

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090989** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2020.10.30**

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)  
*C07K 14/475* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2018.10.19**

---

(54) **СПОСОБЫ И МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ НА NT-3 ГЕННОЙ ТЕРАПИИ**

---

(31) **62/574,828; 62/676,687; 62/741,335**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.10.20; 2018.05.25; 2018.10.04**

**Саенк Зариф (US)**

(33) **US**

(74) Представитель:

(86) **PCT/US2018/056765**

**Медведев В.Н. (RU)**

(87) **WO 2019/079755 2019.04.25**

(71) Заявитель:

**РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ ЭТ  
НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕН'С  
ХОСПИТАЛ (US)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к опосредованной рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (гAAV) доставке полинуклеотида нейротрофина 3 (NT-3). Раскрытие относится к гAAV и способам применения гAAV в направленной на NT-3 генной терапии для улучшения мышечной силы, стимуляции мышечного роста и для лечения связанных с истощением мышечной ткани нарушений, таких как мышечная дистрофия и нейропатия Шарко-Мари-Тута.

**202090989**  
**A1**

**202090989**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562440EA/032

### СПОСОБЫ И МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ НА NT-3 ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/574828, поданной 20 октября 2017 года, предварительной заявке на патент США № 62/676687, поданной 25 мая 2018 года, и предварительной заявке на патент США № 62/741335, поданной 4 октября 2018 года, раскрытия которых тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте.

#### ЗАЯВЛЕНИЕ О ЗАИНТЕРЕСОВАННОСТИ ПРАВИТЕЛЬСТВА США

[0002] Настоящее изобретение выполнено при поддержке правительства под номерами грантов NS105986 и U01-NS066914, присужденных Национальными институтами здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Настоящая заявка содержит в виде отдельной части раскрытия Перечень последовательностей в машиночитаемой форме (название файла: 53122A\_Seqlisting.txt; текстовый файл в ASCII-формате размером 17133 байта; созданный 18 октября 2018 года), который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0004] В настоящем изобретении представлена опосредованная рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (гAAV) доставка полинуклеотида нейротрофина 3 (NT-3). В настоящем изобретении представлены гAAV и способы применения гAAV в направленной на NT-3 генной терапии для улучшения мышечной силы, стимулирования мышечного роста и для лечения нейропатий и связанных с истощением мышечной ткани нарушений, таких как нейропатия Шарко-Мари-Тута.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Недавние исследования показали, что нейротрофин 3 (NT-3) является многофункциональной молекулой с ранее неизвестными или недооцененными характеристиками. В дополнение к общепризнанным эффектам в отношении регенерации периферических нервов и шванновских клеток (SC) NT-3 обладает противовоспалительными и иммуномодулирующими эффектами. Yang et al., *Mol Titer*, 22(2):440-450 (2014). Недавно было продемонстрировано, что NT-3 способен ослаблять спонтанную аутоиммунную периферическую полинейропатию в модели грызунов с хроническим воспалительным демиелинизирующим нарушением периферических нервов, которое встречается у людей. Yalvac et al., *Gene therapy*, 23(1):95-102 (2015).

[0006] Нейропатии Шарко-Мари-Тута (СМТ) являются наиболее распространенными наследственными нейропатиями. СМТ1 включает в себя пять типов

СМТ, которые обуславливаются четырьмя генами при их мутировании. Эта группа включает в себя большинство людей с СМТ. Эти гены связаны с SC и миелиновой оболочкой, окружающей аксон, хотя они взаимодействуют разными путями и, таким образом, являются фенотипически гетерогенными. СМТ типа 1А является результатом дупликации ДНК в хромосоме 17p11, охватывающей ген PMP22, что приводит к развитию классического фенотипа СМТ1. У пациентов развиваются клинические признаки в первые два десятилетия жизни, вызывающие значительные нарушения, требующие вспомогательных средств передвижения. У этих пациентов регенерация периферических нервов является неполной из-за длительной аксотомии и денервации, что возникает как компонент хронической нейропатии. NT-3 является трофическим фактором, секретлируемым шванновскими клетками (SC), который поддерживает регенерацию нервов. Способность денервированных SC к выживанию имеет решающее значение для регенерации нерва, так как SC обеспечивают как факторы роста, так и базальную пластинку, представляющую собой каркас, который способствует росту аксонов. Длительная денервация приводит к снижению регенеративной способности, связанной с пониженной экспрессией ассоциированных с регенерацией молекул SC (нейротрофических факторов (NTF) и их рецепторов), что приводит к атрофии денервированных SC, разрушению лент Бюнгнера и потере каркаса в виде базальной пластинки.

[0007] Предыдущие исследования показали, что направленная на NT-3 генная терапия в модели мышей TremblerJ (TrJ) с нейропатией Шарко-Мари-Тута (СМТ) не только улучшала регенерацию нервов с сопровождающимся увеличением количества SC, плотности миелинизированных волокон и толщины слоя миелина, но также увеличивала диаметр мышечного волокна, что проиллюстрировано для мышц переднего и заднего отделов в задних конечностях. Sahenk et al., *Mol Ther*, 22(3):511-521 (2014). Предыдущие исследования показали, что нейропатические фенотипы, как известно, вызывают разнообразные изменения в скелетных мышцах, включая переход от быстрых волокон типа II к медленным волокнам типа I. Было обнаружено, что у мышей TrJ длинный пальцевый разгибатель, в основном состоящий из волокон быстрого типа, характеризуется значительно более высоким процентом медленных волокон по сравнению с диким типом (WT), а процент волокон типа I в камбаловидной мышце резко увеличивается с возрастом. Nicks et al., *J Neuropathol Exp Neurol*, 72(10):942-954 (2013). Интересно, что старение также сопровождается подобными изменениями в количественном соотношении медленных волокон, как у людей, так и у других млекопитающих. Larsson L, Moss R, *J Physiol.*, 472:595-614 (1993); Larsson et al., *Am J Physiol.*, 272:C638-C649 (1997).

[0008] СМТ1А, наследуемая как аутосомно-доминантное состояние, является наиболее распространенным типом СМТ. Чаще всего это вызвано дупликацией 1,5 Мб в 17p11.2, включающей ген периферического миелинового белка 22 (PMP22), полученной в результате неравного кроссинговера гомологичных хромосом (1). Это медленно прогрессирующее заболевание без известного лечения. Симптомы чаще всего начинаются в первые два десятилетия. Наблюдаются полая стопа и молоткообразные пальцы стопы.

Требуются вспомогательные средства передвижения, такие как ортезы на голеностопный сустав. Реже в тяжелых случаях у детей может требоваться инвалидная коляска или дыхательный аппарат. Как правило, 90% пациентов характеризуется скоростью проводимости двигательного нерва (NCV) в локтевом нерве, составляющей от 16 до 35 м/с или меньше (2). Хотя генетический дефект главным образом связан с шванновскими клетками (SC), клиническая электрофизиологическая картина представляет собой зависимую от длины сенсомоторную демиелинизирующую нейропатию. Клиническая картина в значительной степени зависит от аксональной дегенерации, возникающей в результате нарушения взаимодействия шванновских клеток (SC) и аксона (3).

[0009] В настоящее время лечения этого заболевания не существует. В качестве помощи широко афишировались добавки на основе аскорбиновой кислоты, но многократные исследования не показали наличия какой-либо приносимой ими пользы. Терапия, предусматривающая как низкую дозу (1-2 г/сутки) (4-6), так и высокую дозу (3-4 г/сутки), не доказала свою эффективность (6, 7). Первоначально клиническое исследование в отношении NT-3 на людях показало клиническую эффективность после 24 недель лечения, сопровождающуюся увеличением количества миелинизированных нервных волокон в биоптатах суральных нервов после лечения (8). У мыши Tg<sup>J</sup> подкожная обработка NT-3 улучшала регенерацию аксонов и усиливала миелинизацию. Однако короткое время полужизни NT-3 в сыворотке крови оказалось основным препятствием для продолжения подкожного введения, и использование этого продукта было прекращено.

[0010] Было показано, что большое число заболеваний опорно-двигательного аппарата приводит к снижению мышечной силы. Они включают в себя без ограничения наследственные или рецессивные миопатии (такие как мышечные дистрофии), связанные с истощением мышечной ткани заболевания (как например кахексия, которая может являться результатом первопричинных заболеваний, таких как заболевания приобретенного иммунодефицита (AIDS), ревматоидный артрит, рак, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD) и цирроз), состояния мышечной атрофии или ослабления (как например саркопения, которая может являться результатом старения), длительное состояние бездействия (как например паралич, кома, длительный постельный режим и пребывание в ICU), слабость, вызванная хирургическим вмешательством (как например операция по замене сустава), вызванная лекарственными средствами миопатия и рабдомиолиз. Мышечная патология этих заболеваний и состояний частично или полностью опосредована комбинацией иммунных, воспалительных и фиброзирующих ответов. Средства, способные блокировать эти ответы и/или стимулировать регенерацию поврежденной ткани, будут способны замедлять или обращать прогрессирование заболевания при этих нарушениях.

[0011] Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой дефектный по репликации парвовирус, геном однонитевой ДНК которого имеет длину приблизительно 4,7 т. п. н., включая инвертированные концевые повторы (ITR) длиной 145 нуклеотидов. Существует несколько серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов

серотипов AAV известны. Например, полный геном AAV-1 представлен под № доступа в GenBank NC\_002077; полный геном AAV-2 представлен под № доступа в GenBank NC\_001401 и в Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 {1983}; полный геном AAV-3 представлен под № доступа в GenBank NC\_1829; полный геном AAV-4 представлен под № доступа в GenBank NC\_001829; геном AAV-5 представлен под № доступа в GenBank AF085716; полный геном AAV-6 представлен под № доступа в GenBank NC\_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 представлены под №№ доступа в GenBank AX753246 и AX753249 соответственно; геном AAV-9 представлен в Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 представлен в Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); а геном AAV-11 представлен в Virology, 330(2): 375-383 (2004). Действующие в цис-положении последовательности, управляющие репликацией (rep) вирусной ДНК, капсидированием/упаковкой и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR AAV. Три промотора AAV (называемые p5, p19 и p40 по их относительным местоположениям на карте) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены *rep* и *cap*. Два промотора *rep* (p5 и p19) в сочетании с дифференциальным сплайсингом одного интрона AAV (в нуклеотидах 2107 и 2227) приводят к получению четырех белков *rep* (*rep* 78, *rep* 68, *rep* 52 и *rep* 40) из гена *rep*. Белки *rep* обладают множественными ферментативными свойствами, которые в конечном итоге отвечают за репликацию вирусного генома. Ген *cap* экспрессируется под управлением промотора p40, и он кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты начала трансляции отвечают за получение трех родственных капсидных белков. Один консенсусный сайт полиаденилирования расположен в положении 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассматриваются в Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

[0012] AAV обладает уникальными свойствами, которые делают его привлекательным в качестве вектора для доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование AAV клеток в культуре является нецитопатическим, а естественное инфицирование людей и других животных протекает скрыто и бессимптомно. Более того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что обеспечивает возможность нацеливания на многие различные ткани *in vivo*. Более того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и неделящиеся клетки и может существовать фактически на протяжении всей жизни этих клеток в качестве транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Провирусный геном AAV является инфекционным в виде встроенной ДНК в плазидах, что делает возможным конструирование рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV, капсидированием и интеграцией генома, содержатся в ITR генома AAV, некоторая или вся внутренняя часть генома, составляющая примерно 4,3 т. п. н. (кодирующая белки репликации и структурные капсидные белки, *rep-cap*), может быть заменена чужеродной ДНК. Белки *rep* и *cap* могут быть представлены в транс-положении.

Еще одной важной характеристикой AAV является то, что это чрезвычайно стабильный и устойчивый вирус. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56° до 65°C в течение нескольких часов), что делает хранение AAV на холоде менее критичным. AAV может быть даже лиофилизирован. Наконец, инфицированные AAV клетки не являются устойчивыми к суперинфекции.

[0013] Существует необходимость в разработке способов лечения нейропатий СМТ и других связанных с истощением мышечной ткани нарушений. В настоящем изобретении представлены геннотерапевтические способы доставки NT-3 для лечения нейропатий СМТ и других связанных с истощением мышечной ткани нарушений.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0014] В настоящем изобретении представлены способы стимулирования мышечного роста у субъекта. Способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества нейротрофина-3 (NT-3), про-NT-3 или их эффективного фрагмента или нуклеиновой кислоты, кодирующей NT-3, про-NT-3 или их эффективный фрагмент, нуждающемуся субъекту. В настоящем изобретении описывается новый эффект NT-3, его способность непосредственно влиять на синтез белка и метаболическое ремоделирование в нейрогенной мышце.

[0015] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения NT-3, про-NT-3 или их эффективный фрагмент или нуклеиновую кислоту, кодирующую NT-3 или его эффективный фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, вводят внутримышечно.

[0016] Согласно любому из способов в соответствии с настоящим изобретением нуклеиновую кислоту, кодирующую NT-3 или его эффективный фрагмент, вводят с использованием вирусного вектора. В определенных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В родственных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая NT-3 или его эффективный фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, функционально связана со специфичным для мышц промотором, таким как тройной промотор специфичной для мышц креатинкиназы. В различных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая NT-3 или его эффективный фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, предусматривает SEQ ID NO: 1.

[0017] В настоящем изобретении представлены нуклеиновые кислоты, содержащие в направлении от 5'- к 3'-концу: (i) последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) AAV2; (ii) последовательность промотора/энхансера мышечной креатинкиназы, представленную нуклеотидами 147-860 из SEQ ID NO: 11; (iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид NT-3 человека; и (iv) последовательность второго ITR AAV2; где полипептид NT-3 человека характеризуется аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, или кодируется нуклеотидной последовательностью, на 90% идентичной нуклеотидам 1077-1850 из SEQ ID NO: 11 или

на 100% идентичной нуклеотидам 1077-1850 из SEQ ID NO: 11.

[0018] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержат расположенный со стороны 3'-конца относительно промотора/энхансера химерный интрон, представленный нуклеотидами 892-1024 из SEQ ID NO: 11. Кроме того, нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением могут дополнительно содержать расположенный со стороны 3'-конца относительно указанной нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид NT-3 человека, сигнал полиаденилирования SV40, представленный нуклеотидами 1860-2059 из SEQ ID NO: 11.

[0019] Любые из нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением могут содержать одну или несколько последовательностей инвертированных концевых повторов (ITR). Например, нуклеиновая кислота может содержать первый ITR, который представлен нуклеотидами 7-112 из SEQ ID NO: 11, и/или второй ITR, который представлен нуклеотидами 2121-2248 из SEQ ID NO: 11.

[0020] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты предусматривают геном scAAV1.tMCK.NTF3, который на по меньшей мере 90% идентичен нуклеотидной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11.

[0021] В настоящем изобретении также представлены частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащие любую из нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением, где rAAV обладает инфицирующей способностью. Частицы rAAV могут принадлежать к любому серотипу rAAV, такому как AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11 или AAVrh.74. Кроме того, в любой из частиц rAAV в соответствии с настоящим изобретением ДНК AAV в геноме rAAV происходит из AAV-1.

[0022] В настоящем изобретении также представлены композиции, содержащие rAAV в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель. Например, такие композиции составляются для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта или такие композиции составляются для стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта.

[0023] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены способы лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид NT-3; где а) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1, б) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1; в) нуклеиновая кислота предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, д) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3,

представляет собой любую из нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением, е) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV вводят в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3, ф) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, г) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, k) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающая введение посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающая введение посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

[0024] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены способы улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид NT-3; где а) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1, б) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1; с) нуклеиновая кислота предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, d) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3,

представляет собой любую из нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением, е) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV вводят в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3, ф) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, г) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, k) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающая введение посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающая введение посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

[0025] Согласно любому способу в соответствии с настоящим изобретением нуклеиновую кислоту вводят с использованием вирусного вектора, такого как вектор на основе аденоассоциированного вируса. Любой из способов в соответствии с настоящим изобретением может быть выполнен с использованием нуклеиновой кислоты, которая функционально связана со специфичным для мышц промотором, таким как промотор специфичной для мышц креатинкиназы (MCK). Кроме того, любой из способов в соответствии с настоящим изобретением может быть выполнен с использованием scAAV1.tMCK.NTF3, содержащей несущую NT-3 генную кассету, представленную в SEQ ID NO: 11.

[0026] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении

представлены геннотерапевтические способы с использованием гена нейротрофина-3 (NTF3) человека под контролем специфичного для мышц промотора tMCK, с использованием вектора scAAV1, самокомплементарного серотипа AAV1. В частности, в настоящем изобретении представлены способы лечения субъектов с диагнозом связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии, включающие введение AAV-вектора, экспрессирующего NT-3. В частности, способы предусматривают введение конструкции scAAV1.tMCK.NTF3 путем внутримышечной (в/м) инъекции в икроножную мышцу и переднюю большеберцовую мышцу. Например, внутримышечная доставка AAV-вектора, экспрессирующего NT-3, например scAAV1.tMCK.NTF3, инициирует локальное продуцирование и секрецию NT-3 в кровообращение, тем самым способствуя миелинизации нервных волокон и регенерации волокон, что приводит к стабилизации фенотипа относящегося к СМТ заболевания. Более конкретно, в настоящем изобретении представлены способы введения scAAV1.tMCK.NTF3 в дозе приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг или в дозе приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг. scAAV1.tMCK.NTF3 содержит несущую NT-3 генную кассету, представленную в SEQ ID NO: 11.

[0027] В настоящем изобретении также представлены способы введения AAV-вектора, экспрессирующего NT-3, в качестве суррогатной генной терапии для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии. NT-3 характеризуется коротким периодом полужизни, и способы в соответствии с настоящим изобретением включают введение AAV-вектора для устойчивого высвобождения белка NT-3, даже если у субъекта экспрессируется эндогенный белок NT-3. В качестве суррогатной генной терапии введение AAV-вектора обеспечивает устойчивую доставку белка NT-3 за счет устойчивой секреции мышечными клетками. Такой непрерывный устойчивый низкий уровень в кровообращении белка NT-3 обеспечивает терапевтический эффект с минимальным риском токсичности. Системное продуцирование NT-3 с помощью генной терапии также является более удобным и экономически эффективным вариантом терапии по сравнению с повторными инъекциями очищенного пептида NT-3.

[0028] В настоящем изобретении представлены способы лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку дозы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, что приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации белка NT-3.

[0029] В настоящем изобретении также представлены способы стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку дозы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, что приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации белка NT-3.

[0030] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены способы лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-

человеку рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, где путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг.

В другом варианте осуществления

[0031] в настоящем изобретении представлены способы лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, где путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $3 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $8 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $9 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг.

[0032] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены способы лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, где путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./мл. Например, rAAV вводят с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно, причем, например, объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл, при этом в общей сложности вводят от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0033] В иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены способы лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, где путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающая введение посредством 3-6 инъекций на мышцу соответственно (объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл). В общей сложности вводят от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0034] В одном варианте осуществления представлены способы улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, где путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до

приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг.

[0035] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены способы улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, где путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $3 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $8 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $9 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг.

[0036] В иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены способы улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, где путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./мл. Например, rAAV вводят с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно, причем, например, объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл, при этом в общей сложности вводят от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0037] В иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены способы улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающие стадию введения субъекту-человеку рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, где путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./мл, причем введение осуществляют в низкой дозе ( $2 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента) и в высокой дозе ( $6 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента) с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно (объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл). В общей сложности вводят от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0038] В любом из способов в соответствии с настоящим изобретением путь введения scAAV1.tMCK.NTF3 представляет собой внутримышечную билатеральную инъекцию в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу. Кроме того, в любом способе в соответствии с настоящим изобретением введение scAAV1.tMCK.NTF3 приводит к улучшенной мышечной силе у субъекта в верхних или нижних конечностях, и, например, улучшение в отношении мышечной силы измеряют как снижение суммарного балла по педиатрической шкале СМТ (СМТPedS). Кроме того, в любом способе в соответствии с настоящим изобретением введение scAAV1.tMCK.NTF3 приводит к снижению или прекращению прогрессирования

заболевания на протяжении двухлетнего периода времени. Прогрессирование заболевания измеряют с помощью СМTPedS.

