCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGC
GCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC
CAGCGCCCTAGCGCCCCTCCTTTTCGCTTTCTCCCTTCTTCGCCCAGGTTGCGCCGGCTTTCCCGT
CAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGATTTACGGCACCTCGACCCAAAAA
ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTC
TATCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAA
AAATTTAACCGGAATTTAACAAAATATAACGTTTACAATTTAAATTTGCTTATACAATCTTCTGT
TTTTGGGGCTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCA
TCGATTCTTTGTTTGTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAA
AGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTGACTG
TCTCCGGCCTTTCTACCCGTTTGAATCTTACCTACACACTACTCAGGCATTGCATTTAAAAATATG
AGGGTTCTAAAAATTTTATCCTTGCCTTGAATAAAGGCTTCTCCGCAAAAGTATTACAGGGTCAT
AATGTTTTGGTACAACCGATTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTAATTTTGCTAATCTTTGC
CTTGCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAAGTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTACGCATCTGTGCGG
TATTTACACCCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCC
GACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACA
AGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCGAGA
CGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTCTTAGACGTC
AGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATA
TGATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
TATCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCCACCA
GAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTG
GATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTT
TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGC
ATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCAT
GACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAACACTGCGGCCAACTTACTCTG
ACAAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGTTTTTTCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCC
TTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTG
TAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATTAACCTGCGGAACACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAA
TTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT
GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC
AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTAC
TCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT
GATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAA
GATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCAC
CGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTC
AGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTCAAGAAC
CTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG
TCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACG
GGGGGTTGCTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCAGCTACCCGAACCTGAGATACCTACAGCGT
GAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGT

CGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGG
AAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTT
CCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGGGTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCG
CAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

Фиг. 11

SEQ ID NO: 5

rAAVrh74.МСК.микродистрофин

Основные признаки:Промотор МСКХимерная интронная последовательностьКодон-оптимизированная последовательность микродистрофина человека**Хвост поли-А**Устойчивость к ампициллинуКаркас плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCGCGCTCGCTC
 GCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCGGCCTCAGTGAG
 CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAA
 CCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGCCATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAG
GAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCCC
CCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCCCACCCGGTGCCTGGGTCTTAGGCTCTGTACACCATGG
AGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGGCTGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTA
ACAGGCTTGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGG
CGAAGGGCCAGCTGTCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAAGTGAAGTCAAGC
CCTTGGGGCAGCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCA
CGGTGCCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCTCCCTGGGGACAGCCCTCC
TGGCTAGTACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCCGGGTACCA
 CCACCTCCACAGCACAGACAGACTCAGGAGCCAGCCAGCCAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTT
 ATTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCITTA
 CTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCCGAATTGTACCCGCGGCCGCCACCA
TGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGAAGAAGACTTTTACC
AAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGC
AGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAG
GGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGAACAACGTGAACAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAAC
GTGGATCTGGTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAACTGACACTGGGCCTG
ATCTGGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGCTGCAG
CAGACCAATTCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGCAACTATCCCAGGTGA
ACGTGATTAACCTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAG
GCCTGATCTGTTGACTGGAATAGCGTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCC

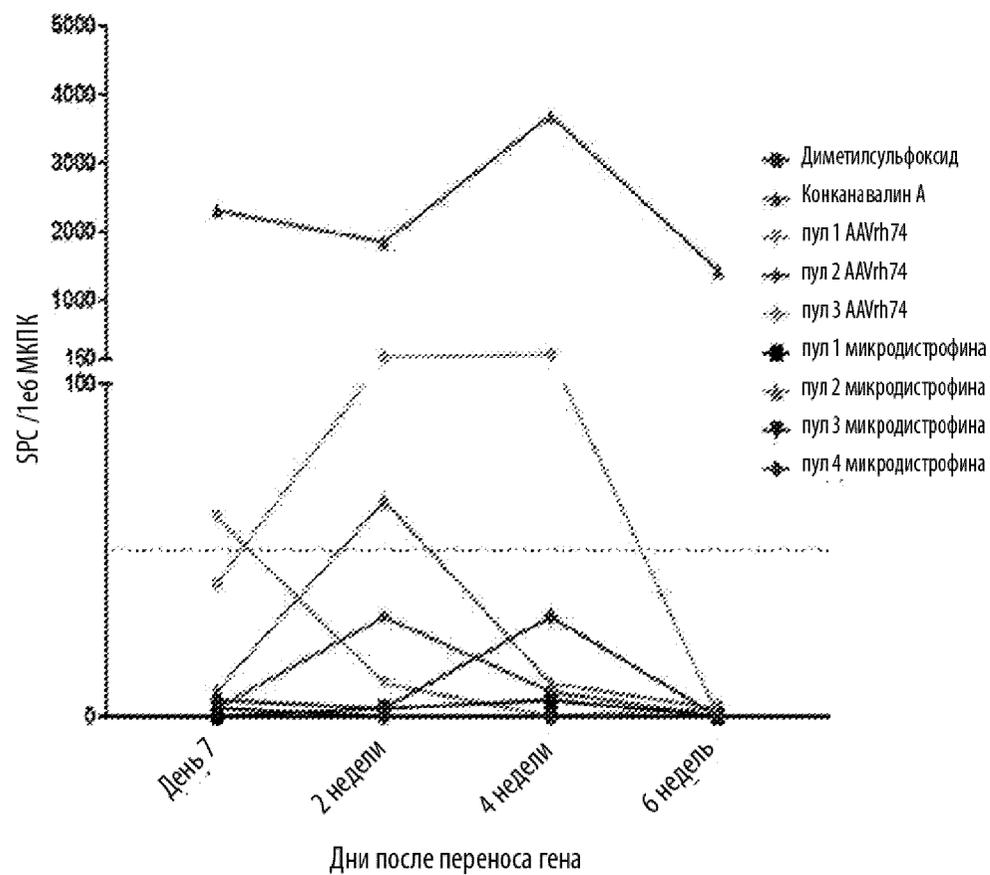
TTCAATATCGCTCGGTACCAGCTGGGGATCGAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACAT
ACCCAGATAAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGTCT
ATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCGCCCCCCTAAAGTGACTAAAGAGGAGCATTTTC
AGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCAC
CAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCTACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGAC
CCTACTAGATCCCCCTTTCCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCT
GATGGAAAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGC
TGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGTGAAGGATC
AGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGGGGCGCGTGGGCAATATCC
TGCAGCTGGGCTCTAACTGATCGGCACCGGGAAACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGACG
GAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCC
AACCTGCACCGGGTCTGATGGACCTGCAGAACCAGAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACA
AAGACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTGAA
GAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGTGCGGGTGAAT
CCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGG
AACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGGGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTG
CTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGTGG
CTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATG
CTGTCTAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCAGAGCATGGGC
AAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCCTGAAGAACAAGAGCGTGACCCAGAAGACA
GAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGACAACCTGGTGCAGAACTGGAGAAAAGTACA
GCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCG
TGACCACCGTGACAACCCGCGAACAGATCCTGGTGAACATGCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACC
TCCCAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAACTGGACC
TGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGCGATCTGCTGATTGATT
CCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGGGCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACG
TGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATAACAATCT
GAGCACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGTGTCTGCAGGTGGCTGTGGAAGACCGGGTGC
GGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGCA
GGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACC
ACTTGTGGGACCATCCAAGATGACAGAAGTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGT
TTAGCGTTACAGAACCGCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTC
CCTGTCCGCCGCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATC
CTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAACAACCTGGTGA

ACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACTGGGCGCACCGG
CCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAGGCCACCTGGAGGACAAG
TACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACCAGCGCCGCTGGGACTGC
TGCTGCATGATAGTATCCAGATTCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACAT
CGAACCCAGCGTGCGCAGCTGTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCC
TGGATTGGATGCGCCTGGAACACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCG
CCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTATCGGCTTCGCTA
CAGGAGTCTGAAACATTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTCCGGAAGAGTGGCCAAA
GGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGAATATTGCACCCCACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCG
ATTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCGCATGGG
GTATCTGCCAGTGCAGACAGTGTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGTGAGCGGCCGG
AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTCTAGAGCATGGCTACGTA
GATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT
CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCG
GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGC
CCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTCCAGACGATTGAGCGTCAAATGTAG
GTATTTCCATGAGCGTTTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAG
GCCGATAGTTTGAGTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTAATAAAGAAGTATTGCGACAAC
GGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGG
ATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTAATCGGCCTCCTGTTAGCTCCCGCTCTGATTCTA
ACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAA
GCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTC
CTTCGCTTTCTCCCTTCTCGCCACGTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCT
CCCTTAGGGTCCGATTTAGTGATTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTT
CACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAAT
AGTGGACTCTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGG
ATTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTTTAA
CAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATAACAATCTTCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTA
TCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCATCGATTCTCTGTTTGCTCC
AGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATG
AATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCC
GTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTCTAAAAATTTTTA
TCCTTGC GTTGAATAAAGGCTTCTCCCGAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCG
ATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTATTGCTTAATTTGCTAATTTGCTTCTTGCCTGCCTGTATGATTTATT

GGATGTTGGAAGTTCCTGATGCGGTATTTCTCCTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATG
GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGG
GAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGAT
ACGCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGG
GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC
AATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC
GCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTA
AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG
ATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAAGACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGG
CGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT
GACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACC
GAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACG
TTGCGCAAATAAATACTGGCGAACTACTTACTAGCTTCCCGCAACAATAATAGACTGGATGGA
GGCGGATAAAGTTGACGAGCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAA
TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGAT
TGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAA
AATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT
GAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTT
TGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAC
CAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCACCGCGTACA
TACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTT
GGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC
AGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCG
CCACGCTTCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG
CGCAGGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTATAGTCTGTCCGGTTTTGCCACCTCT
GACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACG
CGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCCACATGTTCTTCTGCTTATCCCTGA
TTCTGTGGATAACCGTATTACCGGGTTTGAAGTGAAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAG
CGCAGCGAGTCAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

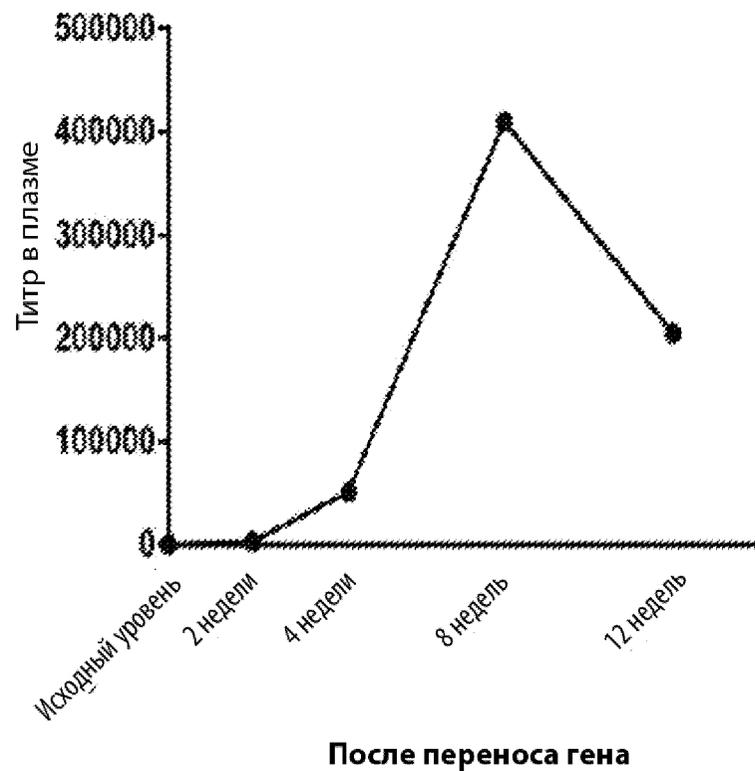
Фиг. 12А

ОБЩИЙ 13-176

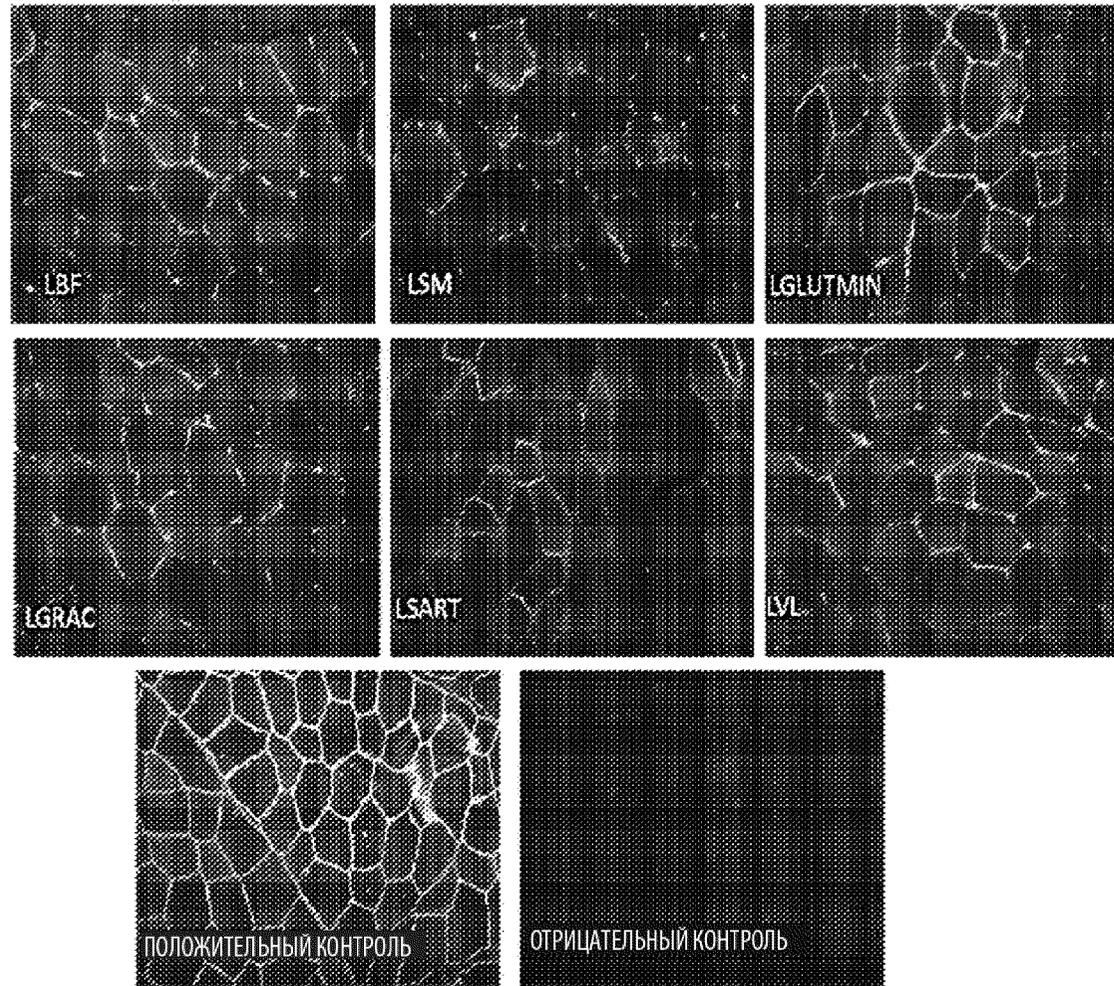


Фиг. 12В

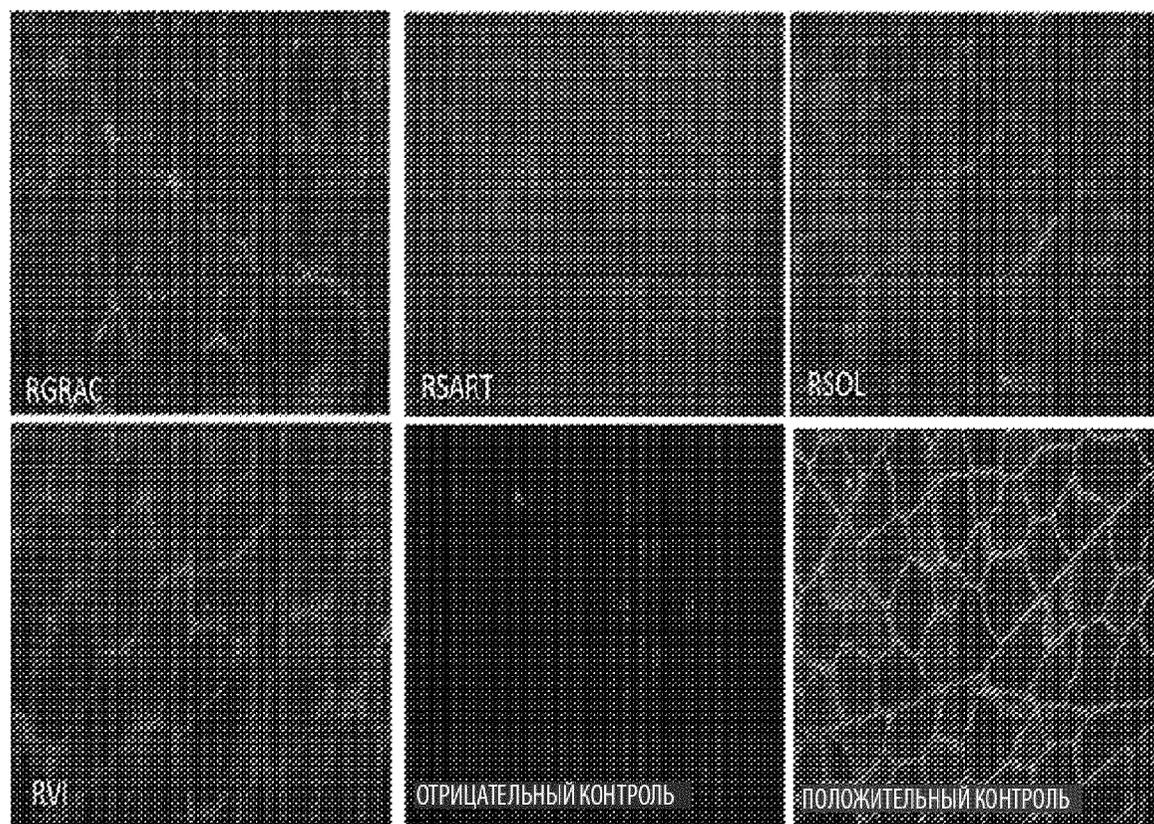