[0039] Мышечную силу также измеряют с использованием электромиографии, ручной миометрии, миометрии с использованием зафиксированной системы, мануальных тестов мышц и/или функциональных тестов/тестов активности, таких как тест Джебсена, и/или тестов на время, в которых оценивают, сколько времени требуется субъекту для выполнения конкретной задачи, таких как тест с 6-минутной ходьбой, подъем с пола на время, ходьба/пробежка на 10 метров, подъем на 4 ступени на время и время спуска с 4 ступеней.

[0040] В одном аспекте настоящего изобретения в любом из способов субъект страдает наследственной нейропатией, такой как нейропатия Шарко-Мари-Тута (СМТ), например, СМТ1А, СМТ2К, СМТ4А, СМТ3А, и аксональной и демиелинизирующей нейропатиями, обусловленными аутосомно-рецессивным генным вариантом, или аутосомно-доминантным генным вариантом, или Х-сцепленным генным вариантом. Наследственная нейропатия может быть обусловлена любым из генных вариантов, представленных в таблице 1. Кроме того, наследственная нейропатия может представлять собой транстиретиновые амилоидные нейропатии, обусловленные мутацией в гене транстиретина (ТТR), как например следующие генные варианты: Val30Met, Ile107Val и Ser77Tyr.

[0041] В другом аспекте настоящего изобретения в любом из способов субъект страдает приобретенной нейропатией с потерей аксонов и/или нарушенной регенерацией нервов. Приобретенная нейропатия является периферической нейропатией, обусловленной любым нарушением или заболеванием, которые, как известно, обуславливают нейропатию. Например, субъект страдает периферической нейропатией, обусловленной сахарным диабетом, инфекцией вирусом иммунодефицита человека (HIV), нарушением щитовидной железы, таким как гипотиреоз, гипогликемией, уремией, почечной недостаточностью, печеночной дисфункцией, печеночной недостаточностью, полицитемией, нарушениями соединительной ткани, раком, болезнью Лайма, целиакией, лепрой, порфирией, синдромом Шегрена, полиомиелитом, акромегалией, нарушениями липидного/гликолипидного метаболизма, синдромом Западного Нила, амилоидозом, митохондриальными нарушениями, диспротеинемическими нарушениями, такими как моноклональная гаммапатия неустановленной этиологии (MGUS) или синдром POEMS. Субъект страдает дефицитами питательных веществ/витаминов, такими как дефицит витамина B<sub>12</sub>, дефицит витамина E или дефицит меди.

[0042] В дополнительном аспекте настоящего изобретения в любом из способов, описанных в настоящем документе, субъект страдает аутоиммунной периферической полинейропатией, острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулонейропатией (AIDP), хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулонейропатией (CIDP), васкулитным множественным мононевритом, паранейропатией, идиопатическим ганглионитом, амиотрофическим латеральным склерозом, мультифокальной моторной нейропатией с блокадой проводимости или синдромом нижнего мотонейрона.

[0043] Приобретенная нейропатия может быть токсической нейропатией. Например, токсическая нейропатия является результатом токсического эффекта назначенного лекарственного препарата, такого как хлорамфеникол, хлорохин, колхицин, дисульфирам, этанерцепт, этамбутол, золото, гидроксихлорохин, нитрофуантоин, метронидазол, стравудин, залцитабин, инфликсимаб, лефлуномид, талидомид, или химиотерапевтического средства, такого как цисплатин, цитарабин, бортезомиб, доцетаксел, леналидомид, мизондиазол, оксалиплатин, паклитаксел, прокарбазин, сурамин, талидомид, винбластин или винкристин, или лекарственного средства против алкоголизма, такого как дисульфирам, или противосудорожного средства, такого как фенитоин или дилантин, или лекарственных препаратов для сердца или регуляции кровяного давления, таких как статины, амиодарон, гидралазин, прокаинамид, пергексиллин, или антибиотика, такого как фторхинолоны, изониазид, ципро, леваквин, флагил или метронидазол, или терапевтических средств против кожных состояний, таких как дапсон. Токсическая нейропатия также может быть обусловлена длительным злоупотреблением спирта или токсичностью витамина В<sub>6</sub>.

[0044] В другом аспекте настоящего изобретения в любом из способов описанных в настоящем документе, субъект является больным раком пациентом, страдающим приобретенной нейропатией. Например, у больного раком пациента развилась нейропатия, связанная с дефицитом питательных веществ, побочными эффектами химиотерапии и/или паранеопластическим синдромом.

[0045] В еще одном аспекте настоящего изобретения в любом из способов субъект является перенесшим хирургическое вмешательство пациентом, страдающим приобретенной нейропатией. Например, у перенесшего хирургическое вмешательство пациента развилась нейропатия после бариатрического хирургического вмешательства, нескольких ортопедических процедур или нескольких хирургических вмешательств в отношении "защемленных нервов".

[0046] В другом аспекте настоящего изобретения в любом из способов субъект страдает наследственной миопатией, нервно-мышечным заболеванием, мышечной атрофией, индуцированной лекарственными средствами миопатией, саркопенией, кахексией, атрофией мышечных волокон II типа, генетически обусловленными мышечными дистрофиями, возрастной мышечной атрофией или приобретенным аутоиммунным первичным мышечным нарушением.

[0047] В другом аспекте настоящего изобретения в любом из способов субъект страдает мышечной дистрофией Дюшенна, мышечной дистрофией Беккера, миотонической мышечной дистрофией, саркогликанопатиями, миотонической дистрофией, мышечной дистрофией Эмери-Дрейфуса, врожденной мышечной дистрофией, врожденной мышечной дистрофией с дефицитом мерозина, миопатией Бетлема, врожденной мышечной дистрофией Ульриха, лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофией, спинальной мышечной дистрофией, мышечной дистрофией с синдромом ригидного позвоночника, дистальной мышечной дистрофией, окулофарингеальной мышечной дистрофией,

врожденной мышечной дистрофией (MDC) 1A, 1B, 1C и 1D; тазово-плечевой мышечной дистрофией (LGMD) 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 2O and 2Q; мышечно-глазо-мозговой болезнью; болезнью Фукуяма с синдромом Уокера-Варбурга; миастеническими синдромами; врожденными миастениями; миопатией с тельцами-включениями; миозитом с тельцами-включениями; дерматомиозитом; центронуклеарной миопатией; миопатией Миоши; митохондриальной миопатией; немалиновой миопатией; миопатией Нонака; миастенией гравис или полимиозитом.

[0048] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение терапевтически эффективного количества нейротрофина-3 (NT-3), pro-NT-3 или их эффективного фрагмента или нуклеиновой кислоты, кодирующей NT-3, pro-NT-3 или их эффективный фрагмент, для изготовления лекарственного препарата, предназначенного для стимулирования мышечного роста у субъекта. Например, лекарственный препарат составляют для внутримышечного введения.

[0049] В иллюстративном варианте осуществления лекарственный препарат содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую NT-3, pro-NT-3 или их эффективный фрагмент, где нуклеиновая кислота находится в вирусном векторе. В родственных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса. В различных вариантах осуществления нуклеиновая кислота функционально связана со специфичным для мышц промотором, таким как тройной промотор специфичной для мышц креатинкиназы. В различных вариантах осуществления нуклеиновая кислота предусматривает SEQ ID NO: 1.

[0050] В настоящем изобретении также представлено применение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид NT-3, для изготовления лекарственного препарата, предназначенного для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у субъекта-человека, где: а) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1, б) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1; в) нуклеиновая кислота предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, д) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой любую из нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением, е) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV представлен в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3, ф) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, г) нуклеиновая

кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, k) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающей введение посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающей введение посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

[0051] В настоящем изобретении также представлено применение дозы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид NT-3, для изготовления лекарственного препарата, предназначенного для улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у субъекта-человека, где: а) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1, b) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1; c) нуклеиновая кислота предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, d) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой любую из нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением, e) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV представлен в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3, f) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в.

г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, g) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, k) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающей введение посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составляют для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающей введение посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

[0052] Например, любой из лекарственных препаратов в соответствии с настоящим изобретением может содержать нуклеиновую кислоту, составленную для введения с использованием вирусного вектора, такого как вектор на основе аденоассоциированного вируса. Кроме того, любой из лекарственных препаратов в соответствии с настоящим изобретением может содержать нуклеиновую кислоту, функционально связанную со специфичным для мышц промотором, таким как специфичный для мышц промотор, представляющий собой промотор специфичной для мышц креатинкиназы (MCK). В другом варианте осуществления в любом из лекарственных препаратов в соответствии с настоящим изобретением scAAV1.tMCK.NTF3 содержит несущую NT-3 генную кассету, представленную в SEQ ID NO: 11. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, где лекарственный препарат обеспечивает устойчивую экспрессию низкой концентрации белка NT-3.

[0053] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлено

применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, где доза обеспечивает устойчивую экспрессию низкой концентрации белка NT-3.

[0054] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, где лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и где лекарственный препарат предусматривает дозу rAAV, которая составляет от приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг.

[0055] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, где лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и где лекарственный препарат предусматривает дозу rAAV, которая составляет приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $3 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $8 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $9 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг.

[0056] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, где лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и где лекарственный препарат предусматривает концентрацию rAAV, которая составляет приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл. Например, лекарственный препарат вводят с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно, причем, например, объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги, при этом в общей сложности будет введено от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0057] В иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у

нуждающегося в этом субъекта-человека, где лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и где лекарственный препарат предусматривает дозу rAAV, которая составляет приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./мл, вводимую с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно (объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл). В общей сложности вводят от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0058] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, где лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и где лекарственный препарат предусматривает дозу rAAV, которая составляет от приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг.

[0059] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, где лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и где лекарственный препарат предусматривает дозу rAAV, которая составляет приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $3 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $8 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $9 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг.

[0060] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, где лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и где лекарственный препарат предусматривает концентрацию rAAV, которая составляет приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, причем введение осуществляют в низкой дозе ( $2 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента) и в высокой дозе ( $6 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента). В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат вводят с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно, причем, например, объем каждой инъекции составляет 0,5-1 мл в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги. В общей сложности будет введено от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0061] В иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для получения лекарственного препарата, предназначенного для улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, где лекарственный препарат составляют для внутримышечного пути введения, и где лекарственный препарат предусматривает концентрацию rAAV, которая составляет приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, причем введение осуществляют в низкой дозе ( $2 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента) и в высокой дозе ( $6 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента) с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно (объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл). В общей сложности будет введено от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0062] В любом из путей применения в соответствии с настоящим изобретением лекарственный препарат составляют для внутримышечной билатеральной инъекции в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу. Кроме того, в любом из путей применения в соответствии с настоящим изобретением лекарственный препарат обеспечивает улучшение мышечной силы у субъекта в верхних или нижних конечностях, и, например, улучшение в отношении мышечной силы измеряют как снижение суммарного балла по педиатрической шкале СМТ (СМТPedS). Кроме того, в любом из путей применения в соответствии с настоящим изобретением лекарственный препарат обеспечивает снижение или прекращение прогрессирования заболевания на протяжении двухлетнего периода времени. Прогрессирование заболевания измеряют с помощью СМТPedS.

[0063] В аспекте настоящего изобретения в любом из путей применения в соответствии с настоящим изобретением субъект страдает наследственной нейропатией, такой как нейропатия Шарко-Мари-Тута (СМТ), например, СМТ1А, СМТ2К, СМТ4А, СМТR1А, а также аксональной и демиелинизирующей нейропатиями, обусловленными аутосомно-рецессивным генным вариантом, или аутосомно-доминантным генным вариантом, или Х-сцепленным генным вариантом. Наследственная нейропатия может быть обусловлена любым из генных вариантов, представленных в таблице 1. Кроме того, наследственная нейропатия может представлять собой транстиретиновые амилоидные нейропатии, обусловленные мутацией в гене транстиретина (ТТR), как например следующие генные варианты: Val30Met, Ile107Val и Ser77Tyr.

[0064] В другом аспекте настоящего изобретения в любом из способов в соответствии с настоящим изобретением субъект страдает приобретенной нейропатией с потерей аксонов и/или нарушенной регенерацией нервов. Приобретенная нейропатия является периферической нейропатией, обусловленной любым нарушением или заболеванием, которое обуславливает нейропатию. Например, субъект страдает периферической нейропатией, обусловленной сахарным диабетом, инфекцией вирусом иммунодефицита человека (HIV), нарушением щитовидной железы, таким как гипотиреоз,

гипогликемией, уреимией, почечной недостаточностью, печеночной дисфункцией, печеночной недостаточностью, полицитемией, нарушениями соединительной ткани, раком, болезнью Лайма, целиакией, лепрой, порфирией, синдромом Шегрена, полиомиелитом, акромегалией, нарушениями липидного/гликолипидного метаболизма, синдромом Западного Нила, амилоидозом, митохондриальными нарушениями, диспротеинемическими нарушениями, такими как моноклональная гаммапатия неустановленной этиологии (MGUS) или синдром POEMS. Субъект может страдать дефицитами питательных веществ/витаминов, такими как дефицит витамина B<sub>12</sub>, дефицит витамина E или дефицит меди.

[0065] Кроме того, в любом из путей применения в соответствии с настоящим изобретением субъект страдает аутоиммунной периферической полинейропатией, острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулонейропатией (AIDP), хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулонейропатией (CIDP), васкулитным множественным мононевритом, паранейропатией, идиопатическим ганглионитом, амиотрофическим латеральным склерозом, мультифокальной моторной нейропатией с блокадой проводимости или синдромом нижнего мотонейрона.

[0066] Приобретенная нейропатия представляет собой токсическую нейропатию. Например, токсическая нейропатия является результатом токсического эффекта назначенного лекарственного препарата, такого как хлорамфеникол, хлорохин, колхицин, дисульфирам, этанерцепт, этамбутол, золото, гидроксихлорохин, нитрофуантоин, метронидазол, стравудин, залцитабин, инфликсимаб, лефлуномид, талидомид, или химиотерапевтического средства, такого как цисплатин, цитарабин, бортезомиб, доцетаксел, леналидомид, мизондиазол, оксалиплатин, паклитаксел, прокарбазин, сурамин, талидомид, винбластин или винкристин, или лекарственного средства против алкоголизма, такого как дисульфирам, или противосудорожного средства, такого как фенитоин или дилантин, или лекарственных препаратов для сердца или регуляции кровяного давления, таких как статины, амиодарон, гидралазин, прокаинамид, пергексиллин, или антибиотика, такого как фторхинолоны, изониазид, ципро, леваквин, флагил или метронидазол, или терапевтических средств против кожных состояний, таких как дапсон. Токсическая нейропатия может быть обусловлена длительным злоупотреблением спирта или токсичностью витамина B<sub>6</sub>.

[0067] В другом аспекте в любом из путей применения в соответствии с настоящим изобретением субъект является больным раком пациентом, страдающим приобретенной нейропатией. Например, у больного раком пациента развилась нейропатия, связанная с дефицитом питательных веществ, побочными эффектами химиотерапии и/или паранеопластическим синдромом.

[0068] В еще одном аспекте в любом из путей применения в соответствии с настоящим изобретением субъект является перенесшим хирургическое вмешательство пациентом, страдающим приобретенной нейропатией. Например, у перенесшего хирургическое вмешательство пациента развилась нейропатия после бариатрического

хирургического вмешательства, нескольких ортопедических процедур или нескольких хирургических вмешательств в отношении "зашемленных нервов".

[0069] В другом аспекте в любом из путей применения в соответствии с настоящим изобретением субъект страдает наследственной миопатией, нервно-мышечным заболеванием, мышечной атрофией, индуцированной лекарственными средствами миопатией, саркопенией, кахексией, атрофией мышечных волокон II типа, генетически обусловленными мышечными дистрофиями, возрастной мышечной атрофией или приобретенным аутоиммунным первичным мышечным нарушением.

[0070] В другом аспекте в любом из путей применения в соответствии с настоящим изобретением субъект страдает мышечной дистрофией Дюшенна, мышечной дистрофией Беккера, миотонической мышечной дистрофией, саркогликанопатиями, миотонической дистрофией, мышечной дистрофией Эмери-Дрейфуса, врожденной мышечной дистрофией, врожденной мышечной дистрофией с дефицитом мерозина, миопатией Бетлема, врожденной мышечной дистрофией Ульриха, лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофией, спинальной мышечной дистрофией, мышечной дистрофией с синдромом ригидного позвоночника, дистальной мышечной дистрофией, окулофарингеальной мышечной дистрофией, врожденной мышечной дистрофией (MDC) 1A, 1B, 1C и 1D; тазово-плечевой мышечной дистрофией (LGMD) 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 2O and 2Q; мышечно-глазо-мозговой болезнью; болезнью Фукуяма с синдромом Уокера-Варбурга; миастеническими синдромами; врожденными миастениями; миопатией с тельцами-включениями; миозитом с тельцами-включениями; дерматомиозитом; центронуклеарной миопатией; миопатией Миоши; митохондриальной миопатией; немалиновой миопатией; миопатией Нонака; миастенией гравис или полимиозитом.

[0071] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие терапевтически эффективное количество нейротрофина-3 (NT-3), pro-NT-3 или их эффективного фрагмента или нуклеиновой кислоты, кодирующей NT-3, pro-NT-3 или их эффективный фрагмент, предназначенные для применения в стимулировании мышечного роста у субъекта. Например, композиции в соответствии с настоящим изобретением составляют для внутримышечного введения.

[0072] В иллюстративном варианте осуществления композиция содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую NT-3, pro-NT-3 или их эффективный фрагмент. В родственных вариантах осуществления нуклеиновая кислота находится в вирусном векторе, таком как вектор на основе аденоассоциированного вируса. В различных вариантах осуществления нуклеиновая кислота функционально связана со специфичным для мышц промотором, таким как тройной промотор специфичной для мышц креатинкиназы. В различных вариантах осуществления композиция содержит нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1.

[0073] В настоящем изобретении также представлены композиции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид NT-3, предназначенные для применения

в лечении связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у субъекта-человека, где: а) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1, б) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1; с) нуклеиновая кислота предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, d) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой любую из нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением, е) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV вводят в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3, f) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, g) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, k) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающей введение посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающей введение посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

[0074] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид NT-3,

предназначенные для применения в улучшении мышечной силы или стимулировании мышечного роста у субъекта-человека, где а) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1, б) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1; с) нуклеиновая кислота предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, d) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой любую из нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением, е) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV вводят в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3, f) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, g) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечного пути введения, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, k) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающей введение посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композицию составляют для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, предусматривающей введение посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

[0075] Например, любая композиция в соответствии с настоящим изобретением может содержать нуклеиновую кислоту, составленную для введения с использованием

вирусного вектора, такого как вектор на основе аденоассоциированного вируса. Кроме того, любая из композиций в соответствии с настоящим изобретением может содержать нуклеиновую кислоту, функционально связанную со специфичным для мышц промотором, таким как специфичный для мышц промотор, представляющий собой промотор специфичной для мышц креатинкиназы (MCK). В другом варианте осуществления в любой из композиций в соответствии с настоящим изобретением scAAV1.tMCK.NTF3 содержит несущую NT-3 генную кассету, представленную в SEQ ID NO: 11.

[0076] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, предназначенные для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, что приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации белка NT-3.

[0077] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3 для стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, что приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации белка NT-3.

[0078] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, предназначенные для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, где композицию составляют для внутримышечного введения, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг.