В-клеточный ответ 13-176



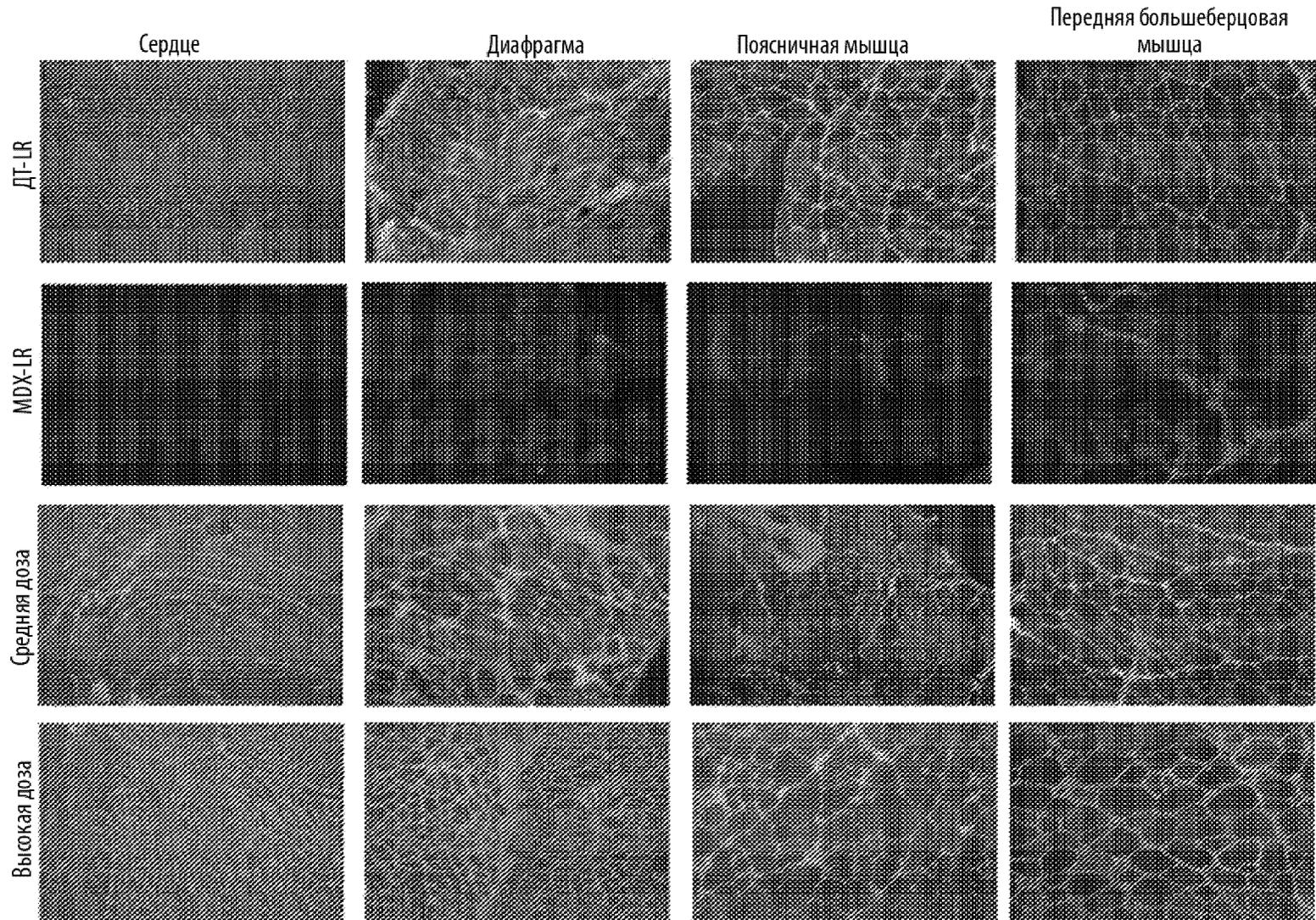
Фиг. 13А



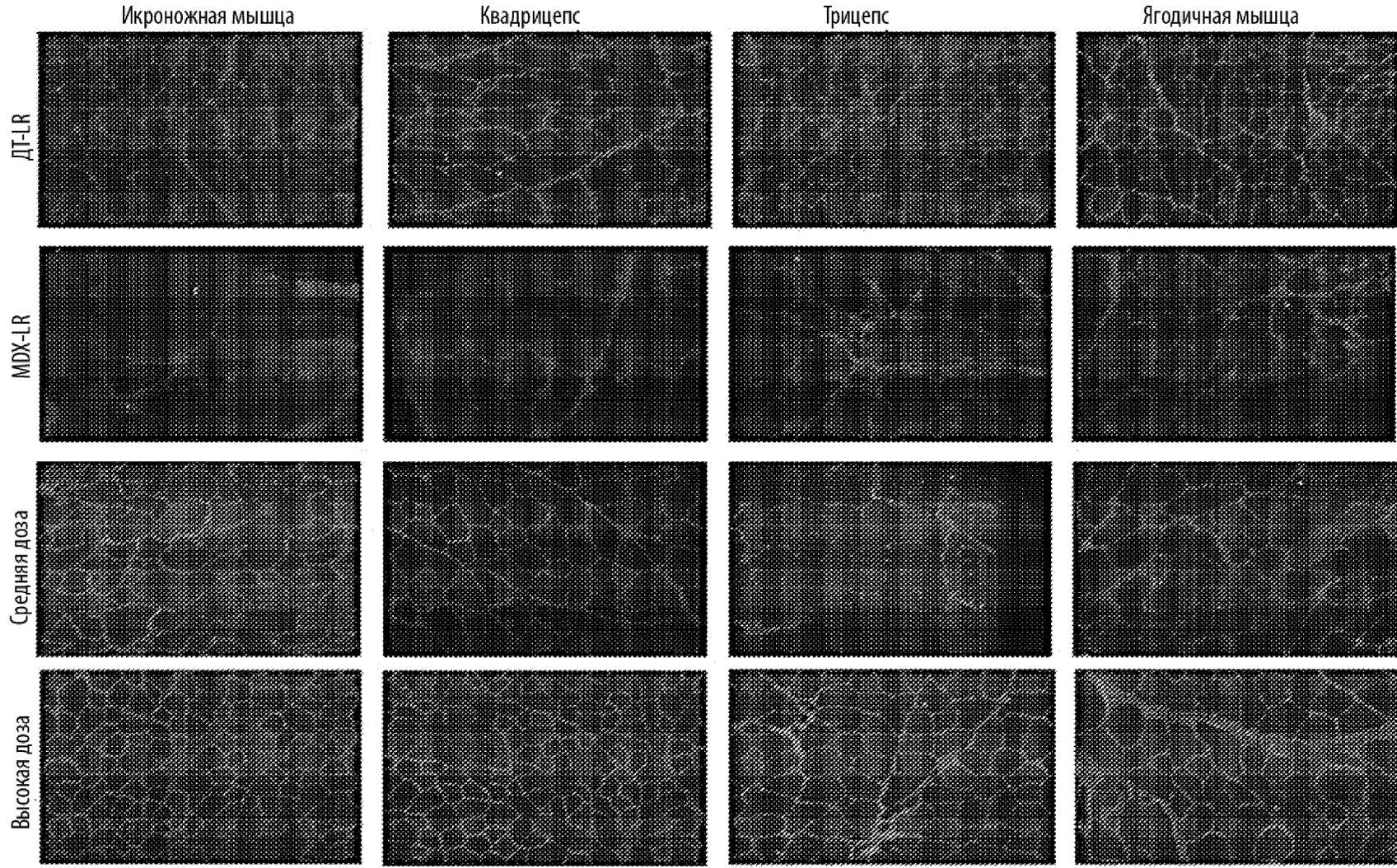
Фиг. 13В



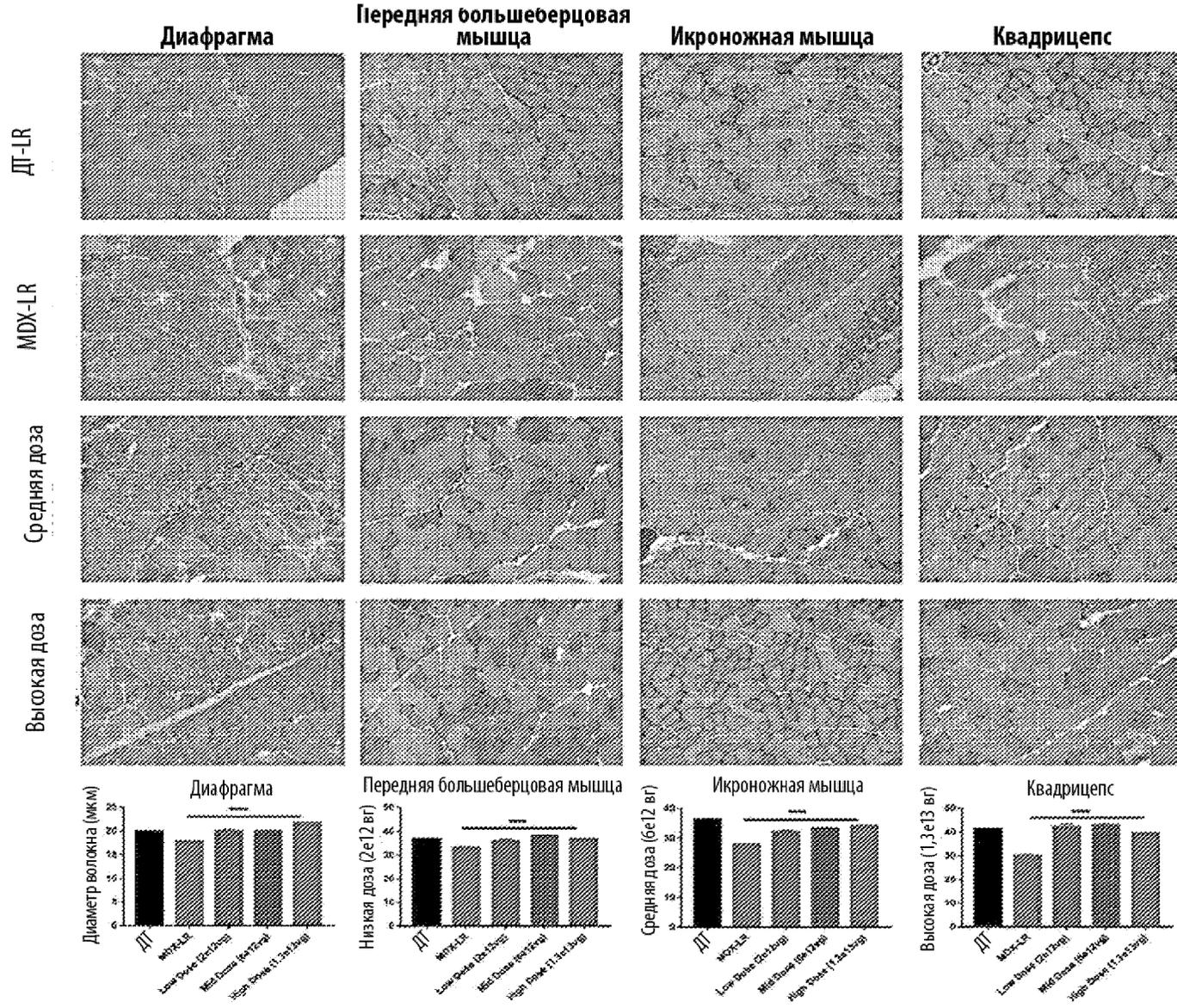
Фиг. 14

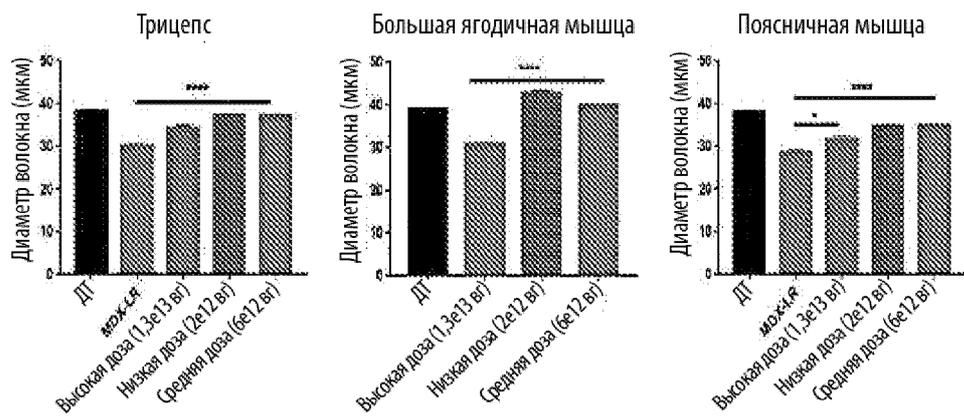
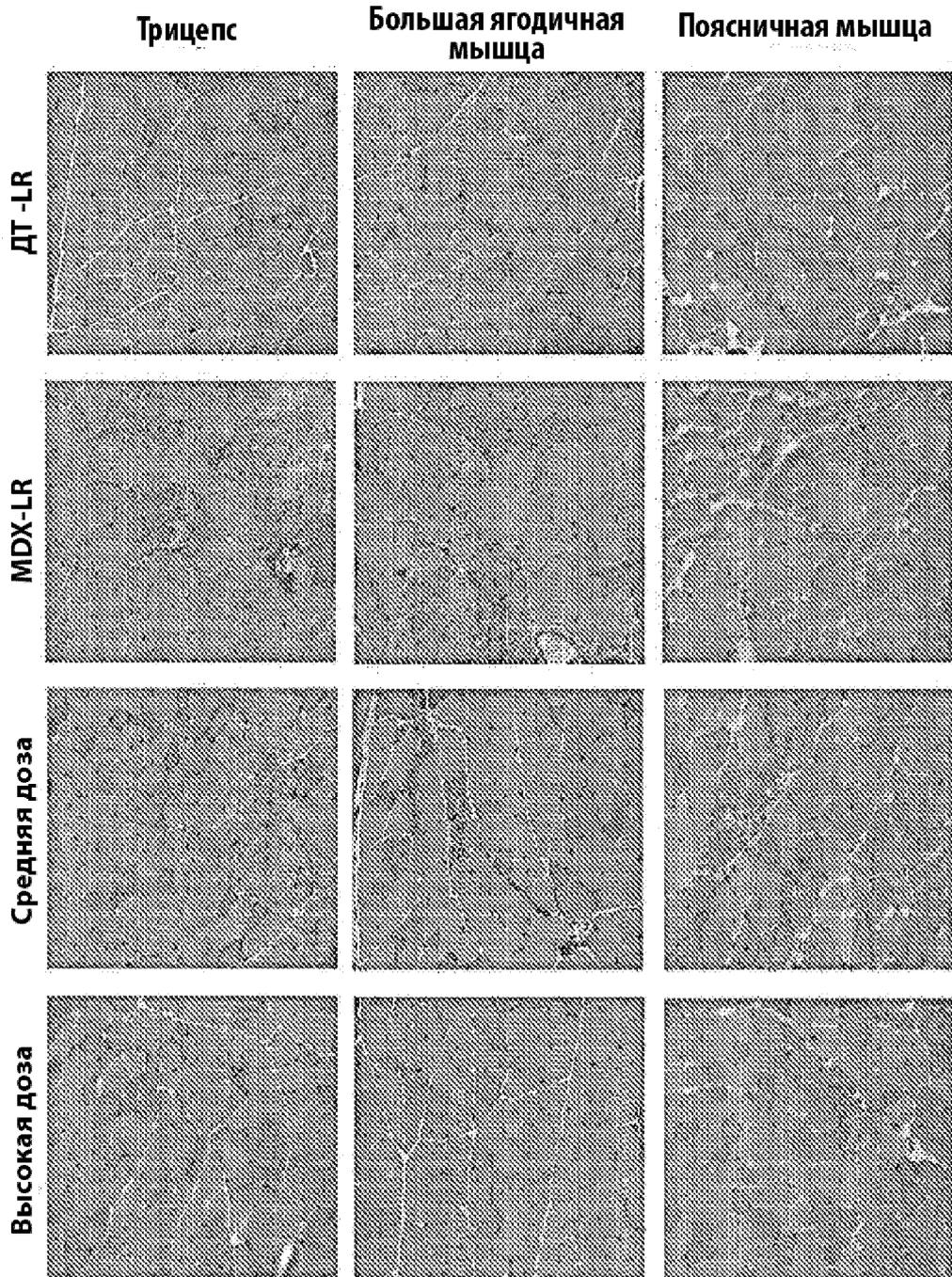