[0079] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, предназначенные для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, где композицию составляют для внутримышечного введения, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $3 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $8 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $9 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг.

[0080] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, предназначенные для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, где композицию составляют для внутримышечного введения, а вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, причем введение осуществляют в низкой дозе ( $2 \times 10^{12}$  в.

г./кг на пациента) и в высокой дозе ( $6 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента). В некоторых вариантах осуществления композицию вводят с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно (объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл) в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги. В общей сложности будет введено от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0081] В иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, предназначенные для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, где композицию составляют для внутримышечного введения, а вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, причем введение осуществляют в низкой дозе ( $2 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента) и в высокой дозе ( $6 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента) с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно (объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл). В общей сложности будет введено от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0082] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, предназначенные для улучшения мышечной силы у субъекта-человека, где композицию составляют для внутримышечного введения, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг.

[0083] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, предназначенные для улучшения мышечной силы у субъекта-человека, где композицию составляют для внутримышечного введения, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $1,0 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $3 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $5 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $8 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $9 \times 10^{12}$  в. г./кг, или приблизительно  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг.

[0084] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, предназначенные для улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, где композицию составляют для внутримышечного введения, а вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл с осуществлением введения в низкой дозе ( $2 \times 10^{12}$  в. г./кг на

пациента) и в высокой дозе ( $6 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента). В некоторых вариантах осуществления композицию вводят с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно (объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл) в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги. В общей сложности будет введено от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0085] В иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, предназначенные для улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, где композицию составляют для внутримышечного введения, а вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, причем введение осуществляют в низкой дозе ( $2 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента) и в высокой дозе ( $6 \times 10^{12}$  в. г./кг на пациента) с использованием 3-6 инъекций на мышцу соответственно (объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1 мл). В общей сложности будет введено от 5 мл до 14 мл вектора в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу каждой ноги.

[0086] Для любой из композиций в соответствии с настоящим изобретением путь введения scAAV1.tMCK.NTF3 представляет собой внутримышечную билатеральную инъекцию в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу. Кроме того, для любой из композиций в соответствии с настоящим изобретением введение scAAV1.tMCK.NTF3 приводит к улучшенной мышечной силе у субъекта в верхних или нижних конечностях, и, например, улучшение в отношении мышечной силы измеряют как снижение суммарного балла по педиатрической шкале СМТ (СМТPedS). Кроме того, для любой из композиций в соответствии с настоящим изобретением введение композиции приводит к снижению или прекращению прогрессирования заболевания на протяжении двухлетнего периода времени. Прогрессирование заболевания измеряют с помощью СМТPedS. СМТPedS представляет собой 11-компонентную шкалу, включающую функциональный тест на ловкость, тест с девятью отверстиями и стержнями (9HPT), определение силы сжатия рукой, подошвенного сгибания стопы и тыльного сгибания стопы с использованием ручной миометрии, чувствительность к уколу и вибрации, тест Бруининк-Озерецкого с оценкой баланса, оценку походки, прыжок в длину и тест шестиминутной ходьбы (6MWT). Эффективность определяют как прекращение снижения способностей, измеренное по этой шкале, через 2 года после переноса гена.

[0087] В аспекте настоящего изобретения в отношении любой из композиций субъект страдает наследственными нейропатиями, как например нейропатия Шарко-Мари-Тута (СМТ), например, СМТ1А, СМТ2К, СМТ4А, СМТ3А, и аксональной и демиелинизирующей нейропатиями, обусловленными аутосомно-рецессивным генным вариантом, или аутосомно-доминантным генным вариантом, или Х-сцепленным генным

вариантом. Наследственная нейропатия может быть обусловлена любым из генных вариантов, представленных в таблице 1. Кроме того, наследственная нейропатия может представлять собой транстиретиновые амилоидные нейропатии, обусловленные мутацией в гене транстиретина (TTR), как например следующие генные варианты: Val30Met, Ile107Val и Ser77Tyr.

[0088] В другом аспекте настоящего изобретения в отношении любой из композиций субъект страдает приобретенной нейропатией с потерей аксонов и/или нарушенной регенерацией нервов. Приобретенная нейропатия является периферической нейропатией, обусловленной любым нарушением или заболеванием, которое обуславливает нейропатию. Например, субъект страдает периферической нейропатией, обусловленной сахарным диабетом, инфекцией вирусом иммунодефицита человека (HIV), нарушением щитовидной железы, таким как гипотиреоз, гипогликемией, уремией, почечной недостаточностью, печеночной дисфункцией, печеночной недостаточностью, полицитемией, нарушениями соединительной ткани, раком, болезнью Лайма, целиакией, лепрой, порфирией, синдромом Шегрена, полиомиелитом, акромегалией, нарушениями липидного/гликолипидного метаболизма, синдромом Западного Нила, амилоидозом, митохондриальными нарушениями, диспротеинемическими нарушениями, такими как моноклональная гаммапатия неустановленной этиологии (MGUS) или синдром POEMS. Субъект страдает дефицитами питательных веществ/витаминов, такими как дефицит витамина B<sub>12</sub>, дефицит витамина E или дефицит меди.

[0089] Кроме того, в отношении любой из композиций в соответствии с настоящим изобретением субъект страдает аутоиммунной периферической полинейропатией, острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулонейропатией (AIDP), хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулонейропатией (CIDP), васкулитным множественным мононевритом, паранейропатией, идиопатическим ганглионитом, амиотрофическим латеральным склерозом, мультифокальной моторной нейропатией с блокадой проводимости или синдромом нижнего мотонейрона.

[0090] В отношении любой из композиций в соответствии с настоящим изобретением приобретенная нейропатия является токсической нейропатией. Например, токсическая нейропатия является результатом токсического эффекта назначенного лекарственного препарата, такого как хлорамфеникол, хлорохин, колхицин, дисульфирам, этанерцепт, этамбутол, золото, гидроксихлорохин, нитрофуантоин, метронидазол, стравудин, залцитабин, инфликсимаб, лефлуномид, талидомид, или химиотерапевтического средства, такого как цисплатин, цитарабин, бортезомиб, доцетаксел, леналидомид, мизондиазол, оксалиплатин, паклитаксел, прокарбазин, сурамин, талидомид, винбластин или винкристин, или лекарственных средств против алкоголизма, таких как дисульфирам, или противосудорожных средств, таких как фенитоин или дилантин, или лекарственных препаратов для сердца или регуляции кровяного давления, таких как статины, амиодарон, гидралазин, прокаинамид, пергексиллин, или антибиотика, такого как фторхинолоны, изониазид, ципро, леваквин, флагил или метронидазол, и

терапевтических средств против кожных состояний, таких как дапсон. Токсическая нейропатия также обуславливается длительным злоупотреблением спирта или токсичностью витамина В<sub>6</sub>.

[0091] В другом аспекте настоящего изобретения в отношении любой из композиций субъект является больным раком пациентом, страдающим приобретенной нейропатией. Например, у больного раком пациента развилась нейропатия, связанная с дефицитом питательных веществ, побочными эффектами химиотерапии и/или паранеопластическим синдромом.

[0092] В еще одном аспекте настоящего изобретения в отношении любой из композиций субъект является перенесшим хирургическое вмешательство пациентом, страдающим приобретенной нейропатией. Например, у перенесшего хирургическое вмешательство пациента развилась нейропатия после бариатрического хирургического вмешательства, нескольких ортопедических процедур или нескольких хирургических вмешательств в отношении "защемленных нервов".

[0093] В другом аспекте настоящего изобретения, в отношении любой из, субъект страдает наследственной миопатией, нервно-мышечным заболеванием, мышечной атрофией, индуцированной лекарственными средствами миопатией, саркопенией, кахексией, атрофией мышечных волокон II типа, генетически обусловленными мышечными дистрофиями, возрастной мышечной атрофией или приобретенным аутоиммунным первичным мышечным нарушением.

[0094] В другом аспекте настоящего изобретения в отношении любой из композиций субъект страдает мышечной дистрофией Дюшенна, мышечной дистрофией Беккера, миотонической мышечной дистрофией, саркогликанопатиями, миотонической дистрофией, мышечной дистрофией Эмери-Дрейфуса, врожденной мышечной дистрофией, врожденной мышечной дистрофией с дефицитом мерозина, миопатией Бетлема, врожденной мышечной дистрофией Ульриха, лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофией, спинальной мышечной дистрофией, мышечной дистрофией с синдромом ригидного позвоночника, дистальной мышечной дистрофией, окулофарингеальной мышечной дистрофией, врожденной мышечной дистрофией (MDC) 1A, 1B, 1C и 1D; тазово-плечевой мышечной дистрофией (LGMD) 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 2O and 2Q; мышечно-глазо-мозговой болезнью; болезнью Фукуяма с синдромом Уокера-Варбурга; миастеническими синдромами; врожденными миастениями; миопатией с тельцами-включениями; миозитом с тельцами-включениями; дерматомиозитом; центронукулярной миопатией; миопатией Миоши; митохондриальной миопатией; немалиновой миопатией; миопатией Нонака; миастенией гравис или полимиозитом.

[0095] В другом аспекте настоящего изобретения в отношении любой из композиций субъект страдает травматическими повреждениями нервов, такими как повреждения нервов, вызванные компрессией, двойным сдавливанием или рассечением.

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0096] Более легкое понимание настоящего изобретения может быть обеспечено посредством ссылки на следующие графические материалы.

[0097] На **фигурах 1A-C** представлены графики и изображения, демонстрирующие индуцированное AAV1.NT-3 ремоделирование типов волокон в мышце TrJ. Репрезентативные изображения срезов окрашенной SDH ткани икроножной мышцы, обработанных AAV1.tMCK.NT-3 Trembler J (TrJ) (фиг. 1A) и необработанных (TrJ-PBS) (фиг. 1B) через 16 недель после инъекции. Показаны медленносокращающиеся окислительные (STO, стрелки), быстросокращающиеся окислительные (FTO, стрелка-указатель) и быстросокращающиеся гликолитические (FTG, звездочка) мышечные волокна (фиг. 1B). Количество окислительных мышечных волокон снижено в. В мышце TrJ-PBS (фиг. 1B), присутствуют повышенные количества тонких STO-волокон и ангулярных волокон всех типов волокон наряду с группировками тонкого типа в соответствии с нейрогенными изменениями. Масштабная линейка=30 мкм для a, b. Переключение типов волокон с STO- на FTO/FTG-волокон в мышце TrJ при направленной на NT-3 генной терапии (фиг. 1C). Средний процент STO (полученный от n=3-5 мышечных групп в каждой группе) в обеих группах с обработкой не отличался значительно от мышцы дикого типа (WT), что указывает на изменение в направлении нормализации распределения типов волокон с NT-3 в нейрогенной мышце TrJ.

[0098] На **фигурах 2A-C** представлены графики и изображения, демонстрирующие эффект обработки с помощью AAV1.NT3 в отношении передачи сигнала mTOR и метаболических маркеров. Репрезентативные изображения вестерн-блоттинга и анализа мишеней mTOR, Phospho (P)-4EBP1 (Thr37/46) и P-S6 (Ser235/236) в икроножных мышцах TrJ (фиг. 2A) и дикого типа (WT) (фиг. 2B) через 16 недель после инъекции. Графики показывают уровни экспрессии фосфорилированной формы белков, нормализованные по GAPDH. Мембраны, окрашенные кумасси синим, представляют одинаковую загрузку геля. Планки погрешностей предусматривают  $\pm$  SEM; n=5-6 в каждой группе, \*P < 0,05, непарный t-критерий. (Фиг. 2C). Относительная экспрессия гликолитических (1-1K1 и PK1) и окислительных регуляторов (PGC1 $\alpha$ ) по результатам qPCR; GAPDH использовали как ген домашнего хозяйства. Планки погрешностей предусматривают  $\pm$  SEM; n=5-6 в каждой группе, \*P < 0,05, однофакторный Anova с последующим критерием множественного сравнения Тьюки.

[0099] На **фигурах 3A-D** представлены графики и изображения, демонстрирующие непосредственный эффект NT-3 в отношении миотрубочек. (Фиг. 3A). Репрезентативные изображения вестерн-блоттинга и анализа сигнального пути Akt/mTOR, Phospho (P)-Akt (Ser473), P-4EBP1 (Thr37/46) и P-S6 (Ser235/236) в миотрубочках, инкубированных с рекомбинантным человеческим NT-3 (100 нг/мл) или PBS (контроль) в течение 30 минут. Значения плотности полос фосфорилированного белка нормализовали по GAPDH и представляли в процентах от контрольной группы. Мембрана, окрашенная кумасси синим, представляет одинаковую загрузку геля. Миотрубочки инкубировали с NT-3 (100 нг/мл) в течение 48 часов, затем выявляли относительную экспрессию мРНК метаболических

маркеров (PGC1a, HK1, PK1) с помощью qPCR (фиг. 3B), а также выявляли потребление глюкозы относительно продуцирования лактата в среде клеточной культуры с помощью ELISA (фиг. 3C). (Фиг. 3D). Относительные уровни экспрессии рецепторов миогенина и NT-3, P75<sup>NTR</sup> и TrkC в миобластах по сравнению с миотрубочками после обработки NT-3 (100 нг/мл) в течение 48 часов. GAPDH использовали как ген домашнего хозяйства в анализах. Результаты представлены как среднее  $\pm$  SEM для по меньшей мере трех независимых экспериментов, \*P < 0,05, двусторонний парный критерий Стьюдента.

[00100] На **фигуре 4** представлен график, демонстрирующий уровни NT-3 в сыворотке крови у обработанных и необработанных мышей. В конечной точке сыворотку крови собирали у каждой мыши и выявляли уровни NT-3 в кровообращении с помощью ELISA.

[00101] На **фигуре 5** показана относительная экспрессия мРНК P75<sup>NTR</sup> и TrkC в икроножной мышце TrJ и WT. GAPDH использовали как ген домашнего хозяйства в анализах. Результаты представлены как среднее  $\pm$  SEM для по меньшей мере трех независимых экспериментов, \*P < 0,05, двусторонний критерий Стьюдента.

[00102] На **фигуре 6** представлена схема конструкции AAV.tMCK.NTF3 (SEQ ID NO: 11). Вектор содержит специфичный для мышц промотор tMCK (SEQ ID NO: 3), химерный интрон (SEQ ID NO: 5), консенсусную последовательность Козак (SEQ ID NO: 6), κДНК NTF3 (SEQ ID No: 1) и сигнал полиаденилирования (SEQ ID NO: 7).

[00103] На **фигуре 7** представлена рестрикционная карта и анализ ORF pAAV.tMCK.NTF3.

[00104] На **фигурах 8A - 8B** указано местоположение в/м инъекции AAV.tMCK.NTF3 у субъектов-людей.

[00105] На **фигуре 9** представлена нуклеотидная последовательность AAV.tMCK.NTF3 (SEQ ID NO: 11).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00106] Исследовали индуцированное обработкой AAV.NT-3 увеличение размера волокон в мышце TrJ, чтобы определить, является ли это увеличение исключительно следствием реиннервации, или же NT-3 оказывает прямое влияние на синтез мышечного белка, который не зависит от регенерации нервов и тем самым может обеспечить увеличение размера мышечных волокон.

[00107] В настоящем документе раскрывается новый эффект NT-3, его способность непосредственно влиять на синтез белка и метаболическое ремоделирование в нейрогенной мышце.

[00108] В работе, описываемой в настоящем документе, сначала оценивали эффекты генной терапии на основе AAV.NT-3 в отношении окислительного состояния мышцы TrJ через 16 недель после инъекции гена и выявили, что увеличение размера мышечных волокон было связано с изменением окислительного состояния мышечных волокон в направлении нормализации отношения типов волокон, наблюдаемого в WT. Обработка приводила к снижению процента медленносокращающихся окислительных (STO) волокон,

в то время как популяции быстросокращающихся окислительных и гликолитических (FTO и FTG) волокон увеличились, отражая изменение на противоположный паттерна, наблюдаемого в необработанной мышце TrJ. Индуцированное NT-3 увеличение размера волокна было наиболее заметным для популяции FTG-волокон. Затем исследовали, играет ли активация комплекса 1 мишени рапамицина у млекопитающих (mTORC1) роль в индуцированном NT-3 синтезе мышечного белка с особым акцентом на преимущественный радиальный рост гликолитических волокон. mTORC1 регулирует трансляцию и рибосомный биогенез посредством фосфорилирования регуляторов трансляции эукариотического фактора инициации трансляции 4E-связывающего белка 1 (4E-BP1) и S6 киназы 1 (S6K1). Laplante M, Sabatini D., *Cell*, 149(2):274-293 (2012). Более того, mTORC1 связан с активацией клеточного гликолиза, что предусматривает повышенную трансляцию гликолитических ферментов или их регуляторов транскрипции. Duvel et al., *Molecular cell*, 39(2):171-183 (2010). Выяснили, что гистохимические изменения в мышце TrJ сопровождались повышенными уровнями фосфорилирования 4E-BP1 и белка S6 (S6P) в качестве свидетельства активации mTORC1. Одновременно с этим уровни экспрессии регулятора митохондриального биогенеза (коактиватора 1a, активируемого пролифератором пероксисом рецептора  $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ ) и маркеров гликолиза (гексокиназы-1, HK1, и пируваткиназы 1, PK1) увеличивались в мышце TrJ. Эти изменения не были значительными в мышце WT, обработанной AAV.NT-3. Кроме того, исследования *in vitro* показали, что рекомбинантный NT-3 может напрямую индуцировать активацию сигнального пути Akt/mTOR в миотрубочках, экспрессирующих TrkC, но не в миообластах. Более того, уровни экспрессии миогенина были значительно более высокими в миотрубочках, тогда как экспрессия p75NTR была пониженной по сравнению с миообластами, что указывает на то, что индуцированная NT-3 дифференцировка миообластов связана с активацией mTORC1.

[00109] Результаты, описанные в настоящем документе, имеют много предпосылок для потенциального применения NT-3, причем не только для лечения нейропатий с положительным эффектом как для нерва, так и для мышцы, но также и для связанных с истощением мышечной ткани состояний, включая старение, раковую кахексию или атрофию мышечных волокон II типа, а также генетические или приобретенные аутоиммунные первичные мышечные нарушения, связанные с нарушенной фазой радиального роста при регенерации, в которую могут быть вовлечены нарушения в передаче сигнала mTORC1 и дефектный митохондриальный биогенез.

[00110] В настоящем изобретении представлены способы стимулирования мышечного роста у субъекта. Способ включает введение терапевтически эффективного количества нейротрофина-3 (NT-3), pro-NT-3 или их эффективного фрагмента или нуклеиновой кислоты, кодирующей NT-3, pro-NT-3 или их эффективный фрагмент, нуждающемуся в этом субъекту. Субъекты, нуждающиеся в стимулировании мышечного роста, включают субъектов с мышечной дистрофией или мышечной атрофией.

[00111] В настоящем изобретении представлен способ подавления истощения

мышечной ткани, включающий введение AAV-вектора для доставки кодирующего нейротрофин-3 (NT-3) гена *NTF3*. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к геннотерапевтическим способам лечения типа 1А болезни Шарко-Мари-Тута (СМТ1А), где кодирующий NT-3 ген *NTF3* доставляют субъекту с использованием типа 1 самокомплементарного аденоассоциированного вируса (scAAV) под контролем специфичного для мышц промотора tMCK. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к геннотерапевтическим способам повышения мышечной силы у нуждающихся в этом субъектов, например субъектов с диагнозом связанных с истощением мышечной ткани нарушений, как например СМТ, или страдающих ими.

[00112] Доклинические исследования показали, что доставка конструкции AAV1.tMCK.NTF3 в икроножную мышцу мышей Trembler J 9 (Tr<sup>J</sup>), встречающейся в природе мышинной модели СМТ1, улучшала регенерацию нервов, миелинизацию, плотность миелинизированных волокон, амплитуду суммарного мышечного потенциала действия при стимуляции седалищного нерва и функциональные характеристики при тестировании с вращающимся стержнем и силу захвата задних конечностей (см. пример 3).