Фиг. 15

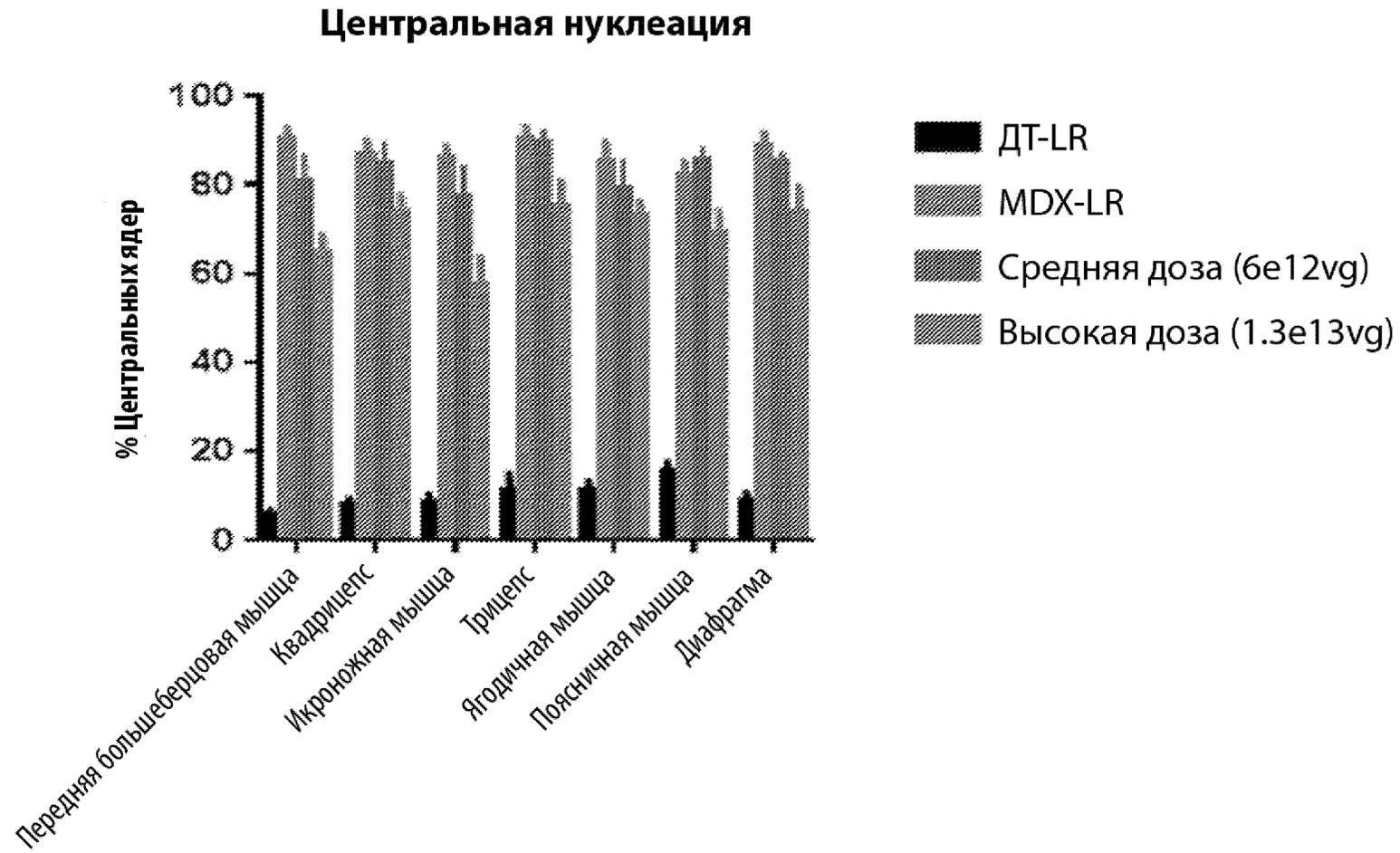


Фиг. 16

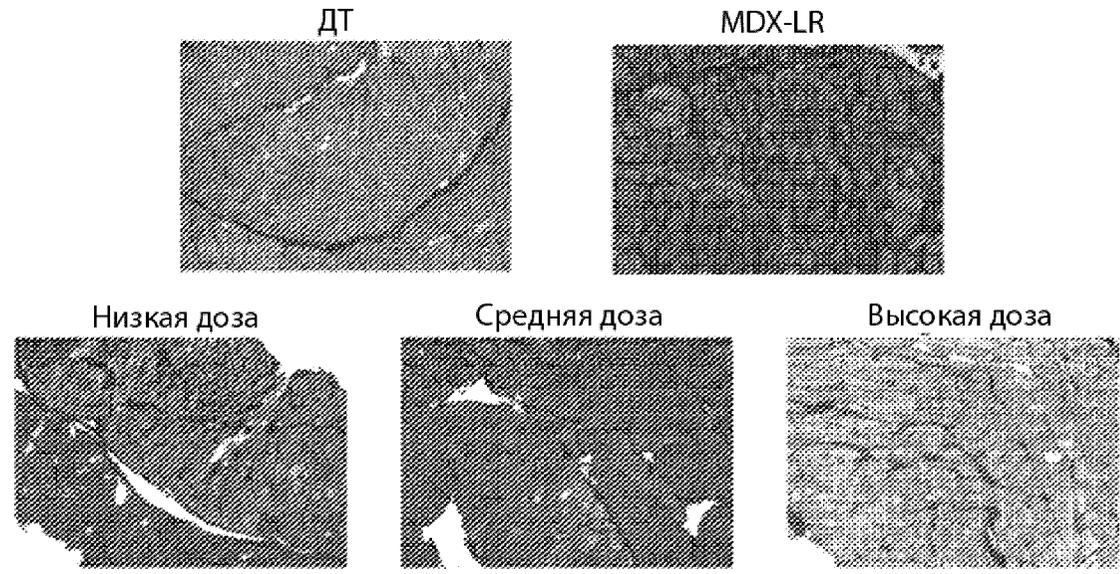




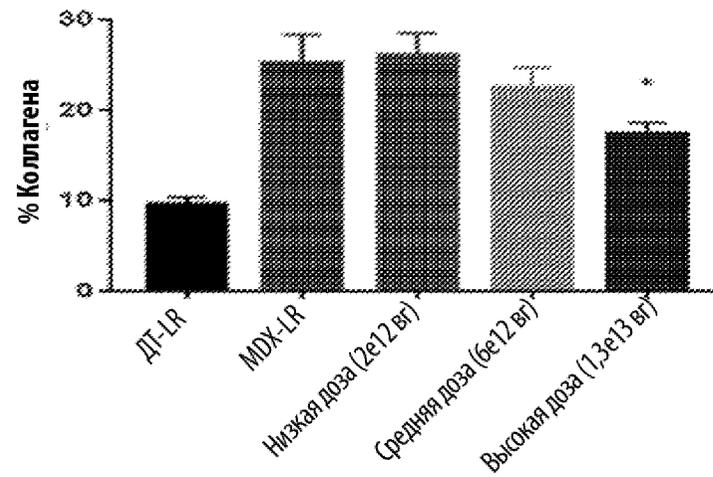
Фиг. 18



Фиг. 19