[00113] Используемые в настоящем документе термины "лечение", "осуществление лечения" и подобные относятся к получению желаемого фармакологического или физиологического эффекта. Эффект может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. "Лечение", как используется в настоящем документе, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, особенно у человека, и может предусматривать подавление заболевания или состояния, т. е. прекращение его развития, и облегчение заболевания, т. е. инициирование регрессии заболевания.

[00114] "Предупреждение", как используется в настоящем документе, относится к любому действию, обеспечивающему полезный эффект в отношении субъекта, подверженного риску развития состояния или заболевания, таких как нейропатия, демиелинизирующая полинейропатия, связанные с истощением мышечной ткани нарушения или атрофия.

[00115] "Фармацевтически приемлемый", как используется в настоящем документе, означает, что соединение или композиция является подходящим для введения субъекту, применительно к способам, описываемым в настоящем документе, без чрезмерно вредных побочных эффектов в свете тяжести заболевания и необходимости лечения.

[00116] Термины "терапевтически эффективное" и "фармакологически эффективное" предназначены для определения количества средства, которое позволит достичь цели в отношении снижения тяжести заболевания и частоты заболеваемости. Эффективность лечения может быть измерена путем оценки уменьшения симптомов у субъекта в ответ на введение NT-3.

[00117] Термин "эффективный фрагмент" относится к части полинуклеотидной последовательности, кодирующей функциональный фрагмент полипептида NT-3. Термин "эффективный фрагмент" также относится к части аминокислотной последовательности

полипептида NT-3, которая сохраняет активность фактора роста NT-3. Иллюстративные формы активности фактора роста NT-3 включают поддержку выживания и дифференцировки существующих нейронов и индуцирование и поддержку роста и дифференцировки новых нейронов и синапсов. Кроме того, активность NT-3 предусматривает стимулирование мышечного роста и мышечной функции.

[00118] Используемый в настоящем документе термин "диагноз" может охватывать определение вероятности того, что у субъекта разовьется заболевание, или наличия или характера заболевания у субъекта. Используемый в настоящем документе термин "диагноз" также охватывает определение тяжести и вероятного исхода заболевания или эпизода заболевания или шансов на выздоровление, что обычно называют прогнозом). "Диагноз" также может охватывать диагноз в контексте рациональной терапии, при которой диагноз направляет терапию, в том числе первоначальный выбор терапии, модификацию терапии (например, корректировку дозы или режима введения дозы) и т. п.

[00119] "Субъект", как используется в настоящем документе, может предусматривать любое животное, а также может относиться к пациенту. Предпочтительно субъект представляет собой позвоночное животное, и более предпочтительно субъект представляет собой млекопитающее, такое как одомашненное сельскохозяйственное животное (например, корова, лошадь, свинья) или домашнее животное (например, собака, кошка). В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

[00120] Термин "полинуклеотид" или "молекула нуклеиновой кислоты" относится к полимерной форме нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований. Термин включает молекулы ДНК (например, eDNA или геномную или синтетическую ДНК) и молекулы РНК (например, мРНК или синтетическую РНК), а также аналоги ДНК или РНК, содержащие не встречающиеся в природе нуклеотидные аналоги, ненативные межнуклеозидные связи или и то и другое. Нуклеиновая кислота может находиться в любой топологической конформации. Например, нуклеиновая кислота может быть одонитевой, двухнитевой, трехнитевой, в форме квадруплекса, частично двухнитевой, разветвленной, шпилечной, кольцевой или в "запертой" конформации.

[00121] Термин "ген", используемый в настоящем документе, относится к нуклеотидной последовательности, которая может направлять синтез фермента или другой молекулы полипептида (например, может содержать кодирующие последовательности, например, непрерывную открытую рамку считывания (ORF), которая кодирует полипептид), или может сама по себе быть функциональной в организме. Ген в организме может быть кластеризован в опероне, как определено в настоящем документе, при этом оперон отделен от других генов и/или оперонов межгенной ДНК. Отдельные гены, содержащиеся в опероне, могут перекрываться без наличия межгенной ДНК между отдельными генами.

[00122] Используемый в настоящем документе термин "AAV" представляет собой стандартное сокращение для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой парвовирус с одонитевой ДНК, который размножается только в

клетках, в которых присутствуют определенные функциональные элементы, предоставляемые коинфицирующим вирусом-помощником. В настоящее время охарактеризовано тринадцать серотипов AAV. Общую информацию и обзоры в отношении AAV можно найти, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228 и 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 сходные свойства репликации, опосредованной гомологичными генами гер; и все они несут три родственных капсидных белка, как например экспрессируемые в AAV2. Степень родства дополнительно подтверждается гетеродуплексным анализом, в котором обнаруживается обширная перекрестная гибридизация между серотипами по всей длине генома, и наличием аналогичных самоотжигающихся сегментов на концах, которые соответствуют "последовательностям инвертированных концевых повторов" (ITR). Подобные паттерны инфекционности также дают основание предполагать, что функциональные элементы репликации в каждом серотипе находятся под сходным регуляторным контролем.

[00123] Термин "вектор" или "вектор экспрессии" относится к любому типу генетической конструкции, предусматривающей нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК, способную транскрибироваться. Векторы экспрессии могут содержать ряд различных контрольных последовательностей, структурных генов (например, представляющих интерес генов), а также последовательностей нуклеиновых кислот, которые выполняют другие функции.

[00124] Под "вектором" подразумевается молекула ДНК, обычно происходящая из плазмиды или бактериофага, в которую могут быть вставлены или встроены фрагменты ДНК. Рекомбинантный вектор будет содержать один или несколько уникальных сайтов рестрикции и может быть способен к автономной репликации в определенном организме-хозяине или организме-носителе, вследствие чего встроенная последовательность становится воспроизводимой. Вектор содержит промотор, функционально связанный с геном или кодирующей областью, вследствие чего при трансфекции в клетку-реципиента обеспечивается экспрессия РНК.

[00125] "AAV-вектор", как используется в настоящем документе, относится к вектору, содержащему один или несколько представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевых повторов (ITR) AAV. Такие AAV-векторы 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.

[00126] "Вирион AAV", или "вирусная частица AAV", или "векторная частица AAV" относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка

AAV и инкапсидированного полинуклеотидного AAV-вектора. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т. е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, подлежащий доставке в клетку млекопитающего), ее обычно называют "векторной частицей AAV" или просто "AAV-вектором". Таким образом, получение векторной частицы AAV обязательно предусматривает получение AAV-вектора, поскольку такой вектор содержится в векторной частице AAV.

[00127] Используемый в настоящем документе термин "приблизительно" относится к отклонению +/- 10% от базового значения.

[00128] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

### **Генная терапия периферической нейропатии**

[00129] В одном аспекте в настоящем изобретении представлены способы лечения субъекта с мышечной атрофией с использованием генной терапии.

[00130] Векторы, которые можно использовать для доставки терапевтической нуклеиновой кислоты, включают вирусные и невирусные векторы. Подходящие векторы, которые можно использовать, предусматривают аденовирус, аденоассоциированный вирус, ретровирус, лентивирус, HSV (вирус простого герпеса) и плазмиды. Преимущество векторов на основе вируса простого герпеса заключается в их естественном тропизме в отношении сенсорных нейронов. Однако векторы на основе аденоассоциированного вируса являются наиболее популярными из-за их низкого риска инсерционного мутагенеза и иммуногенности, отсутствия у них эндогенных вирусных генов и их способности продуцироваться с высоким титром. Kantor et al. рассмотрели ряд различных способов переноса генов в центральную нервную систему, в то время как Goins et al. описали способы генной терапии для лечения хронической боли, ассоциированной с периферической нервной системой. См. Kantor et al., *Adv Genet.* 87, 125-197 (2014), и Goins et al., *Neurobiol. Dis.* 48(2), 255-270 (2012), раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки. В частности, сообщалось об успешной доставке генов в шванновские клетки, резидентные глиальные клетки периферических нервов с использованием различных вирусных векторов. Mason et al., *Curr. Gene Ther.* 11, 75-89 (2011). Если вектор предусматривает вирусный вектор и вектор был упакован, то вирионы могут быть использованы для инфицирования клеток. Если используется голая ДНК, то могут применяться процедуры трансфекции или трансформации, которые подходят для конкретных клеток-хозяев. Составы на основе голой ДНК с использованием полимеров, липосом или наносфер могут быть использованы для доставки генов. Нуклеиновые кислоты можно вводить в любом желаемом формате, который обеспечивает достаточно эффективные уровни доставки, в том числе в вирусных частицах, в липосомах, в наночастицах и в комплексе с полимерами.

[00131] Нуклеиновую кислоту (например, кДНК или трансген), кодирующую ген, экспрессия которого уменьшает периферическую нейропатию, можно встраивать в кассету

экспрессии, которая имеет регуляторный элемент, такой как промотор (конститутивный или регулируемый), предназначенный для управления экспрессией трансгена, и последовательность полиаденилирования, расположенную в направлении 3'-конца от нуклеиновой кислоты. Например, можно использовать регуляторные элементы, которые являются 1) специфическими для ткани или области организма; 2) конститутивными и/или 3) индуцибельными/регулируемыми.

[00132] В некоторых вариантах осуществления используют специфичные для мышц регуляторные элементы. Специфичные для мышц регуляторные элементы включают в себя специфичные для мышц промоторы, в том числе промотор мышечной креатинкиназы (МСК) млекопитающих, промотор десмина млекопитающих, промотор тропонина I (TNNI2) млекопитающих или промотор альфа-актина скелетных мышц (ASKA) млекопитающих. Специфичные для мышц энхансеры, применимые в настоящем изобретении, выбраны из группы, состоящей из энхансера МСК млекопитающих, энхансера DES млекопитающих и энхансера IRE тропонина I позвоночных (IRE TNI, в настоящем документе далее упоминаемого как FIRE). Один или несколько из этих специфичных для мышц энхансерных элементов могут быть использованы в комбинации со специфичным для мышц промотором в соответствии с настоящим изобретением для обеспечения тканеспецифичного регуляторного элемента.

[00133] Предпочтительным вектором для применения при лечении мышечной атрофии с помощью генной терапии является AAV. AAV-опосредованная доставка генов стала эффективным и безопасным инструментом как в доклинических, так и в клинических исследованиях неврологических нарушений. Ojala et al., *Neuroscientist*, 21(1):84-98 (2015). В настоящее время AAV является наиболее широко используемым вектором для клинических испытаний в отношении неврологических нарушений, и в ходе клинических испытаний никогда не сообщалось о побочных эффектах, связанных с использованием этого вектора. Аденоассоциированный вирус является непатогенным представителем рода *Dependovirus* из семейства *Parvoviridae*, которому для выполнения своего жизненного цикла требуются вспомогательные функциональные элементы от других вирусов, таких как аденовирус или вирус простого герпеса. AAV дикого типа (WT) характеризуется геномом в виде одонитевой ДНК (ssDNA) с инвертированными концевыми повторами (ITR) на обоих концах, составляющей примерно 5 т. п. н., окруженной капсидом.

[00134] Аденовирусные векторы для применения в доставке трансгенов в клетки в таких вариантах применения, как генная терапия *in vivo* и исследование *in vitro* и/или получение продуктов трансгенов, обычно получают из аденовирусов путем удаления генов ранней области 1 (E1) (Berkner, K. L., *Curr. Top. Micro. Immunol.* 158 L39-66 1992). Удаление генов E1 делает такие аденовирусные векторы дефектными по репликации и значительно снижает экспрессию оставшихся вирусных генов, присутствующих в векторе. Рекомбинантные аденовирусные векторы имеют несколько преимуществ для применения в качестве носителей для доставки генов, включая тропизм в отношении как делящихся, так и неделящихся клеток, минимальный патогенный потенциал, способность реплицироваться

до высокого титра для получения исходных растворов векторов и способность нести большие вставки. Однако считается, что присутствие оставшихся вирусных генов в аденовирусных векторах может быть вредным.

[00135] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления аденовирусные векторы имеют делеции различных аденовирусных генных последовательностей. В частности, псевдоаденовирусные векторы (PAV), также известные как "выпотрошенный аденовирус" или миниаденовирусные векторы, представляют собой аденовирусные векторы, полученные из генома аденовируса, которые содержат минимальные действующие в цис-положении нуклеотидные последовательности, необходимые для репликации и упаковки векторного генома, и которые могут содержать один или несколько трансгенов (см. патент США № 5882877, в котором описываются псевдоаденовирусные векторы (PAV) и способы получения PAV, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Такие PAV, которые могут вмещать до приблизительно 36 т. п. н. чужеродной нуклеиновой кислоты, являются преимущественными, поскольку оптимизируется несущая способность вектора, в то время как потенциал для иммунных ответов хозяина на вектор или генерации компетентных к репликации вирусов снижается. Векторы PAV содержат нуклеотидные последовательности 5'-концевого инвертированного концевого повтора (ITR) и 3'-ITR, которые содержат точку начала репликации, и действующую в цис-положении нуклеотидную последовательность, необходимую для упаковки генома PAV, и могут вмещать один или несколько трансгенов с подходящими регуляторными элементами, например, промотором, энхансерами и т. д.

### **AAV**

[00136] Геномы рекомбинантных AAV в соответствии с настоящим изобретением предусматривают молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и один 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 без ограничения серотипы AAV 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 (см., например, Gao et al., PNAS, 99:11854-11859 ((2002) и *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003). Кроме того, псевдотипированные AAV-векторы также могут быть использованы в способах, описанных в настоящем документе. Псевдотипированные AAV-векторы представляют собой векторы, которые содержат геном одного серотипа AAV в капсиде второго серотипа AAV; например, AAV-вектор, который содержит капсид AAV2 и геном AAV1, или AAV-вектор, который содержит капсид AAV5 и геном AAV2. (Auricchio et al., (2001) *Hum. Mol. Genet.*, 10 (26):3075-81). Получение псевдотипированного rAAV раскрыто, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с капсидными мутациями. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Как отмечено в разделе "Предпосылки изобретения" выше, в уровне техники известны нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV. Для

способствования специфической для скелетных мышц экспрессии можно использовать AAV1, AAV6, AAV8 или AAVrh.74.

[00137] ДНК-плазмиды в соответствии с настоящим изобретением содержат геномы гAAV в соответствии с настоящим изобретением. ДНК-плазмиды переносят в клетки, для которых допустимо инфицирование вирусом-помощником AAV (например, аденовирусом, E1-делетированным аденовирусом или вирусом герпеса), для сборки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Методики получения частиц гAAV, в которые геном AAV подлежит упаковке, гены гер и сар и функциональные элементы вируса-помощника, предоставляемые клетке, являются стандартными в данной области техники. Получение гAAV требует, чтобы в одной клетке (называемой в настоящем документе упаковывающей клеткой) присутствовали следующие компоненты: геном гAAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV (т. е. не находящиеся в таковом), и функциональные элементы вируса-помощника. Гены гер и сар AAV могут происходить из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут происходить из серотипа AAV, отличного от серотипа ITR генома гAAV, включая без ограничения 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. Получение псевдотипированного гAAV раскрыто, например, в WO 01/83692, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00138] Способ создания упаковывающей клетки заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для продуцирования частиц AAV. Например, плазмиду (или несколько плазмид), содержащую геном гAAV, в котором отсутствуют гены гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, находящиеся отдельно от генома гAAV, и селективируемый маркер, такой как ген устойчивости к неомизину, интегрируют в геном клетки. Геномы AAV вводили в бактериальные плазмиды с помощью процедур, таких как образование хвостов GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) или путем прямого лигирования тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Затем линию упаковывающих клеток инфицируют вирусом-помощником, таким как аденовирус. Преимущества этого способа заключаются в том, что клетки характеризуются возможностью селекции и подходят для крупномасштабного получения гAAV. В других примерах подходящих способов используют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки.

[00139] Общие принципы получения гAAV рассматриваются, например, в Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539 и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Различные подходы описаны в Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988) и Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); 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. (1995) *Vaccine* 13:1244-1250; Paul et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:609-615; Clark et al. (1996) *Gene Therapy* 3:1124-1132; патенте США № 5786211; патенте США № 5871982 и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы тем самым включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте с особым акцентом на те разделы документов, которые относятся к получению гAAV.

[00140] Таким образом, настоящее изобретение относится к упаковывающим клеткам, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном варианте осуществления упаковывающие клетки могут быть стабильно трансформированными раковыми клетками, такими как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная 293 линия). В другом варианте осуществления упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такие как клетки 293 с низким пассажем (человеческие эмбриональные почечные клетки, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты человеческого плода), клетки WI-38 (фибробласты человеческого плода), клетки Vero (почечные клетки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода резуса).

[00141] Рекомбинантный AAV (т. е. инфекционные инкапсидированные частицы гAAV) в соответствии с настоящим изобретением содержит геном гAAV. В иллюстративных вариантах осуществления геномы обоих гAAV лишены ДНК гер и сар AAV, то есть ДНК гер или сар AAV между ITR геномов отсутствует. Примеры гAAV, которые могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, изложены в международной патентной заявке № PCT/US2012/047999 (WO 2013/016352), включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00142] гAAV может быть очищен стандартными в данной области способами, такими как колоночная хроматография или градиенты хлорида цезия. Способы очистки векторов гAAV от вируса-помощника известны в уровне техники и включают в себя способы, раскрытые, например, в Clark et al., *Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, *Methods Mol. Med.*, 69 427-443 (2002); патенте США № 6566118 и WO 98/09657.

[00143] В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает композиции, содержащие гAAV в соответствии с настоящим изобретением. Композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат гAAV и фармацевтически приемлемые носитель. Композиции также могут содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и вспомогательные средства. Приемлемые носители, разбавители и вспомогательные средства являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозировках и концентрациях, и они включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат или другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как

аскорбиновая кислота; низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, плуроники или полиэтиленгликоль (PEG).

[00144] Титры гAAV, подлежащего введению в способах в соответствии с настоящим изобретением, будут варьировать в зависимости, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивидуума и целевого типа(ов) клеток, и они могут быть определены стандартными в данной области техники способами. Титры гAAV могут находиться в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1 \times 10^9$ , приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1 \times 10^{13}$  до приблизительно  $1 \times 10^{14}$  или больше устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (в. г.).

[00145] Способы трансдукции целевой клетки гAAV *in vivo* или *in vitro* предусматриваются настоящим изобретением. Способы *in vivo* включают стадию введения эффективной дозы или многократных эффективных доз композиции, содержащей гAAV в соответствии с настоящим изобретением, нуждающемуся в этом животному (в том числе человеку). Если дозу вводят до развития нарушения/заболевания, то введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития нарушения/заболевания, то введение является терапевтическим. В вариантах осуществления изобретения эффективная доза представляет собой дозу, которая уменьшает (устраняет или снижает) по меньшей мере один симптом, связанный с нарушением/болезненным состоянием, подлежащим лечению, которая замедляет или предотвращает прогрессирование до нарушения/болезненного состояния, которая замедляет или предотвращает прогрессирование нарушения/болезненного состояния, которая уменьшает степень заболевания, которая приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или которая продлевает выживаемость.

[00146] В частности, фактическое введение гAAV в соответствии с настоящим изобретением может быть осуществлено с использованием любого физического способа, который будет обеспечивать транспортировку рекомбинантного вектора гAAV в целевую ткань животного. Введение в соответствии с настоящим изобретением включает без ограничения инъекцию в мышцу, кровотоки и/или непосредственно в печень. Было показано, что простого повторного суспендирования гAAV в забуференном фосфатом солевом растворе достаточно для обеспечения среды-носителя, применимого для экспрессии в мышечной ткани, и не имеется каких-либо известных ограничений в отношении носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с гAAV (хотя композиций,

которые разрушают ДНК, следует избегать при использовании гAAV в обычном порядке). Капсидные белки гAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы гAAV был нацелен на конкретную представляющую интерес целевую ткань, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных составов или местных составов, подлежащих доставке в мышцы путем трансдермального переноса. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для трансдермального переноса были разработаны ранее и могут быть использованы в практическом осуществлении настоящего изобретения. гAAV можно применять совместно с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и использования.

[00147] Трансдукция может быть осуществлена с помощью генных кассет, содержащих тканеспецифичные контролирующие элементы. Например, в одном варианте осуществления настоящего изобретения представлены способы трансдукции мышечных клеток и мышечных тканей, управляемой специфичными для мышц контролируемыми элементами, включая без ограничения таковые, которые происходят из семейств генов актина и миозина, например, из семейства генов *myoD* [см. Weintraub *et al.*, *Science*, 251: 761-766 (1991)], фактор MEF-2, связывающийся с энхансером, специфическим в отношении миоцитов [Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)], контролирующие элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека [Muscat *et al.*, *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], гена актина сердечной мышцы, элементы последовательности мышечной креатинкиназы [см. Johnson *et al.*, *Mol Cell Biol*, 9:3393-3399 (1989)] и энхансерный элемент креатинкиназы мышцы (mCK), контролирующие элементы, происходящие из гена тропонина С быстросокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленносокращающихся волокон сердечной мышцы и гена тропонина I медленносокращающихся волокон: индуцируемых гипоксией ядерных факторов (Semenza *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5680-5684 (1991)), индуцируемые стероидами элементы и промоторы, включая глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993)), а также другие контролирующие элементы.

[00148] Мышечная ткань является привлекательной мишенью для *in vivo* доставки ДНК, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. Настоящее изобретение охватывает устойчивую экспрессию miRNA в трансдуцированных мышечных волокнах.

[00149] Под "мышечной клеткой" или "мышечной тканью" подразумевается клетка или группа клеток, происходящих из мышцы любого вида (например, скелетной мышцы и гладкой мышцы, например, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или ткани сердца). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, как например миобласты, миоциты, миотрубочки, кардиомиоциты и кардиомиобласты.

[00150] Термин "трансдукция" используют для обозначения введения/доставки

кодирующей области NT-3 в клетку-реципиент либо *in vivo*, либо *in vitro* посредством дефектного по репликации гAAV в соответствии с настоящим изобретением, что приводит к экспрессии NT-3 клеткой-реципиентом.

[00151] В одном варианте осуществления генная терапия представляет собой направленную на NT-3 генную терапию посредством доставки на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV). Авторы настоящего изобретения разработали кассету экспрессии на основе AAV, несущую кодирующую последовательность кДНК NT-3 человека, находящуюся под контролем либо промотора CMV, либо тройного промотора специфичной для мышц креатинкиназы (tMCK). Авторы настоящего изобретения ранее показали, что улучшение в отношении двигательной функции, гистопатологии и электрофизиологии периферических нервов может быть достигнуто с использованием рекомбинантного вектора на основе AAV1 для усиления экспрессии нейротрофина-3 у мыши Tremble (Try), которая является моделью варианта SMT1A болезни Шарко-Мари-Тута. См. Sahenk et al., Mol Ther. 22(3):511-21 (2014), раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00152] Таким образом, в настоящем изобретении представлены способы введения эффективной дозы (или доз, вводимых по сути одновременно, или доз, вводимых с интервалами) гAAV, который кодирует NT-3, нуждающемуся в этом пациенту.

#### **Дозы и пути введения**

[00153] В настоящем изобретении представлены локальное введение и системное введение эффективной дозы гAAV и композиций в соответствии с настоящим изобретением, в том числе комбинированная терапия в соответствии с настоящим изобретением. Например, системное введение представляет собой введение в систему кровообращения, вследствие чего воздействие оказывается на весь организм. Системное введение включает энтеральное введение, такое как всасывание через желудочно-кишечный тракт, и парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации.

[00154] Таким образом, пути введения гAAV, предусматриваемые вышеизложенными способами, включают без ограничения внутривентриальный (в/в), внутримышечный (в/м) и внутрисосудистый, [в том числе, например, перфузию внутрь артерии конечности (ILP), и внутривенный (в/в) пути.

[00155] Доза гAAV, подлежащего введению в способах, раскрытых в настоящем документе, будет варьировать в зависимости, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивидуума и целевого типа(ов) клеток, и может быть определена стандартными в данной области техники способами. Может быть введена более чем одна доза, например, одна, две, три или больше доз. Титры гAAV в дозе могут находиться в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1 \times 10^9$ , приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $3 \times 10^{12}$ , приблизительно  $4 \times 10^{12}$ , приблизительно  $5 \times 10^{12}$ , приблизительно  $6 \times 10^{12}$ , приблизительно

$6,5 \times 10^{12}$ , приблизительно  $7 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ , приблизительно  $1 \times 10^{14}$  или до приблизительно  $1 \times 10^{15}$  или больше устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (в. г.) (т. е.  $1 \times 10^7$  в. г.,  $1 \times 10^8$  в. г.,  $1 \times 10^9$  в. г.,  $1 \times 10^{10}$  в. г.,  $1 \times 10^{11}$  в. г.,  $1 \times 10^{12}$  в. г., приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г., приблизительно  $1 \times 10^{12}$  в. г., приблизительно  $3 \times 10^{12}$  в. г., приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г., приблизительно  $5 \times 10^{12}$  в. г., приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г., приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г., приблизительно  $7 \times 10^{12}$  в. г.,  $1 \times 10^{13}$  в. г.,  $1 \times 10^{14}$  в. г.,  $1 \times 10^{15}$  соответственно). Способы титрования AAV описаны в Clark *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10: 1031-1039 (1999).

[00156] В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, в которых путем введения является в/м путь, вводимая доза гAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  до по меньшей мере приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг. (Все диапазоны в настоящем документе предназначены для представления каждого отдельного значения в диапазонах, а также отдельных верхних и нижних значений каждого диапазона.) В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, в которых путем введения является в/м, вводимая доза гAAV составляет  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, в которых путем введения является в/м, вводимая доза гAAV составляет  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, в которых путем введения является в/м, вводимая доза гAAV составляет  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг.

[00157] Пациенты, представляющие собой людей, являются субъектами, рассматриваемыми в настоящем документе для лечения. Пациенты, представляющие собой людей, являются субъектами, рассматриваемыми в настоящем документе для лечения с помощью в/м доставки. К таким пациентам относятся те пациенты, которые, например: i) являются взрослыми субъектами ( $> 18$  лет) с диагнозом СМТ1А, ii) демонстрируют дупликацию 1,5 Мб в 17p11.2, включающую ген периферического белка миелина 22 (PMP22), iii) мужчины и женщины любой этнической или расовой группы, iv) демонстрируют слабость мышцы, обеспечивающей дорсифлексию голеностопа (должны иметь полный ROM преодоления силы тяжести, но не могут поддерживать полную дорсифлексию при преодолении силы тяжести или не могут стоять на пятках в течение 3 секунд или больше (критерии Northstar)), iv) имеют аномальные значения скорости нервной проводимости, v) способны сотрудничать для клинической оценки и повторного исследования нервной проводимости и vi) готовы, если являются сексуально активными субъектами, применять надежный способ контрацепции на протяжении исследования. Подходящие пациенты не могут включать, например, пациентов с i) активной вирусной инфекцией на основании клинических наблюдений или серологических признаков наличия инфекции ВИЧ или гепатита А, В или С, ii) продолжающейся иммуносупрессивной терапией или иммуносупрессивной терапией в течение 6 месяцев после начала исследования (например, кортикостероиды, циклоспорин, такролимус, метотрексат, циклофосфамид, внутривенный иммуноглобулин), iii) персистирующей лейкопенией или лейкоцитозом ( $WBC \leq 3,5$  тыс./мкл или  $\geq 20,0$  тыс./мкл) или абсолютным количеством

нейтрофилов  $<1,5$  тыс./мкл, iv) титрами AAV1-связывающих антител  $\geq 1:50$ , как определено иммуноанализом ELISA, v) сопутствующим заболеванием или потребностью в хроническом лекарственном лечении, которое по мнению главного исследователя создает ненужные риски при переносе генов, vi) контрактурами голеностопного сустава или хирургическими вмешательствами, препятствующими надлежащему тестированию мышечной силы, vii) беременностью, кормлением грудью или планированием беременности, viii) другими причинами нейропатии и/или ix) хирургическим вмешательством в отношении конечностей в последние шесть месяцев. Согласно иллюстративному клиническому протоколу пациенты с СМТ1А получают суммарную дозу вектора scAAV1.tMCK.NTF3, распределенную на медиальную и латеральную головки икроножных мышц и передние большеберцовые (ТА) мышцы ног, которые преимущественно вызывают слабость и нестабильность голеностопного сустава при СМТ. Субъекты получают одну из следующих доз: i) низкую дозу вектора  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг (суммарная доза) или ii) высокую дозу вектора  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг (суммарная доза).

[00158] В одном варианте осуществления вектор вводят путем в/м инъекции без разбавителя. В альтернативных вариантах осуществления композиции для внутримышечной инъекции содержат вспомогательное средство, такое как кунжутное или арахисовое масло, или могут быть реализованы в водном пропиленгликоле, а также стерильных водных растворах. Такие водные растворы могут быть забуферены, при необходимости, а жидкий разбавитель сначала превращен в изотонический с использованием солевого раствора или глюкозы. Растворы гAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли можно получать в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсию гAAV также можно получать 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 связи с этим все используемые стерильные водные среды легко получают посредством стандартных методик, хорошо известных специалистам в данной области техники.

[00159] Фармацевтические носители, разбавители или вспомогательные средства, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить через шприц. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) их подходящие смеси и растительные масла. Подходящая текучесть 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 обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и т. п. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута путем использования средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[00160] Стерильные инъекционные растворы получают путем включения гAAV в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии получают путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и методика сублимационной сушки, которые обеспечивают получение порошка на основе активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из их предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

[00161] Трансдукцию посредством гAAV также можно выполнять *in vitro*. В одном варианте осуществления требуемые целевые мышечные клетки извлекают из субъекта, трансдуцируют посредством гAAV и вводят назад субъекту. В качестве альтернативы, можно использовать сингенные или ксеногенные мышечные клетки, если эти клетки не будут вызывать неподходящий иммунный ответ у субъекта.

[00162] В другом аспекте представлены геномы гAAV. Вводимые геномы гAAV содержат полинуклеотид NT-3 под контролем последовательностей контроля транскрипции. В геномах гAAV отсутствует ДНК гер и сар AAV. ДНК AAV в геномах гAAV может происходить из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая без ограничения серотипы AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11 и AAVrh.74. Нуклеотидные последовательности геномов этих серотипов AAV известны в уровне техники, как отмечено в разделе "Предпосылки изобретения" выше.

[00163] В некоторых вариантах осуществления последовательности контроля транскрипции геномов гAAV являются специфичными для мышц контролирующими элементами, включая без ограничения таковые, которые происходят из семейств генов актина и миозина, например, из семейства генов myoD [см. Weintraub et al., *Science*, 251: 761-766 (1991)], фактор MEF-2, связывающийся с энхансером, специфическим в отношении миоцитов [Cserjesi and Olson, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 4854-4862 (1991)], контролирующие элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека [Muscat et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7: 4089-4099 (1987)], гена актина сердечной мышцы, промотор мышечной

креатинкиназы (МСК) [Johnson et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393-3399 (1989)] и энхансер МСК, промотор МНСК7 (модифицированная версия промотора МСК, которая предусматривает энхансер из тяжелой цепи миозина (Salva et al., *Mol. Ther.*, 15: 320-329 (2007)), промотор десмина, контролирующие элементы, происходящие из гена тропонина С быстросокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленносокращающихся волокон сердечной мышцы и гена тропонина I медленносокращающихся волокон мышц: индуцируемых гипоксией ядерных факторов (Semenza et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5680-5684 (1991)), индуцируемые стероидами элементы и промоторы, включая глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5603-5607 (1993)), а также другие контролирующие элементы. В некоторых вариантах осуществления элементы контроля транскрипции предусматривают промотор МСК. В некоторых вариантах осуществления элементы контроля транскрипции предусматривают промотор МНСК7.

[00164] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид NT-3 в геноме гAAV представляет собой кДНК NT-3, представленную под SEQ ID NO: 1 (что соответствует нуклеотидам 1077-1850 из SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид NT-3 в геноме гAAV представляет собой кДНК NT-3, представленную под номером доступа в Genbank NM\_001102654, или последовательность кДНК NT-3, представленную под SEQ ID NO: 1, или является вариантным полинуклеотидом, характеризующимся 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% идентичностью последовательности с кДНК NT-3. В некоторых вариантах осуществления вариантный полинуклеотид NT-3 кодирует такой же полипептид NT-3, как и полипептид, кодируемый кДНК NT-3 под SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность полипептида NT-3, кодируемого кДНК NT-3, представленной под SEQ ID NO: 1 или представленной под номером доступа в Genbank NM\_001102654, представлена под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вариантный полинуклеотид NT-3 кодирует вариантный полипептид NT-3 по меньшей мере с одним изменением аминокислотной последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида (SEQ ID NO: 2), кодируемого кДНК NT-3, представленной под SEQ ID NO: 1 или представленной под номером доступа в Genbank NM\_001102654. Изменение аминокислотной последовательности может представлять собой, например, замену, делецию или вставку одной или нескольких аминокислот, предпочтительно консервативные замены. Вариантный полипептид NT-3 может характеризоваться любой комбинацией аминокислотных замен, делеций или вставок при сохранении активности полипептида. В одном аспекте вариантный полипептид NT-3 может иметь ряд аминокислотных изменений, вследствие чего его аминокислотная последовательность характеризуется по меньшей мере 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 2), кодируемой кДНК NT-3, представленной под SEQ ID NO: 1 или представленной под номером доступа в Genbank NM\_001102654.

[00165] В некоторых вариантах осуществления геном гAAV представляет собой геном AAV.tMCK.NTF3, последовательность несущей NT-3 генной кассеты которого представлена под SEQ ID NO: 11 и прокомментирована в таблице 4 (см. пример 3).

[00166] В еще одном аспекте представлена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота состоит из нуклеотидной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 11.

[00167] Также представлена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая в направлении от 5'- к 3'-концу: (i) последовательность первого инвертированного конечного повтора (ITR) AAV2 (SEQ ID NO: 4); (ii) последовательность промотора мышечной креатинкиназы (SEQ ID NO: 3); (iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид NT-3 человека (SEQ ID NO: 1); и (iv) последовательность второго ITR AAV2 (SEQ ID NO: 8), где полипептид NT-3 человека характеризуется аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2, на 100% идентична SEQ ID NO: 2 или кодируется нуклеотидами 1077-1850 из SEQ ID NO: 11.

[00168] Рассматривается рекомбинантный AAV, содержащий вышеупомянутые нуклеиновые кислоты, а также гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична нуклеотидной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 1.

[00169] Представлены ДНК-плазмиды, содержащие геномы гAAV в соответствии с настоящим изобретением. ДНК-плазмиды содержат геномы гAAV, рассматриваемые в настоящем документе. ДНК-плазмиды переносят в клетки, для которых допустимо инфицирование вирусом-помощником AAV (например, аденовирусом, E1-делетированным аденовирусом или вирусом герпеса), для сборки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Методики получения частиц гAAV, в которые геном AAV подлежит упаковке, гены гер и сар и функциональные элементы вируса-помощника, предоставляемые клетке, являются стандартными в данной области техники. Получение гAAV требует, чтобы в одной клетке (называемой в настоящем документе упаковывающей клеткой) присутствовали следующие компоненты: геном гAAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV (т. е. не находящиеся в таковом), и функциональные элементы вируса-помощника. Гены гер и сар AAV могут происходить из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут происходить из серотипа AAV, отличного от ITR генома гAAV, включая без ограничения серотипы AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11 и AAV rh74. Получение псевдотипированного гAAV раскрыто, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов гAAV, например, гAAV с капсидными мутациями. См., например, Marsic *et al.*, *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014).

[00170] Способ создания упаковывающей клетки заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для продуцирования частиц AAV. Например, плазмиду (или несколько плазмид), содержащую

геном гAAV, в котором отсутствуют гены гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, находящиеся отдельно от генома гAAV, и селективируемый маркер, такой как ген устойчивости к неомицину, интегрируют в геном клетки. Геномы AAV вводили в бактериальные плазмиды с помощью процедур, таких как образование хвостов GC (Samulski et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой (Laughlin et al., 1983, *Gene*, 23:65-73) или путем прямого лигирования тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, *J. Biol. Chem.*, 259:4661-4666). Затем линию упаковывающих клеток инфицируют вирусом-помощником, таким как аденовирус. Преимущества этого способа заключаются в том, что клетки характеризуются возможностью селекции и подходят для крупномасштабного получения гAAV. В других примерах подходящих способов используют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки. Способы получения гAAV с самокомплементарными геномами также известны в уровне техники.

[00171] Общие принципы получения гAAV рассматриваются, например, в Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539 и Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbial. and Immunol.*, 158:97-129). Различные подходы описаны в Ratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072 (1984); Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984); Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251 (1985); McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963 (1988) и Lebkowski et al., 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828); 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. (1995) *Vaccine* 13:1244-1250; Paul et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:609-615; Clark et al. (1996) *Gene Therapy* 3:1124-1132; патенте США № 5786211; патенте США № 5871982 и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы тем самым включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте с особым акцентом на те разделы документов, которые относятся к получению гAAV.

[00172] В дополнительном аспекте в настоящем изобретении, таким образом, представлены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном варианте осуществления упаковывающие клетки могут быть стабильно трансформированными раковыми клетками, такими как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная 293 линия). В другом варианте осуществления упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такие как клетки 293 с низким пассажем (человеческие эмбриональные почечные клетки, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты человеческого плода), клетки WI-38 (фибробласты человеческого плода), клетки Vero (почечные клетки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода резуса).

[00173] гAAV может быть очищен стандартными в данной области способами, такими как колоночная хроматография или градиенты хлорида цезия. Способы очистки

векторов гAAV от вируса-помощника известны в уровне техники и включают в себя способы, раскрытые, например, в Clark et al., *Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, *Methods Mol. Med.*, 69 427-443 (2002); патенте США № 6566118 и WO 98/09657.

[00174] Таким образом, в другом аспекте в настоящем изобретении представлен гAAV, содержащий полинуклеотид NT-3. В некоторых вариантах осуществления гAAV содержит капсид AAV rh74 и полинуклеотид NT-3. В некоторых вариантах осуществления в геноме гAAV отсутствует ДНК *rep* и *cap* AAV. В некоторых вариантах осуществления способов гAAV представляет собой гAAVrh74.tMCK.NTF3. В некоторых вариантах осуществления гAAV характеризуется самокомплементарным геномом.

[00175] В другом аспекте в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие гAAV, описанный в настоящем документе. Композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат гAAV в фармацевтически приемлемом носителе. Композиции также могут содержать другие ингредиенты, такие как разбавители. Приемлемые носители и разбавители являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозировках и концентрациях, и они включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат или другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, плуроники или полиэтиленгликоль (PEG). В некоторых вариантах осуществления гAAV составляют в Tris, MgCl<sub>2</sub>, NaCl и плуронике F68. В некоторых вариантах осуществления гAAV составляют в 20 mM Tris (pH 8,0), 1 mM MgCl<sub>2</sub> и 200 mM NaCl, содержащем 0,001% плуроника F68.

[00176] Также в настоящем документе рассматриваются виды комбинированного лечения. Комбинации, используемые в настоящем документе, включают в себя одновременное лечение или виды последовательного лечения. В частности, рассматриваются комбинации способов в соответствии с настоящим изобретением со стандартными видами медицинского лечения (например, кортикостероидами и/или иммунодепрессивными лекарственными средствами), а также комбинации с новыми видами лечения. В различных вариантах осуществления субъектов лечат кортикостероидами до, во время или после (или согласно любому варианту комбинаций двух или более из трех возможных вариантов) прохождения субъектом лечения согласно способу, рассматриваемому в настоящем документе. Например, комбинации предусматривают введение кортикостероида, например, преднизолона до, во время и/или после введения вектора гAAV.