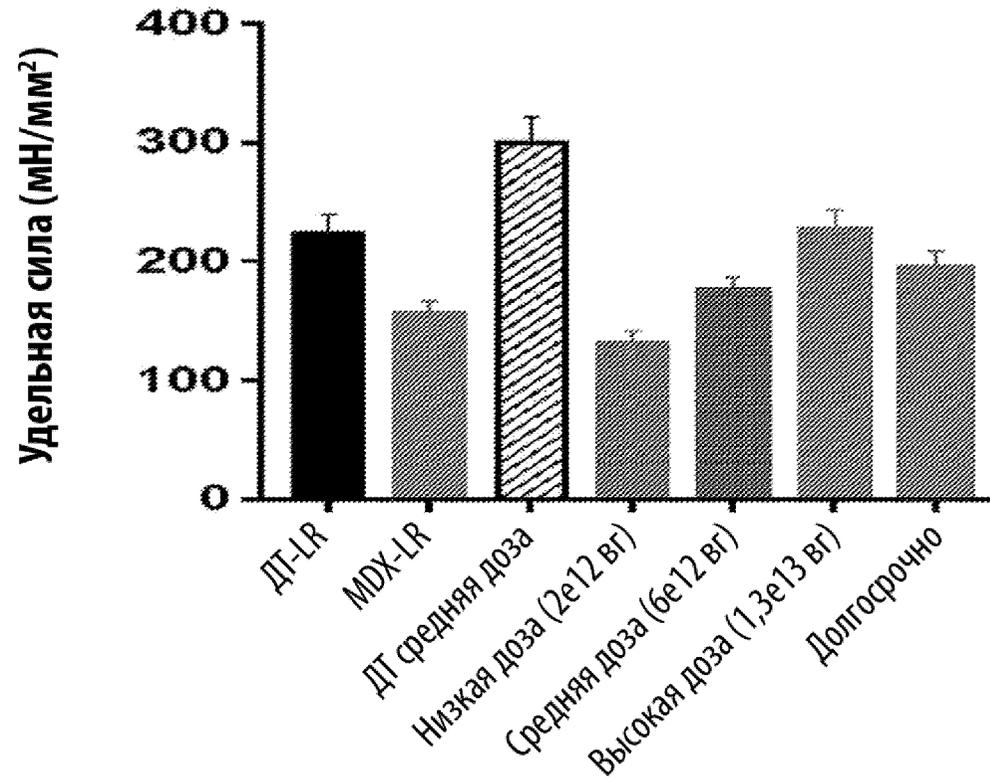


Сириус красный - Диафрагма

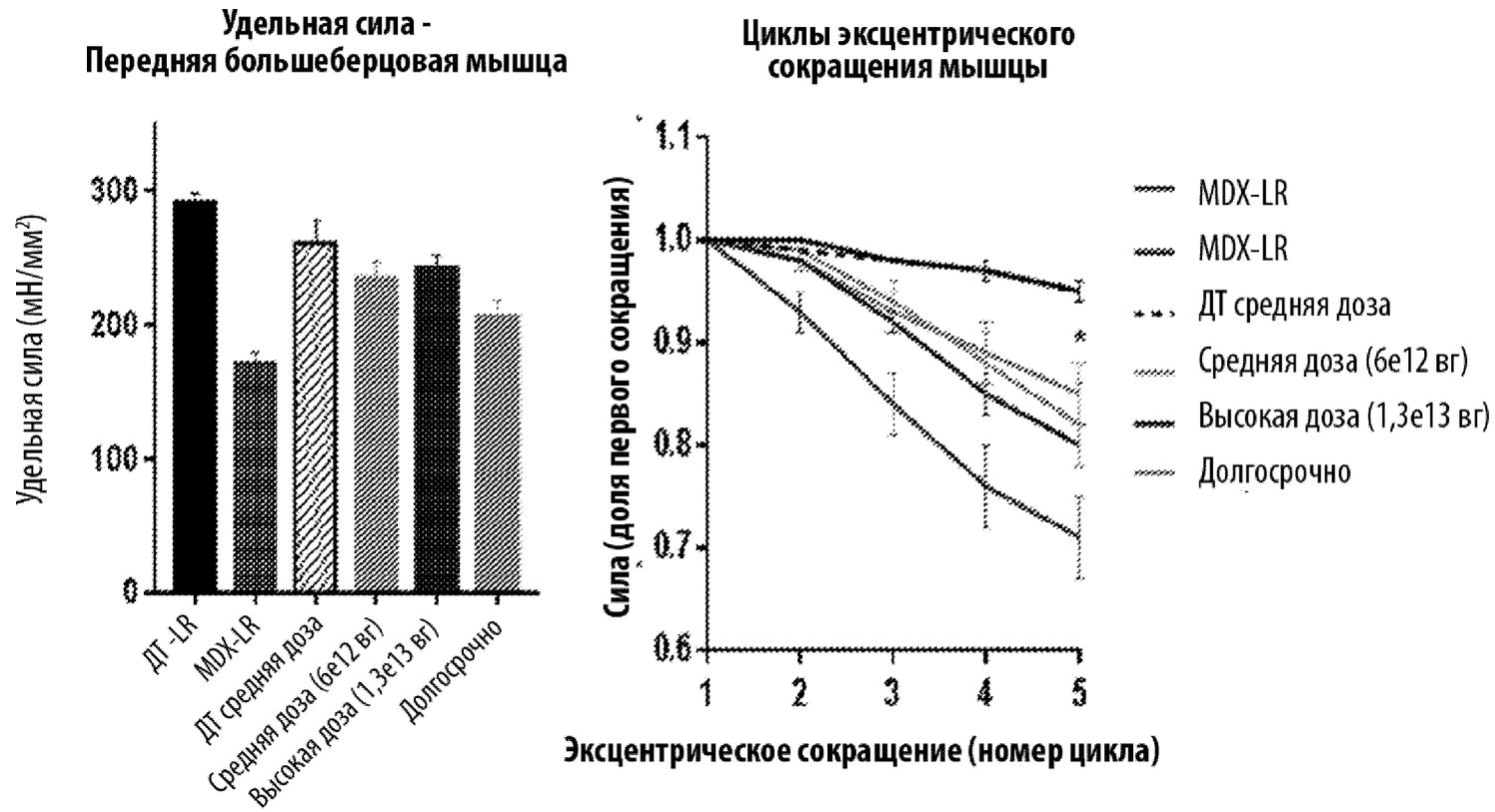


Фиг. 20

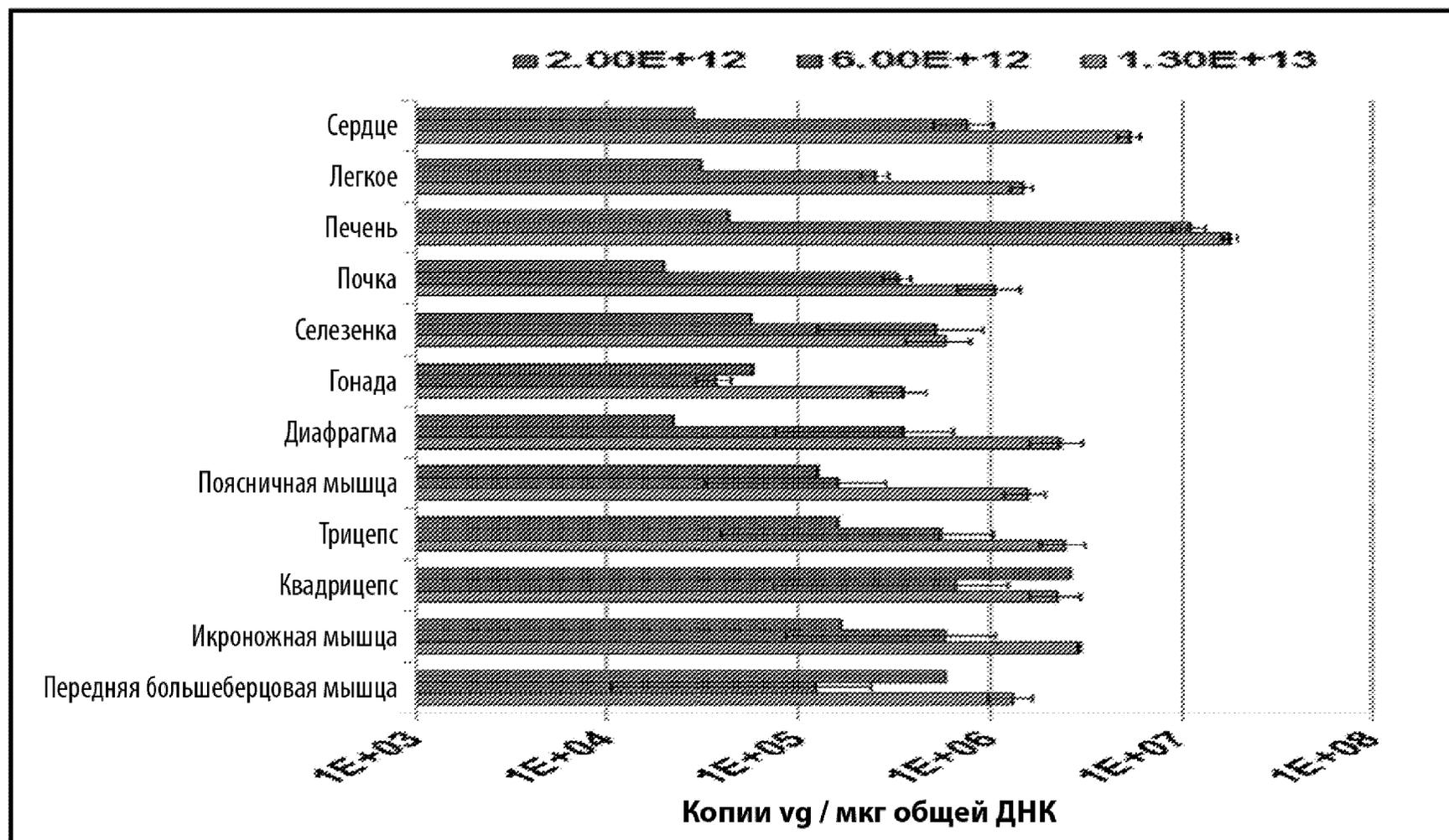
Удельная сила - Диафрагма