[00177] Стерильные инъекционные растворы получают путем включения гAAV в

необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии получают путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и методика сублимационной сушки, которые обеспечивают получение порошка на основе активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из их предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

### **Стимулирование мышечного роста**

[00178] В одном аспекте настоящего изобретения представлен способ стимулирования мышечного роста у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества нейротрофина-3 (NT-3), pro-NT-3 или их эффективного фрагмента или нуклеиновой кислоты, кодирующей NT-3, pro-NT-3 или их эффективный фрагмент, нуждающемуся в этом субъекту.

[00179] В некоторых вариантах осуществления способы в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для увеличения мышечной силы, мышечной массы или выносливости мышц и снижения мышечного утомления у субъекта.

[00180] Мускулатура может быть разделена на три типа: скелетная мускулатура, сердечная мускулатура и гладкая мускулатура. Скелетная мускулатура представляет собой мышечную ткань, способную генерировать силу, а передача этой силы скелету позволяет дышать, двигаться и поддерживать положение тела. Сердечная мускулатура представляет собой мышцу сердца. Гладкая мускулатура представляет собой мышечную ткань стенок артерий и кишечника. Способы и композиции в соответствии с настоящим изобретением применимы главным образом к скелетной мускулатуре и, кроме того, могут положительно влиять на гладкую мускулатуру. "Скелетную мускулатуру" и "скелетные мышцы" определяют как мышцы, взаимодействующие с костями, сухожилиями и суставами.

[00181] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения недомоганий, заболеваний, нарушений и состояний, которые обуславливают снижение мышечной силы (также упоминаемых в настоящем документе как заболевания опорно-двигательного аппарата, а также мышечная дисфункция и связанные с истощением мышечной ткани заболевания). Основными категориями заболеваний опорно-двигательного аппарата являются мышечные дистрофии и мышечная атрофия.

[00182] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата, в том числе мышечной дисфункции и связанных с истощением мышечной ткани заболеваний или нарушений, включающих в себя наследственную миопатию, нервно-мышечное заболевание, мышечную атрофию, индуцированную лекарственными средствами миопатию, или недомогание, заболевание, нарушение или состояние, которые обусловлены

снижением мышечной силы. В настоящем изобретение также представлены способы лечения нейропатий, таких как наследственная СМТ и СМТ1А, а также аксональных и демиелинизирующих полинейропатий, как например хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия. Способ лечения предусматривает введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества нейротрофина-3 (NT-3), pro-NT-3 или их эффективного фрагмента или нуклеиновой кислоты, кодирующей NT-3, pro-NT-3 или их эффективный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется мышечное заболевание, выбранное из группы, состоящей из саркопении, кахексии, атрофии мышечных волокон II типа и приобретенных аутоиммунных первичных мышечных нарушений, связанных с нарушенной фазой радиального роста при регенерации.

[00183] В некоторых вариантах осуществления NT-3 может быть использован для лечения мышечной атрофии. Мышечная атрофия является общим термином, используемым для описания состояния, характеризующегося истощением или потерей мышечной ткани в результате различных заболеваний, нарушений, других состояний или явлений. Мышечные атрофии могут без ограничения быть результатом затянувшейся иммобилизации в результате восстановления от тяжелых ожогов, хирургического вмешательства в отношении замены крупного сустава, нейропатической боли, периферической нейропатии, некротического васкулита, невесомости (например, у астронавтов и космонавтов), длительной госпитализации, дегенеративного заболевания (например, амиотрофического латерального склероза) и трансплантации органов, а также повреждения спинного мозга, хронического гемодиализа и инсульта.

[00184] В некоторых вариантах осуществления NT-3 может быть использован для лечения дисфункциональной атрофии. Дисфункциональная атрофия представляет собой состояние, характеризующееся истощением или потерей мышечной ткани в результате длительных периодов бездействия. Дисфункциональная атрофия может без ограничения быть результатом затянувшейся иммобилизации в результате восстановления от тяжелых ожогов, хирургического вмешательства в отношении замены крупного сустава, нейропатической боли, невесомости (например, у астронавтов и космонавтов), длительной госпитализации, анорексии и трансплантации органов, а также повреждения спинного мозга, хронического гемодиализа и инсульта.

[00185] В некоторых вариантах осуществления NT-3 может быть использован для лечения возрастной мышечной атрофии. Возрастная мышечная атрофия представляет собой состояние, характеризующееся истощением или потерей мышечной ткани и замещением мышечной ткани фиброзной тканью по мере старения субъекта.

[00186] В некоторых вариантах осуществления NT-3 может быть использован для лечения саркопении. Саркопения представляет собой состояние, характеризующееся истощением или потерей мышечной ткани и замещением мышечной ткани фиброзной тканью по мере старения субъекта.

[00187] В некоторых вариантах осуществления NT-3 может быть использован для

лечения истощения мышечной ткани при кахексии. Кахексия представляет собой потерю веса, мышечную атрофию, усталость, слабость и значительную потерю аппетита у того, кто не пытается активно сбросить массу, а скорее в результате хронического заболевания. Компонент истощения мышечной ткани при кахексии может без ограничения являться результатом рака, множественного склероза, туберкулеза, синдрома приобретенного иммунодефицита, вируса иммунодефицита человека, недоедания, болезни Паркинсона, эмфиземы, сердечной недостаточности, болезни двигательных нейронов, кистозного фиброза, деменции, саркопении, хронического обструктивного заболевания легких, заболевания почки и почечной недостаточности.

[00188] В некоторых вариантах осуществления NT-3 может быть использован для лечения истощения мышечной ткани в результате вирусных инфекций (например, ВИЧ, вирусом Эпштейна-Барр), бактериальных инфекций (например, микобактериями и риккетсиями), постполиомиелитного синдрома и паразитарной инфекции (например, трипаносомами и шистосомами), где субъект подвержен риску развития мышечной атрофии.

### **Нейротрофин-3**

[00189] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество NT-3, про-NT-3 или их NT-3-аналога вводят субъекту для стимулирования мышечного роста. Нейротрофин 3 (NT-3) представляет собой нейротрофический фактор из семейства NGF (фактора роста нервов) нейротрофинов. NT-3 представляет собой белковый фактор роста, который обладает активностью в отношении определенных нейронов периферической и центральной нервной системы; он наиболее известен тем, что помогает поддерживать выживание и дифференцировку существующих нейронов и способствует росту и дифференцировке новых нейронов и синапсов.

[00190] Настоящее изобретение предусматривает блокирующие пептиды, которые по сути сходны по меньшей мере с частью аминокислотной последовательности внеклеточного домена Cx26. Термин "часть", используемый в настоящем документе, относится к аминокислотной последовательности в пределах внеклеточных доменов Cx26, которая содержит по меньшей мере 4 аминокислоты. В дополнительных вариантах осуществления часть относится к аминокислотной последовательности, длина которой составляет по меньшей мере 6 аминокислот, аминокислотной последовательности, длина которой составляет по меньшей мере 8 аминокислот, или аминокислотной последовательности, длина которой составляет по меньшей мере 10 аминокислот. Следовательно, блокирующие пептиды состоят из по меньшей мере 4, 6, 8 или 10 аминокислот. Аналогичным образом, блокирующие пептиды, описанные в настоящем документе, могут иметь максимальный размер. Максимальный размер блокирующего пептида относится к общему размеру пептида и включает в себя любые дополнительные последовательности, связанные с пептидом, такие как домен белковой трансдукции. В некоторых вариантах осуществления блокирующий пептид имеет максимальный размер, составляющий менее чем приблизительно 200 аминокислот, тогда как в других вариантах

осуществления блокирующий пептид имеет максимальный размер, составляющий менее чем приблизительно 100 аминокислот. В других вариантах осуществления блокирующий пептид имеет максимальный размер, составляющий 75 аминокислот или меньше, 50 аминокислот или меньше, 40 аминокислот или меньше, 30 аминокислот или меньше или 20 аминокислот или меньше.

[00191] Используемый в настоящем документе термин "полипептид" относится к последовательности олигопептида, пептида или белка или к любым их фрагменту, части или субъединице и к природным или синтетическим молекулам. Термин "полипептид" также включает в себя аминокислоты, соединенные друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями, т. е. пептидные изостеры, и может содержать любой тип модифицированных аминокислот. Термин "полипептид" также включает в себя пептиды и полипептидные фрагменты, мотивы и т. п., гликозилированные полипептиды, все "миметические" и "пептидомиметические" полипептидные формы и ретроинверсионные пептиды (также называемые полностью D-ретро- или ретро-энантио-пептидами).

[00192] "По сути подобная" означает, что данная аминокислотная последовательность (или последовательность нуклеиновой кислоты) характеризуется по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью с эталонной последовательностью. Идентичность или гомология в отношении таких последовательностей определяется в настоящем документе как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны таковым в известных пептидах, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента гомологии, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательности. N-концевые, C-концевые или внутренние удлинения, делеции или вставки в пептидную последовательность не следует рассматривать как влияющие на гомологию.

[00193] По сути подобные пептиды включают в себя те, которые отличаются одним или несколькими аминокислотными изменениями, при этом изменения, например, замены, добавления или делеции аминокислотных остатков, не устраняют свойства соответствующих пептидов, такие как их способность связываться с FAK или NANOG. Кроме того, только последовательности, описывающие или кодирующие белки, в которых сделаны только консервативные замены в консервативных областях, являются по сути подобными в целом. Предпочтительно по сути подобные последовательности также сохраняют отличительную активность полипептида.

[00194] Примеры консервативных замен включают в себя замену неполярного (гидрофобного) остатка, такого как изолейцин, лейцин или метионин, на другой. Аналогичным образом, настоящее изобретение предусматривает замену одного полярного (гидрофильного) остатка, например, между аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином и между глицином и серином. Кроме того, также предполагается замена

основного остатка, такого как лизин, аргинин или гистидин, на другой или замена одного кислотного остатка, такого как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, на другой. Примеры неконсервативных замен включают в себя замену неполярного (гидрофобного) остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин, аланин, метионин, на полярные (гидрофильные) остатки, такие как цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, лизин, и/или полярного остатка на неполярный остаток.

[00195] Фраза "консервативная замена" также предусматривает использование химически дериватизированных остатков вместо недериватизированных остатков, при условии, что пептид сохраняет необходимую способность связываться с NT-3. По сути подобные пептиды также предусматривают наличие дополнительных аминокислот или делецию одной или нескольких аминокислот, которые не влияют на необходимую способность связываться с NT-3, например, по сути подобные пептиды могут содержать N- или C-концевой цистеин, с помощью которого при необходимости пептид может быть ковалентно связан с белком-носителем, например альбумином. Такое присоединение может снизить выведение пептида из крови и снизить скорость протеолиза пептидов. Кроме того, для целей настоящего изобретения пептиды, содержащие D-аминокислоты вместо L-аминокислот, также предусматриваются термином "консервативная замена". Присутствие таких D-изомеров может способствовать минимизации протеолитической активности и выведения пептида.

[00196] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят белок про-нейротрофин 3 (pro-NT-3). Проформа нейротрофина 3 представляет собой форму предшественника NT-3, составляющую ~30 кДа, который превращается в зрелый NT путем ферментативного расщепления и удаления N-концевого продомена, составляющего ~15 кДа. См. Tauris et al., Eur. J Neurosci, 33(4), 622-631 (2011).

### **Лечение мышечной атрофии**

[00197] В настоящем изобретении представлен способ лечения субъекта с периферической мышечной атрофией. Пируватные соединения могут быть использованы для обеспечения профилактического и/или терапевтического лечения. Пируватные соединения, например, можно вводить профилактически субъекту до проявления периферической нейропатии. Профилактическое (т. е. превентивное) введение эффективно в отношении уменьшения вероятности последующего проявления периферической нейропатии у субъекта или уменьшения степени тяжести периферической нейропатии, которая впоследствии проявляется. Профилактическое лечение может быть применено в отношении субъекта с повышенным риском развития периферической нейропатии, например субъекта с периферической нейропатией в семейном анамнезе. Экспрессия мутаций миелинового белка 22 (PMP22) представляет 70-80% всех случаев нейропатии Шарко-Мари-Тута, и, таким образом, их присутствие может быть применимым в качестве критерия отбора пациентов для получения лечения с использованием пируватных соединений, описанных в настоящем документе.

[00198] В качестве альтернативы, соединения в соответствии с настоящим

изобретением можно вводить терапевтически субъекту, который уже поражен периферической нейропатией. В одном варианте осуществления терапевтического введения введение соединений эффективно в отношении устранения периферической нейропатии; в другом варианте осуществления введение пируватных соединений эффективно в отношении снижения тяжести периферической нейропатии или увеличения продолжительности жизни субъекта, страдающего этим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления способ лечения предусматривает введение терапевтически эффективного количества пируватного соединения в фармацевтически приемлемом составе субъекту в течение значительного периода времени.

### Варианты СМТ

[00199] Наследственная нейропатия Шарко-Мари-Тута (СМТ) относится к группе нарушений, характеризующихся хронической моторной и сенсорной полинейропатией, также известной как наследственные моторные и сенсорные нейропатии. Типами аутосомно-доминантной нейропатии СМТ являются\_\_демиелинизирующая (также называемая СМТ1), аксональная недемиелинизирующая (также называемая СМТ2) и доминантная промежуточная СМТ (DI-СМТ). Другими нейропатиями, которые также эквивалентны СМТ, являются дистальная наследственная моторная нейропатия (9dHMN), дистальная спинальная мышечная атрофия (DSMA) и синдром Дейерина-Соттаса (DSS). Описания и классификации нейропатий СМТ представлены в Bird, GeneReviews, Seattle Washington: University of Washington Seattle PIM 20301532, обновленном 28 июня 2018 года.

[00200] В настоящее время имеется более 70 известных генных вариантов, которые, как известно, связаны с СМТ. Эти генные варианты представлены в таблице 1 ниже с использованием системы классификации Magy et al. (Neurology 90:e870-6, 2018). Типами наследования для каждого связанного с СМТ генного варианта являются аутосомно-доминантный (AD), аутосомно-рецессивный (AR) или X-сцепленный (XL). Нейропатия для каждого связанного с СМТ генного варианта является аксональной (Ax), демиелинизирующей (De) и промежуточной (In). "Другие обозначения", представленные в таблице 1, представляют собой обозначения, используемые в других системах классификации, которые включают в себя доминантную промежуточную СМТ (DI-СМТ), дистальную спинальную мышечную дистрофию (DSMA), наследственную сенсорную и автономную нейропатию (HSAN) и дистальную наследственную моторную нейропатию (dHMN).

Таблица 1

Ген <sup>1</sup>	MOI	Тип нейропатии			Другие фенотипические признаки/комментарии	Другие обозначения <sup>2</sup>
		Ax	De	In		
<i>GDAP1</i>	AR	●			Парез голосовых связок <sup>4</sup>	СМТ2К
	AR	●	●	●		СМТ4А

					CMT2H
					CMT2K
					CMTRIA
	AD, AR	•			
<i>GJB1</i>	XL	•		Семейный анамнез может предполагать AD, поскольку женщины могут быть <u>поражены</u> так же тяжело, как и мужчины.	CMTX1
<i>HINT1</i>	AR	•		Нейромиотония	
<i>MFN2</i>	AD, AR	•		Атрофия зрительного нерва	CMT2A2 CMT2I/2J
<i>MPZ</i>	AD	• • •			CMT1B CMT2I/J DI-CMTD
<i>PMP22</i>	AD	•			CMT1A CMT1E
<i>SH3TC2</i>	AR	•			CMT4C
<i>AARS</i>	AD	•			CMT2N
<i>ABHD12</i>	AR	•		Тугоухость, катаракта, пигментный ретинит	PHARC
<i>AIFM1</i>	XL	•		Тугоухость, умственная отсталость	CMTX4
<i>ARHGEF10</i>	AD	•			
<i>ATP1A1</i>	AD	•			
<i>ATP7A</i> <sup>5</sup>	XL	•		Дистальные нижние конечности	
<i>BAG3</i>	AD	•		Миофибриллярная миопатия, кардиомиопатия	
<i>BSCL2</i>	AD	•		Дистальные нижние конечности	dHMN5A

				конечности;	
				Вовлечение UMN может	
				вызвать спастическую	
				параплегию	
<i>CNTNAP1</i>	AR	•	•	Артрогрипоз, лейкодистрофия	
<i>COA7</i>	AR	•			
<i>DCTN1</i>	AD			Дистальные нижние конечности	dHMN7B
<i>DCTN2</i>	AD	•		Парез голосовых связок <sup>4</sup>	
<i>DGAT2</i>	AD	•			
<i>DHTKD1</i>	AD	•			CMT2Q
<i>DNAJB2</i>	AR	•		Дистальная моторная нейропатия	DSMA5
<i>DNMT1</i>	AD	•		Потеря слуха, деменция	DMNT1
<i>DNM2</i>	AD		•		CMT2M DI-CMTB
<i>DRP2</i>	XL		•	Аутизм	
<i>DYNC1H1</i>	AD	•		SMA	CMT2O
<i>EGR2</i>	AD		•		CMT1D
	AR		•		CMT4E
<i>FGD4</i>	AR		•		CMT4H
<i>FIG4</i>	AR		•		CMT4J
<i>GARS</i>	AD	•		Начало развития происходит в руках	CMT2D dHMN5A
<i>GNB4</i>	AD		•		DI-CMTF
<i>HARS</i>	AD	•	•		CMT2W
<i>HSPB1</i>	AD	•			CMT2F dHMN2B

<i>HSPB3</i>	AD				dHMN2C
<i>HSPB8</i>	AD	•		Начало в зрелом возрасте	CMT2L dHMN2A
<i>IGHMBP2</i>	AR	•			CMT2S DSMA1
<i>INF2</i>	AD		•	Гломерулосклероз	
<i>KIF1B</i>	AD	•			CMT2A1
<i>KIF5A</i>	AD	•		Спастичность	
<i>LITAF</i>	AD		•		CMT1C
<i>LMNA</i>	AR	•			CMT2B1
<i>LRSAM1</i>	AD				CMT2G
	AR	•			CMT2P
<i>MARS</i>	AD	•			CMT2U
<i>MCM3AP</i>	AR	•	•	Начало в детском возрасте, тяжелая	
<i>MED25</i>	AR	•			CMT2B2
<i>MME</i>	AR				
	AD	•			CMT2T
<i>MORC2</i>	AD	•			CMT2Z
<i>MPV17</i>	AR	•		Нейрогепатопатия Навахо	
<i>MPZ</i>	AD	•	•	•	CMT1B
					CMT2I/J
					DI-CMTD
<i>MTMR2</i>	AR		•	Парез голосовых связок <sup>4</sup>	CMT4B1
<i>NAGLU</i>	AD	•			CMT2V
<i>NDRG1</i>	AR		•		CMT4D
<i>NEFH</i>	AD	•			
<i>NEFL</i>	AD, AR	•	•		CMT1F/2E

<i>PDK3</i>	XL	•		CMTX6
<i>PLEKHG5</i>	AR	•	Дистальная предоминантная	DSMA4
<i>PRPS1</i>	XL		Ретинопатия, тугоухость	CMTX5
<i>PRX</i>	AR	•		CMT4F
<i>PTRH2</i>	AR		Потеря слуха	
<i>RAB7A</i>	AD	•	Выраженная чувствительности	потеря CMT2B
<i>SBF1</i>	AR	•		CMT4B3
<i>SBF2</i>	AR	•		CMT4B2
<i>SCO2</i>	AR	•	Моторная нейропатия	
<i>SETX</i>	AD		Дистальные конечности	нижние FALS
<i>SIGMAR1</i>	AR	•	Моторная нейропатия	
<i>SGPL1</i>	AR	•	Рецидивирующая мононейропатия	
<i>SPG11</i>	AR	•	Спаستичность, когнитивных функций	снижение CMT2X ALS5
<i>SPTLC1</i>	AD	•		HSAN1A
<i>TRIM2</i>	AR	•	Парез голосовых связок <sup>4</sup>	CMT2R
<i>TRPV4</i>	AD	•	Парез голосовых связок <sup>4</sup> , дисплазия скелета	CMT2C
<i>VCP</i>	AD	•	Миопатией с тельцами- включениями, деменция	CMT2Y
<i>WARS</i>	AD	•	Моторная нейропатия	dHMN9
<i>YARS</i>	AD	•		DI-CMTC
Невыясненн ая <sup>6</sup>	XL	•	Быстрое прогрессирование, тяжелая слабость рук	CMTX3

MOI=тип наследования.

AD=аутосомно-доминантный.

AR=аутосомно-рецессивный.

XL=X-сцепленный.

Ax=аксональная.

De=демиелинизирующая.

In=промежуточная.

UMN=верхний двигательный нейрон.

DI-CMT=доминантная промежуточная CMT.

DSMA=дистальная спинальная мышечная атрофия.

ALS=амиотрофический латеральный склероз.

HSAN=наследственная сенсорная и автономная нейропатия.

dHMN=дистальная наследственная моторная нейропатия.

### **Введение и состав**

[00201] Вектор или пептид, использованный в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, может быть включен в фармацевтические композиции, подходящие для введения субъекту. В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, противобактериальные и противогрибковые средства, обеспечивающие изотоничность и замедляющие абсорбцию средства и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают в себя один или несколько из воды, солевого раствора, забуференного фосфатом солевого раствора, декстрозы, глицерина, этанола и т. п., а также их комбинации. Во многих случаях может быть предпочтительным включение в композицию обеспечивающих изотоничность средств, например, сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, или хлорида натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно предусматривать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые увеличивают срок годности или эффективность вектора или фармацевтической композиции.

[00202] Векторы или пептиды могут вводиться при острой необходимости (т. е. во время начала или вскоре после развития событий, приводящих к мышечной атрофии), или могут вводиться профилактически (например, перед плановым хирургическим вмешательством или до появления признаков или симптомов), или вводиться в период течения мышечной атрофии, чтобы уменьшить или ослабить прогрессирование симптомов, которые бы проявились в противном случае. Время и интервал введения варьируют в зависимости от симптомов субъекта, и введение может осуществляться с интервалом от нескольких часов до нескольких суток на протяжении промежутка времени, продолжающегося несколько часов, суток, недель или дольше, как будет определено специалистом в данной области.

[00203] Композиции, содержащие векторы или пептиды, обычно вводят внутривенно. При введении внутривенно композиции могут быть объединены с другими ингредиентами, такими как носители и/или вспомогательные средства. Пептиды также могут быть ковалентно присоединены к белковому носителю, такому как альбумин, чтобы минимизировать выведение пептидов. Не имеется каких-либо ограничений в отношении природы других ингредиентов, за исключением того, что такие ингредиенты должны быть фармацевтически приемлемыми, эффективными для их предполагаемого введения и не способны ухудшать активность активных ингредиентов композиций.

[00204] Фармацевтические формы, подходящие для инъекции, включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма конечного раствора должна быть стерильной и жидкой. Типичные носители включают в себя растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, водные забуференные водные растворы (т. е. биосовместимые буферы), этанол, многоатомные спирты, такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, их подходящие смеси, поверхностно-активные вещества или растительные масла. Стерилизация может быть выполнена любым известным в уровне техники способом, включая без ограничения фильтрацию или добавление антибактериальных или противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты или тимеросала. Кроме того, изотонические средства, такие как сахара или хлорид натрия, могут быть включены в рассматриваемые композиции.

[00205] Получение стерильных инъекционных растворов, содержащих рассматриваемые пептиды, достигается путем включения этих соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией, предпочтительно стерилизацией фильтрацией. Для получения стерильного порошка вышеуказанные растворы сушат в вакууме или лиофилизируют по мере необходимости.

[00206] При введении пептидов в соответствии с настоящим изобретением перорально их фармацевтические композиции, содержащие эффективную дозу пептида, могут также содержать инертный разбавитель в качестве усваиваемого пищевого носителя и т. п., могут находиться в желатиновых капсулах с твердой или мягкой оболочкой, могут быть прессованы в таблетки или могут находиться в эликсире, суспензии, сиропе или подобном. Таким образом, рассматриваемые пептиды составляют для удобного и эффективного введения в фармацевтически эффективных количествах с подходящим фармацевтически приемлемым носителем в терапевтически эффективном количестве.

[00207] Выражения "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество", используемые в настоящем документе, относятся к количеству средства, достаточному для стимулирования мышечного роста или для уменьшения или предотвращения мышечной атрофии. Точное требуемое количество будет варьировать от субъекта к субъекту в зависимости от видовой принадлежности, возраста и общего

состояния субъекта, конкретного терапевтического средства, способа и/или пути его введения и т. п. Будет понятно, однако, что общее суточное использование соединений и композиций в соответствии с настоящим изобретением может быть определено лечащим врачом в рамках обоснованного врачебного решения. Конкретный терапевтически эффективный уровень дозы для любого конкретного субъекта или организма будет зависеть от множества факторов, включая нарушение, подлежащее лечению, и тяжесть нарушения; активность конкретного применяемого соединения; конкретную применяемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион субъекта; время введения, путь введения и скорость выведения конкретной применяемой композиции; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретной применяемой композицией; и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

[00208] Векторы или пептиды можно вводить способом, совместимым с дозированным составом, и в таком количестве, которое также является терапевтически эффективным. Системные дозировки зависят от возраста, веса и состояния пациента и от пути введения. Например, подходящая доза пептида для введения взрослым людям варьирует от приблизительно 0,001 до приблизительно 20,0 мг на килограмм массы тела. Пептиды предпочтительно следует вводить в количестве по меньшей мере приблизительно 50 мг на дозу, более предпочтительно в количестве от приблизительно 500 мг до приблизительно 1 грамма на дозу. Поскольку пептидные композиции в соответствии с настоящим изобретением в конечном итоге будут выведены из кровотока, повторное введение композиций показано и является предпочтительным.

#### Примеры

[00209] Таким образом, аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения иллюстрируются следующими примерами. Однако имеется широкий ряд других вариантов осуществления, попадающих в объем настоящего изобретения, который не должен ограничиваться конкретными примерами, представленными в настоящем документе.

#### Пример 1

Генная терапия на основе AAV1.NT-3 обеспечивает увеличение диаметра мышечных волокон за счет активации сигнального пути mTOR и метаболического ремоделирования в мышечной модели СМТ

[00210] NT-3 оказывает хорошо установленные эффекты в отношении периферических нервных и шванновских клеток, способствуя аксональной регенерации и связанной с этим миелинизации. Оценивали эффекты генной терапии на основе AAV.NT-3 в отношении окислительного состояния нейрогенной мышцы у мышей Trembled (TrJ) через 16 недель после инъекции гена и обнаружили, что увеличение размера мышечных волокон было связано с изменением окислительного состояния мышечных волокон в направлении нормализации соотношения типов волокон, наблюдаемого у дикого типа. Индуцированное NT-3 увеличение размера волокна было наиболее заметным для популяции быстросокращающихся гликолитических волокон. Такие изменения в мышце TrJ

сопровождались повышенными уровнями фосфорилирования 4E-BP1 и белка S6 в качестве доказательства активации mTORC1. Параллельно уровни экспрессии регулятора митохондриального биогенеза PGC 1 $\alpha$  и маркеров гликолиза (HK1 и PK1) увеличивались в мышце TrJ. Исследования *in vitro* показали, что рекомбинантный NT-3 может напрямую индуцировать активацию сигнального пути Akt/mTOR в миотрубочках, экспрессирующих TrkC, но не в миообластах. Наряду с этим уровни экспрессии миогенина были значительно более высокими в миотрубочках, тогда как экспрессия p75NTR была пониженной по сравнению с миообластами, что указывает на то, что индуцированная NT-3 дифференцировка миообластов связана с активацией mTORC1. Эти исследования впервые показали, что NT-3 увеличивает диаметр мышечных волокон в нейрогенной мышце посредством прямой активации сигнального пути mTOR, и что увеличение размера волокна более заметно для быстросокращающихся волокон.

### Способы

[00211] Животные, протоколы обработки и гистопатология. Мышей TrJ (B6.D2-Pmp22Tr-J/J) и C57BL/6 дикого типа получали из Jackson Laboratory (Бар-Харбор, Мэн). Мышам TrJ возрастом от девяти до 12 недель вводили инъекцией в левую икроножную мышцу либо PBS (n=6), либо  $3 \times 10^{10}$  в. г. самокомплементарного вектора (sc)AAV1.tMCK.NT-3 (n=6). Другой когорте мышей TrJ вводили инъекцией  $1 \times 10^{11}$  в. г. одностороннего AAV1.CMV.NT-3 для индуцирования высоких уровней экспрессии NT-3 для сравнения (n=6). Мыши WT получали либо PBS (n=6), либо  $3 \times 10^{10}$  в. г. вектора scAAV1.tMCK.NT-3 (n=4). Группы мышей подвергали эвтаназии и их мышцы собирали через 16 недель после инъекции гена и обрабатывали для изготовления срезов с помощью криостата. Использовали гистохимию на основе фермента сукциндегидрогеназы (SDH) для оценки метаболической дифференцировки волокон с использованием протокола, установленного собственными специалистами. Измерения специфических для конкретного типа мышечных волокон диаметров получали для 12 тонких окрашенных по толщине с помощью SDH поперечных срезов. Получали фотографические снимки трех изображений, каждое из которых представляет три отдельные зоны икроножной мышцы (глубокую зону, состоящую преимущественно из STO, промежуточную зону, показывающую STO и FTO или FTG в шахматном порядке, и поверхностную зону, преимущественно состоящую из волокон FTG) вдоль оси средней линии (на срез на зону на животное), при увеличении X20 с использованием микроскопа Olympus BX41 и камеры SPOT. Этот подход был выбран, чтобы зафиксировать изменения в окислительном состоянии волокон в каждой зоне в ответ на метаболические изменения при обработке. Диаметры темных (STO), промежуточных (FTO) и светлых (FTG) волокон определяли путем измерения кратчайшего расстояния в пределах мышечного волокна с использованием программного обеспечения Zeiss Axiovision LE4, и их значения выражали в процентах от общего количества. Средний диаметр волокна (среднее  $\pm$  SEM) получали путем объединения всех 3 типов волокон в каждой когорте. В среднем 1250 волокон (от 960 до 1486) измеряли на группу.

[00212] Продукция и активность вектора AAV.NT-3. Конструирование

самокомплементарных вирусных векторов на основе AAV серотипа 1, содержащих NT-3 под управлением промотора tMCK или CMV, было описано ранее, которые получали в Центре вирусных векторов при Общенациональном детском госпитале, Колумбус. Sahenk et al., *Mol Ther*, 22(3):511-521 (2014). Аликвотированные вирусы выдерживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до применения. Собирали образцы крови от обработанных и необработанных мышей путем кровопускания из сосуда глаза под анестезией через 6 и 16 недель после инъекции, и сыворотку крови анализировали на предмет уровней NT-3 с использованием ELISA с захватом.

[00213] Культура миобластов C2C12 и образование миотрубочек. Миобласты C2C12 культивировали в ростовой среде (GM), содержащей среду DMEM (Gibco-Invitrogen, № 10569010, Карлсбад, Калифорния), дополненную 10% FBS (Fisher Scientific, № 26-140-079, Карлсбад, Калифорния) и 1% раствора пенициллина/стрептомицина (Gibco-Invitrogen, № 15640055, Карлсбад, Калифорния), при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в увлажненной камере. Образование миотрубочек индуцировали на слитых культивируемых клетках путем замены GM на среду для дифференцировки [DMEM (Gibco-Invitrogen, № 11965092, Карлсбад, Калифорния), дополненную 5% лошадиной сыворотки (Gibco-Invitrogen, № 26050088, Карлсбад, Калифорния) и 1% раствора пенициллина/стрептомицина (Invitrogen, № 15640055 Карлсбад, Калифорния)]. Все последующие анализы в отношении миотрубочек, включая qPCR, вестерн-блоттинг и ELISA, начинали через 3 дня после индуцирования образования миотрубочек. Как миобласт, так и миотрубочки подвергали воздействию рекомбинантного человеческого NT-3 (Pepprotech, Роки-Хилл, Нью-Джерси) при концентрации 100 нг/мл в 6-луночных планшетах. Культуральные среды собирали для выявления потребления глюкозы и образования лактата с использованием наборов для анализа глюкозы и лактата (Eton Bioscience, Сан-Диего, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя.

[00214] Эксперименты с использованием qPCR. Суммарную РНК выделяли из икроножных мышц обработанных NT-3 и необработанных контрольных мышей в конечной точке. Суммарные РНК выделяли из миобласта и миотрубочек до обработок NT-3 и через 48 часов после таковых. Использовали набор для выделения РНК MirVana (Life Technologies, № AM1560, Техас, США), а затем синтезировали кДНК с использованием набора для синтеза кДНК Transcriptor First Strand (Roche, № 04379012001, Roche, США), следуя инструкциям производителя. Другие эксперименты с использованием qPCR проводили с использованием универсального супермикса SYBR® Green iTaq™ (Biorad, № 1725122, Геркулес, Калифорния, США). Последовательности праймеров для PGC 1 $\alpha$  (Cunningham et al., *Nature*, 450(7170):736-740 (2007)) и GAPDH (Toscano et al., *Mol Ther*, 18(5):1035-1045 (2010)) (гена домашнего хозяйства) получали из литературных источников. Другие последовательности праймеров получали из Primer Band. Wang et al., *Nucleic acids research*, 40(Database issue):D1144-1149 (2012). Все эксперименты с использованием qPCR проводили с использованием аппарата для ПЦР в режиме реального времени ABI 7500, а результаты анализировали с использованием программного обеспечения Data Assist (ABI).

[00215] Экстракция белка и эксперименты с использованием вестерн-блоттинга.

Замороженные блоки икроножных мышц нарезали толщиной 20 мкм, помещали в небольшие пластиковые пробирки на 2 мл (15-20 срезов на блок) и гомогенизировали в буфере для лизиса [буфер для лизиса RIPA (Thermo Fisher, № 89900, США) с 1x ингибитором протеазы Halt (Thermo Fisher, № 78429, США) и 1x ингибитором фосфатазы (Sigma, № P0044, США)] с использованием автоматического миксера для гранул и одноразовых пестиков с периодами в 20 секунд три раза. Для анализа трансдукции сигнала *in vitro* миообласты и миотрубочки собирали в небольшие пробирки на 2 мл после 30 минут инкубации с NT-3 (100 нг/мл) и лизировали таким же образом, как указано выше. Лизаты центрифугировали при 13000 об./мин. в течение 10 минут при 4°C и осторожно собирали надосадочные жидкости. Концентрацию белка измеряли с использованием набора для анализа белков BCA (Thermo Fisher, № 23252, Уолтэм, Массачусетс, США). Образцы белка (10-40 мкг) анализировали в 4-12% полиакриламидном геле Bolt® Bis-Tris Plus (Thermo Fisher, № NW04120BOX), заранее залитом в 10 или 15 лунок, и переносили на PDVF мембраны (GE Healthcare, № 10600021, Питтсбург, США). Мембраны блокировали в течение 2 часов при комнатной температуре посредством 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Bedford, Массачусетс, США) в буфере TBS с 0,05% Tween-20 (TBS-T, Amresco, Огайо, США) и инкубировали с соответствующим первичным антителом в буфере TBS-T с 5% BSA в течение ночи в холодной комнате при 4°C. Первичные антитела, использованные в этом исследовании, были следующими: антитело к фосфопротеину S6 Ser235/236 (№ 4858), антитело к белку S6 (№ 2217), антитело Phospho Akt Ser473 (№ 4060), антитело к Akt (№ 9272), антитело Phospho 4E-BP1 thr37/46 (№ 2855), антитело к 4E-BP1 (№ 9644), антитело к GAPDH (Santa Cruz, № sc365062). После промывки в течение 5 минут 5 раз на орбитальном шейкере с помощью TBS-T мембраны инкубировали со вторичными антителами [конъюгированными с HRP антителами к IgG кролика (№ HAF008), конъюгированными с HRP антителами к IgG мыши (HAF007)] от R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США] в 5% сухого молока в буфере TBS-T в течение 1 часа. Мембраны снова промывали с помощью TBS-T таким же образом, как описано выше, а затем инкубировали с реагентом для выявления ECL Prime для вестерн-блоттинга (Amersham, № RPN2232, Нью-Джерси, США) в течение 1-3 минут с последующим экспонированием на рентгеновские пленки (Denville, № E3018, Массачусетс, США) с использованием нескольких величин продолжительности экспозиции. Белковые полосы на пленке визуализировали с помощью съемочной камеры (Sony A600, Япония), а интенсивности полос количественно определяли с использованием (программного обеспечения Quantity-One, BioRad, v.4.6.9). Относительное содержание анализируемых белков в каждом образце определяли путем нормализации интенсивностей полос относительно содержания GAPDH в том же образце. Мембраны окрашивали 0,1% красителем кумасси бриллиантовым синим R (Thermo Fisher, США), промывали и фотографировали для подтверждения равной загрузки белка в каждой полосе.

[00216] Статистический анализ. Для сравнения размеров мышечных волокон между обработанными и необработанными группами проводили статистический анализ в

программном обеспечении Graph Pad Prism 6 с использованием однофакторного дисперсионного анализа (Anova). Для других статистических анализов проводили проверку по t-критерию Стьюдента или однофакторный Anova, когда это было применимо. Уровень значимости задавали при  $P < 0,05$ . Результаты приводили как среднее  $\pm$  SEM во всех экспериментах.

### **Результаты**

#### Индукционное AAV1.NT-3 ремоделирование типов волокон в мышце TrJ

[00217] Ранее в мышцах TrJ переход от волокон быстрого типа к волокнам медленного типа наблюдали как часть нейропатического фенотипа. Nicks et al., J Neuropathol Exp Neurol, 72(10):942-954 (2013). В этом исследовании окрашивание SDH использовали для оценки метаболической дифференцировки типов волокон в икроножной мышце TrJ и совпадающих по возрасту животных WT путем отбора образцов из глубоких, промежуточных и поверхностных зон мышцы, как описано. Через 16 недель после инъекции гена наблюдали заметное уменьшение STO волокон наряду с увеличением размера волокон, в частности типов FTO и FTG, по сравнению с группой без обработки (получавшей PBS), которая демонстрировала нейрогенные изменения, тонкие ангулярные волокна и группировки типов (фигуры 1A и B). Количественные исследования показали, что в мышцах TrJ-PBS показатели как количества на единицу площади, так и процента STO-волокон были значительно выше, чем в мышцах WT, что соответствует предыдущим исследованиям. В группах с обработкой AAV1.NT-3 в дозе  $1 \times 10^{11}$  в. г. с обоими промоторами, приводящими либо к низкой (tMCK), либо к высокой (CMV) экспрессии NT-3 (фигура 4), демонстрировал переключение типа волокон с STO- на FTO/FTG-волокна. Средняя плотность или процент STO (полученный от  $n=3-5$  мышей в каждой группе) в обеих группах с обработкой не отличались значительно от мышцы WT, что указывает на изменение в направлении нормализации распределения волокон с NT-3 (фигура 1C). Более того, мышца обработанных посредством AAV1.NT-3 животных WT не демонстрировала значительного изменения профиля распределения волокон по типу.