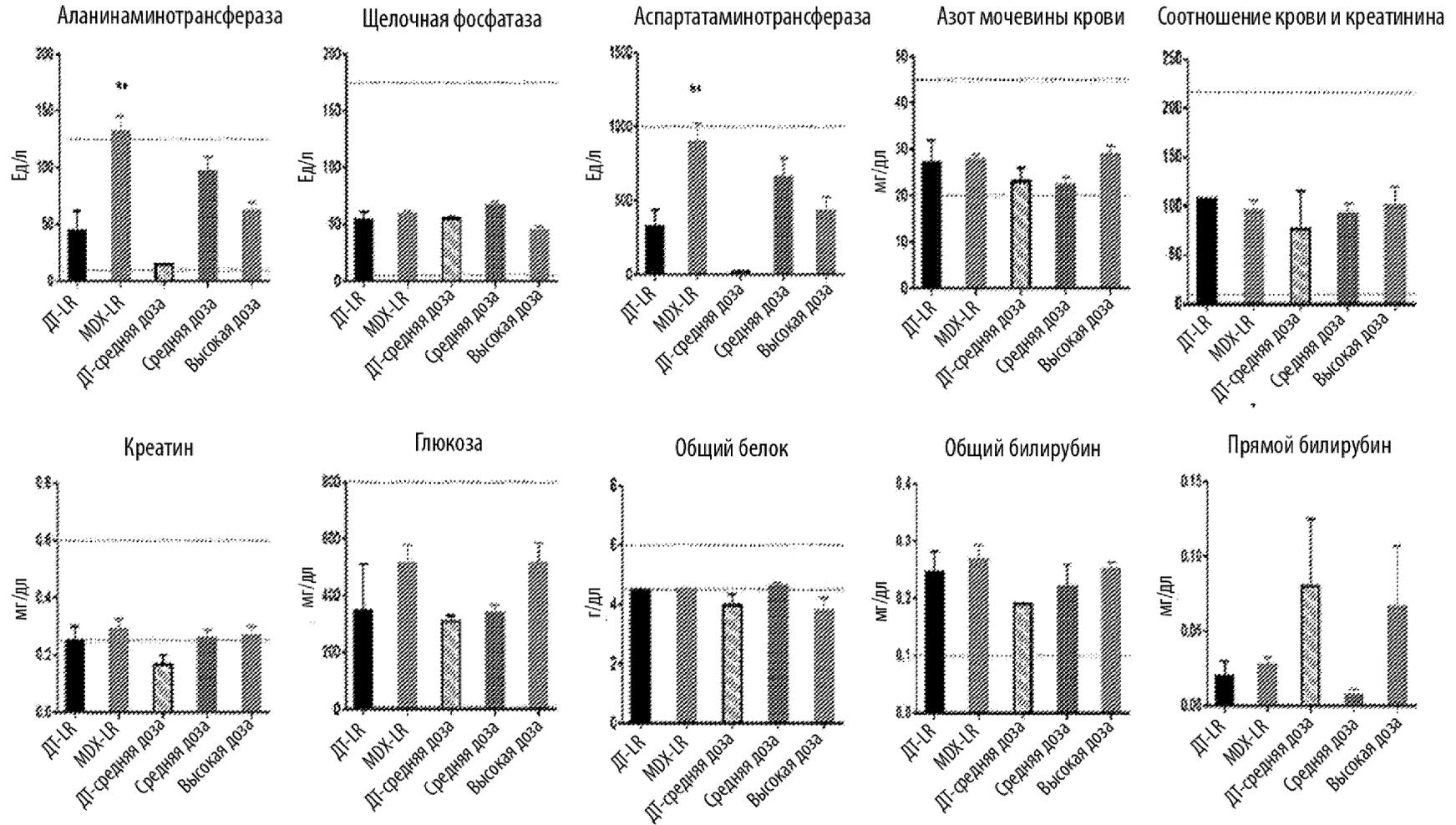
Фиг. 21



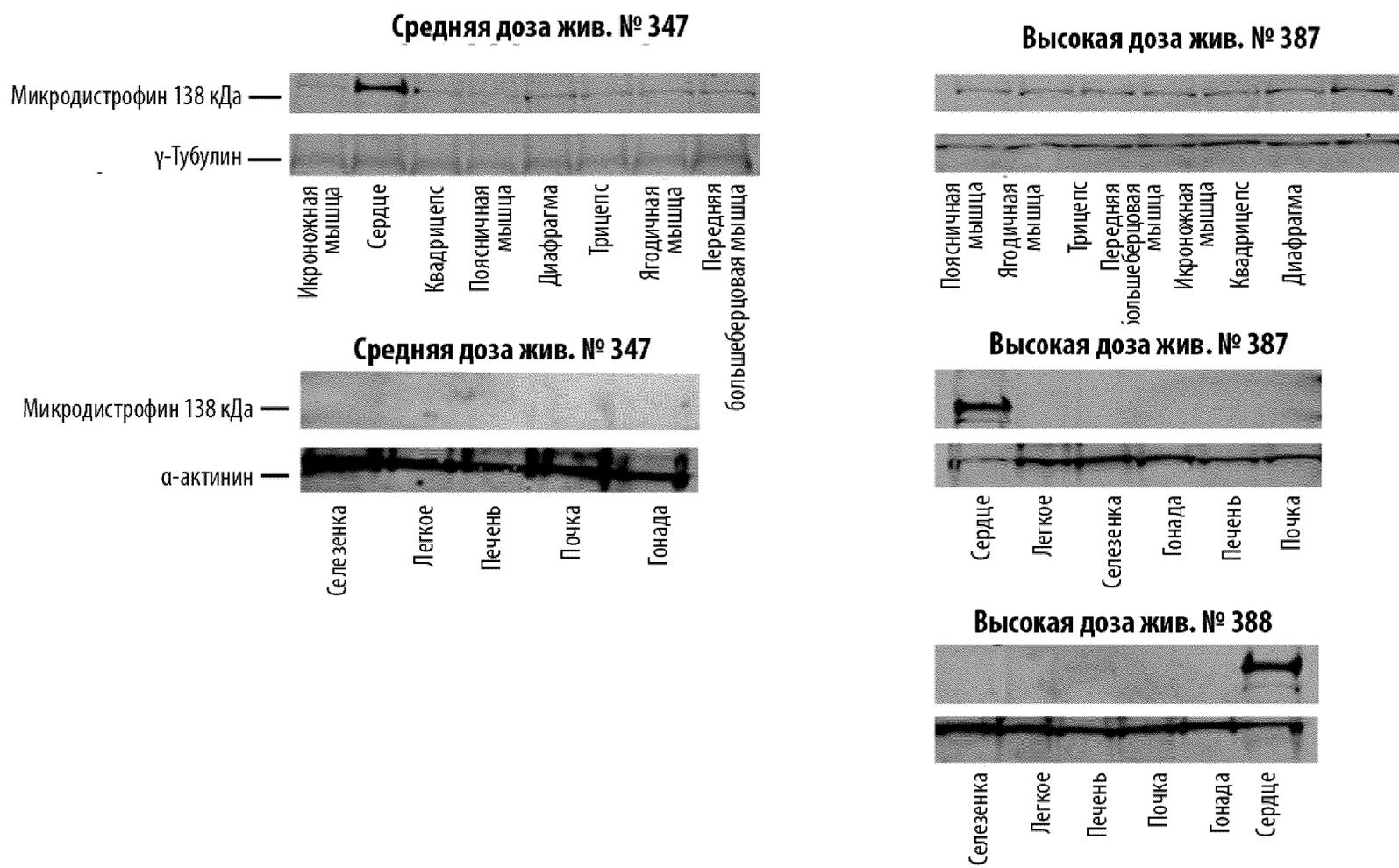
Фиг. 22

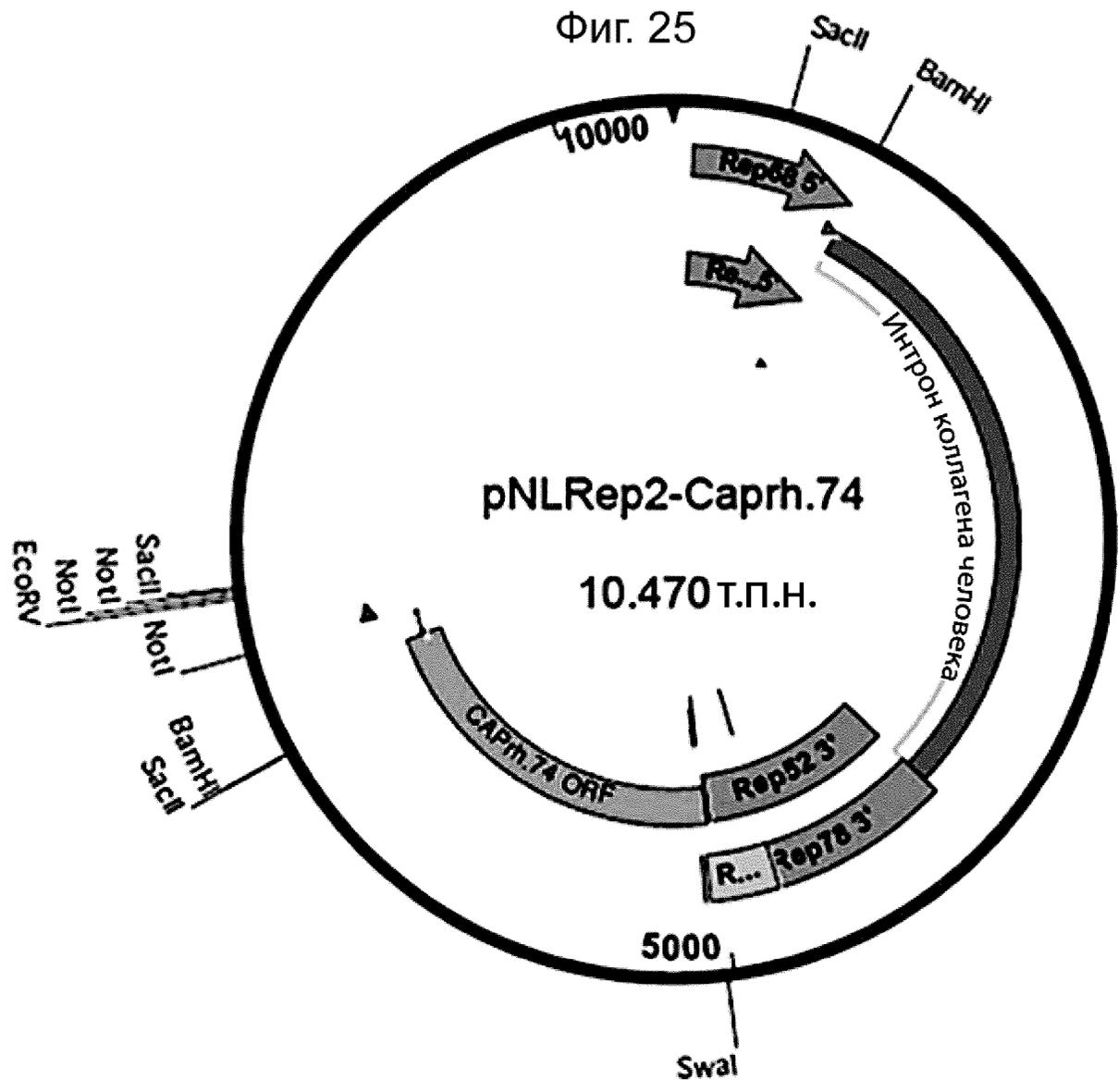


Фиг. 23



Фиг. 24





Фиг. 26