[00218] Обработка NT-3 у мышей TrJ демонстрировала дифференциальный эффект в отношении увеличения размера мышечных волокон (таблица 2). Когда NT-3 экспрессировался под контролем промотора tMCK, наблюдали значительное увеличение диаметра только для FTG-волокон. Во второй получавшей обработку когорте, где достигалась высокая экспрессия NT-3 с использованием промотора CMV, наблюдали значительное увеличение диаметра для всех типов волокон. Интересно отметить, что этот зависимый от дозы эффект NT-3 наблюдали только в нейрогенной мышце TrJ; при этом не наблюдали какого-либо значительного изменения диаметра ни для одного из типов волокон в мышце WT, подвергнутой направленной на NT-3 генной терапии, в тот же момент времени, через 16 недель после инъекции гена.

[00219] В таблице 2 показано, что увеличение размера волокон в нейрогенной мышце TrJ после направленной на NT-3 генной терапии более заметно для быстросокращающихся волокон.

## Средний диаметр волокон

	WT (n=3)		WT +NT3 (n=4)		TrJ-PBS (n=3)		TrJ-tMCK (n=4)		TrJ-CMV (n=5)	
	Число	Диаметр (мкм)	Число	Диаметр (мкм)	Число	Диаметр (мкм)	Число	Диаметр (мкм)	Число	Диаметр (мкм)
<b>STO</b>	315	31.4 ± 0.35	413	31.25 ± 0.32	605	28.52 ± 0.29*	524	29.41 ± 0.23	436	33.46 ± 0.4*
<b>FTO</b>	262	38.09 ± 0.5	378	37.35 ± 0.39	273	34.32 ± 0.65*	457	35.33 ± 0.47	374	39.15 ± 0.6*
<b>FTG</b>	383	46.02 ± 0.45	525	45.76 ± 0.4	194	39.79 ± 0.74*	505	43.77 ± 0.41*	458	44.35 ± 0.52*
<b>Все волокна</b>	960	39.06 ± 0.32	1316	38.79 ± 0.28	1072	32.04 ± 0.3*	1486	36.11 ± 0.27*	1268	39.07 ± 0.32*

\*,  $p < 0,001$

AAV-NT-3 улучшал передачу сигнала mTOR и метаболические маркеры в мышце

TrJ

[00220] Вышеуказанные гистологические наблюдения, обнаруженные в мышце TrJ в ответ на обработку AAV1.NT-3, побудили провести исследование в отношении того, участвует ли активация mTORC1 в индуцированном NT-3 радиальном росте мышечных волокон. Активность mTORC1 оценивали по уровням фосфорилирования его расположенных ниже по сигнальному каскаду субстратов, представляющих собой 4EBP-1 и рибосомального S6P, в мышечных образцах, отобранных из групп. В мышце TrJ, обработанной AAV1.NT-3, уровни фосфорилированных 4EBP-1 и S6P значительно увеличивались по сравнению с необработанными аналогами, полученными из TrJ-PBS-контролей (фигура 2A). В то же время обнаружили, что обработка NT-3 не оказывала значительного влияния на уровни фосфорилирования 4EBP-1 и S6P в мышце WT (фигура 2B).

[00221] Посредством 4E-BP mTORC1 регулирует синтез кодируемых ядром митохондриальных белков, контролирует митохондриальную активность и биогенез, таким образом координируя потребление и продуцирование энергии [17]. Соответственно, главный регулятор митохондриального биогенеза PGC 1 $\alpha$  подвергался повышающей

регуляции в обработанной NT-3 мышце TrJ, что указывает на то, что NT-3 способен обращать уровни дефектной экспрессии PGC 1 $\alpha$ , наблюдаемые в нейрогенной мышце (фигура 2С). В сочетании с отсутствием активации mTORC1 не было обнаружено изменения в уровнях экспрессии PGC 1 $\alpha$  в мышце WT при обработке NT-3 (фигура 2С). Увеличение размера волокон в мышце TrJ при направленной на NT-3 генной терапии в основном происходило в FTO- и FTG-волокнах, которые обладают большей гликолитической активностью, чем медленные волокна [18]. В соответствии с этим было также обнаружено, что экспрессия ограничивающих скорость ферментов гликолиза HK1 и PK1 в обработанной мышце TrJ подвергалась повышающей регуляции, свидетельствуя об увеличении гликолитического потока. Эти изменения не были значительными в мышце WT, обработанной AAV.NT-3.

#### NT-3 активирует сигнальный путь Akt/mTORC1 посредством рецепторов TrkC в миотрубочках C2C12

[00222] Исследования *in vivo*, описанные в настоящем документе, показали, что индуцированное обработкой AAV1.NT-3 увеличение размера волокон и ремоделирование типа волокон в мышце TrJ связано с активацией mTORC1. Однако вопрос в отношении того, является ли это изменение исключительно следствием реиннервации, или NT-3, независимо от регенерации нерва, может напрямую изменять синтез мышечного белка и клеточный метаболизм, нуждается в ответе. В качестве следующего шага исследовали непосредственные эффекты NT-3 в отношении сигнального пути mTOR в системе *in vitro*, не предусматривающей нервного влияния, путем воздействия рекомбинантным NT-3 на миобласт C2C12 и миотрубочки. Результаты указывают на то, что NT-3 может индуцировать активацию сигнального пути Akt/mTOR в миотрубочках (фигура 3А), но не в миобластах. Обработка миотрубочек 100 нг рекомбинантного NT-3 в течение 30 минут приводила к значительно более высокому фосфорилированию Akt, 4EBP1 и S6P по сравнению с контрольной группой (фигура 3А). В другой серии экспериментов установили, что NT-3 значительно усиливал экспрессию маркера митохондриального биогенеза PGC 1 $\alpha$  и маркера гликолиза PK1 в миотрубочках после 48-часовой инкубации (фигура 3В). Соответственно, анализ надосадочных жидкостей в этот момент времени выявил повышенное потребление глюкозы и продуцирование лактата в миотрубочках, обработанных NT-3, по сравнению с контролем (фигура 3С). В условиях, в которых проводили эти эксперименты, какого-либо эффекта NT-3 в отношении уровней экспрессии HK1 не наблюдали.

[00223] Анализировали экспрессию рецепторов p75NTR и TrkC и миогенина, который является маркером для вступления миобластов на путь дифференцировки в культурах миобластов и миотрубочек. NT-3 проявляет свой биологический эффект посредством своего предпочтительного рецептора TrkC или связывания с низкоаффинным рецептором нейротрофина p75NTR. Schecterson LC, Bothwell M, Neuron, 9(3):449-463 (1992). p75NTR экспрессируется в миобластах C2C12 и подвергается понижающей регуляции во время миогенной дифференцировки. Seidl et al., Journal of cellular physiology,

176(1):10-21 (1998). Было показано, что нейротрофический фактор NGF влияет на миогенную дифференцировку и рост клеток посредством p75NTR, и считается, что понижающая регуляция p75NTR является существенной для миогенной дифференцировки. Обнаружили, что, подобно эффектам NGF, NT-3 также усиливал экспрессию миогенина в миотрубочках, и, как и ожидалось, это было связано со значительно более высокой экспрессией p75NTR в миобластах по сравнению с миотрубочками, тогда как уровни экспрессии TrkC не отличались в обеих группах (фигура 3D). NT-3 не оказывает дифференциального эффекта в отношении уровней экспрессии этих рецепторов в миобластах или в миотрубочках.

### **Обсуждение**

[00224] В настоящем документе представлены доказательства того, что NT-3 может оказывать прямой эффект в отношении метаболизма нейрогенных мышц, приводя к увеличению размера волокон и ремоделированию типа волокон в направлении нормализации посредством активации mTORC1. Увеличение размера волокон было наиболее заметным для волокон II типа, особенно для подтипа FTG. Более того, показано, что NT-3 может непосредственно индуцировать активацию сигнального пути Akt/mTOR в миотрубочках, но не в миобластах, что является важным фактором, влияющим на его *in vivo* эффект в нейрогенной мышце. Интересно отметить, что направленная на NT-3 генная терапия в мышце WT в той же дозе не влияла на эти свойства, хотя эффект NT-3 в отношении денервированной мышцы WT с использованием подхода генной терапии изучению не подвергался. Дифференциальный эффект NT-3 в отношении подтипа мышечных волокон II типа ранее был показан на икроножной мышце крысы через 8 месяцев после восстановления нерва с локальной доставкой NT-3 в участок повреждения нерва или без таковой, и было обнаружено, что как доля, так и размер волокон IIb типа возвращались в норму. Sterne et al., *J Cell Biol*, 139(3):709-715 (1997). Этот эффект, тем не менее, интерпретировали как усиленную NT-3 регенерацию аксонов, положительно сказывающуюся на двигательном органе-мишени, а также возможность того, что NT-3 может специфически влиять на подгруппу моторных нейронов, которые определяют фенотип мышечных волокон IIb типа. Можно утверждать, что результаты исследований *in vivo*, полученные авторами настоящего изобретения, могут представлять сочетанный эффект NT-3 как в отношении нерва, так и в отношении мышцы. Однако данные *in vitro*, полученные авторами настоящего изобретения, подтверждают данные, свидетельствующие о том, что NT-3 оказывает прямой эффект в отношении метаболизма мышц посредством активации Akt/mTORC1, и что этот прямой эффект, вероятно, важен для нейрогенной мышцы, приводя к преимущественному увеличению размера FTG, т. е. волокон типа Erb.

[00225] У условно трансгенных мышцей экспрессия конститутивно активной формы Akt приводит к мышечной гипертрофии за счет роста мышечных волокон III типа. Izumiya et al., *Cell metabolism*, 7(2):159-172 (2008). Это было связано с повышающей регуляцией транскриптов, участвующих в гликолизе, повышенным потреблением глюкозы и продуцированием лактата, что было связано с более низкими уровнями инсулина,

повышенными уровнями глюкогона в крови и устойчивостью к ожирению, вызванному рационом с высоким содержанием жиров. И наоборот, инактивация mTOR была связана со снижением уровня гликолитических ферментов PK1 и HK1. Risson et al., *J Cell Biol*, 187(6):859-874 (2009). В исследованиях авторов настоящего изобретения обработка с помощью AAV.NT-3 в мышце TrJ увеличивала как размер FTG-волокон, так и экспрессию гликолитических ферментов PK-1 и HK-1. Кроме того, исследования *in vitro* показали, что NT-3 увеличивал поглощение глюкозы и образование лактата в миотрубочках наряду с повышающей регуляцией PK-1. Хотя эти результаты свидетельствуют о том, что NT-3 может участвовать в контроле метаболизма всего организма путем регулирования быстрых/гликолитических волокон, необходимы дальнейшие исследования, чтобы подробно охарактеризовать его роль. Кроме того, обработка с помощью AAV.NT-3 была способна обращать уровни дефектной экспрессии PGC1 $\alpha$ , наблюдаемые в нейрогенной мышце TrJ, наряду с повышенными уровнями активированного 4E-BP1. Ранее предполагалось, что в скелетной мускулатуре mTOR регулирует митохондриальный биогенез и метаболизм посредством 4E-BP1/PGC1 $\alpha$ . Tsai et al., *J Clin Invest*, 125(8):2952-2964 (2015). NT-3 также может участвовать в стимулировании окислительного фосфорилирования посредством активации 4EBP1 и PGC 1 $\alpha$  в мышце.

[00226] NT-3 обнаруживается на высоких уровнях сначала в центральной нервной системе (ЦНС) во время развития плода и снижается в головном мозге во взрослом возрасте, что позволяет предположить, что он играет центральную роль в раннем развитии нейронов [28, 29]. NT-3 также важен для периферических нервов и оказывает положительные эффекты на нескольких стадиях развития нейромышечной системы. В совместных культурах нервных и мышечных клеток *Xenopus* происходящий из мышц NT-3 значительно ускоряет созревание синаптической передачи в нейромышечном соединении [30-33]. Более того, NT-3 повышает выживание важнейшего элемента нейромышечной системы SC [34]. NT-3, экспрессируемый в SC, способствует регенерации нервов и является важным компонентом аутокринной петли выживания, обеспечивая выживание и дифференцировку SC в нервах у взрослых [35-39]. В исследованиях на мышечных моделях CMT1A наблюдали несколько важных биологических эффектов NT-3: (i) увеличение количества SC, (ii) увеличение количества миелинизированных волокон и (iii) нормализация аксонального цитоскелета из нейрофиламентов [5, 40]. Другой эффект NT-3, представляющий в настоящем документе особый интерес, заключается в увеличении толщины слоя миелина, что было воспринято как морфологическое доказательство того, что NT-3 может влиять на продуцирование белка миелина.

[00227] В более ранних исследованиях получены многочисленные свидетельства того, что mTORC1 играет роль в регуляции миелинизации в ЦНС. Трансгенная надэкспрессия конститутивно активной Akt-киназы достаточна для усиления роста миелиновой мембраны в ЦНС за счет передачи сигнала mTOR [41, 42], а для синтеза белка, стимулированного IGF-1, в олигодендроцитах-предшественниках требуются сигнальные пути PI3K/Akt и MEK/ERK [43]. Способность NT-3 нацеливаться на трансляционные

механизмы для стимуляции синтеза белка миелина была впервые показана в первичных культурах олигодендроцитов [44]. Было обнаружено, что NT-3 обеспечивает повышающую регуляцию фосфорилирования 4EВP1 в олигодендроцитах посредством сигнального пути PI3K/mTOR. При использовании подхода инактивации генов специфическая абляция функции mTOR в SC влияла на их способность к нормальной миелинизации [45]. Фактически, было обнаружено, что у мутантов миелиновая оболочка была тонкой, длина между узлами была короткой, а радиальный рост аксонов был нарушен. Наряду с этим расположенные ниже по сигнальному каскаду мишени mTOR S6 и 4E-BP1 характеризовались меньшей степенью фосфорилирования [45].

[00228] В свете этих предшествующих исследований, возможно, что эффект NT-3 в отношении увеличения диаметра мышечных волокон реализуется посредством того же механизма, непосредственного эффекта посредством активации mTORC1. Важно отметить, что направленная на NT-3 генная терапия в мышце WT, проводимая при той же дозе, которая использовалась в TrJ, не индуцировала значительного изменения в размерах типов волокон или распределения типов волокон. Эти наблюдения в мышце WT дают основание предположить, что эффект NT-3 не направлен на хорошо дифференцированные или нормально функционирующие клетки, а скорее является функциональным в отношении метаболизма ремоделированных клеток, который может являться результатом патологического процесса. Одним из подтверждающих доказательств является то, что NT-3 не изменяет функциональное восстановление после повреждения с размождением тканей у животных WT, приводя только к несколько большему увеличению числа аксонов, чем у контрольных или обработанных NGF животных [46]. Токсикологические исследования авторов настоящего изобретения, оценивающие scAAV1.tMCK.NT-3, согласуются с этими наблюдениями, демонстрируя отсутствие связанной с обработкой токсичности или гистопатологических аномалий тканей органов у мышей C57BL/6 или TrJ, получавших дозу  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг, что в 10 раз выше, чем самая высокая доза, предложенная для клинических испытаний на людях, проводимых в отношении лечения СМТ1А.

[00229] Во время развития мышц p75NTR временно экспрессируется в миобластах, которые сформируют миотрубочки/мышечные волокна или дифференцируются в клетки-сателлиты [23]. Временной паттерн экспрессии рецептора указывает на то, что p75NTR опосредует выживание миобластов до дифференцировки, и что активность этого рецептора во время миогенеза важна для развития мышцы [23]. Подобно эффекту NGF [21], было обнаружено, что NT-3 усиливает экспрессию миогенина в миотрубочках, и, как и ожидалось, это было связано с крайне более высокой экспрессией p75NTR в миобластах, которая подвергается значительному понижающему регулированию в миотрубочках. Исследовали экспрессию p75NTR и TrkC в образцах мышц TrJ и WT, и обнаружили значительно более высокие уровни экспрессии обоих в нейрогенной мышце TrJ по сравнению с WT, и уровни подвергались снижению в ответ на NT-3 (фигура 5). Хотя это наблюдение интересно, оно не позволяет сделать какое-либо заключение относительно того, какие типы клеток экспрессируют эти рецепторы, а также экспрессируются ли они во

всех или только в подтипе мышечных волокон, в клетках-сателлитах или SC. Доступные данные в отношении экспрессии NT-3 и других нейротрофинов и их рецепторов при мышечных заболеваниях человека ограничены. Тем не менее, недавние исследования, объединяющие гистологические исследования биоптатов мышц с молекулярными и клеточными анализами первичных мышечных клеток-предшественников показали, что p75NTR экспрессируется большинством клеток-сателлитов *in vivo* и является маркером регенерирующих волокон в воспаленной и дистрофической мышце [47, 48]. Данные авторов настоящего изобретения в отношении нейрогенной мышцы представляют особый интерес, и требуются более всесторонние исследования механизмов различных процессов заболевания.

[00230] Являясь консервативной Ser/Thr-киназой, mTOR является центральным регулятором роста клеток за счет интеграции сигналов от питательных веществ, факторов роста, энергетического статуса и стресса окружающей среды. В настоящее время большой интерес представляет важная роль mTOR в клеточной биологии и патофизиологии, в частности в мышце с исключительными метаболическими и морфологическими адаптационными способностями. mTOR связывается с raptor с образованием mTORC1, и было показано, что специфическая в отношении мышцы инактивация raptor приводит к мышечной атрофии, нарушению окислительной способности и увеличению запасов гликогена, что приводит к дистрофическим признакам, которые были наиболее выражены в окислительных мышцах [49]. С другой стороны, потеря активности mTOR усугубляет миопатические признаки как в медленных окислительных, так и в быстрых гликолитических мышцах и демонстрирует метаболические изменения, сходные с теми, которые наблюдаются в мышцах без raptor, включая нарушение окислительного метаболизма, измененную регуляцию митохондрий и накопление гликогена [26]. В исследованиях с использованием подхода с индуцированными кардиотоксином циклами некроза/регенерации мышц авторы настоящего изобретения недавно продемонстрировали нарушение регенерации в мышечной модели тазово-плечевой мышечной дистрофии 2A типа и показали, что нулевая по кальпаину-3 мышца характеризуется пертурбациями в передаче сигнала mTORC1 и дефектным митохондриальным биогенезом (в обзоре). В своей совокупности результаты, описанные в настоящем документе, имеют много предпосылок для потенциального применения NT-3 не только для лечения нейропатий с положительными эффектами как в отношении нерва, так и в отношении мышцы, но также и для связанных с истощением мышечной ткани состояний, включая старение, раковую кахексию или атрофию мышечных волокон II типа, а также генетические или приобретенные аутоиммунные первичные мышечные нарушения, связанные с нарушенной фазой радиального роста при регенерации [50-52]. Понимание роли пертурбаций в передаче сигнала mTOR при этих нарушениях должно позволить разработку новых комбинированных терапевтических стратегий, в которых NT-3 может играть важную роль.

## **Пример 2**

### **Доставка NT-3 с использованием вектора scAAV1.tMCK.NFT3**

[00231] Вводимая композиция основана на нереплицирующемся рекомбинантном аденоассоциированный вирусе под названием scAAV1.tMCK.NTF3, который показан на фигуре 3. Вектор содержит ген NT-3 человека под контролем специфичного для мышц промотора tMCK. *In vivo* биоактивность будет тестироваться после внутримышечной инъекции вектора ( $1 \times 10^{11}$  в. г.) в икроножные мышцы мышей C57B16 с последующим количественным определением циркулирующего NT-3 в сыворотке крови с помощью ELISA через 4-6 недель после инъекции гена.

[00232] Сначала демонстрировали, что ssAAV1.CMV.NTF3, доставленный в икроножную мышцу, обеспечивал пролонгированные и терапевтические уровни NT-3 в крови, достаточные для обеспечения функционального, электрофизиологического и гистопатологического улучшения нервов TrJ. Затем исследовали, возможно ли получить требуемую дозу вектора и достичь того же уровня экспрессии путем упаковки кассеты экспрессии с помощью scAAV1. Исследование доза-ответ проводили на мышах C57BL/6, сравнивая данные ELISA по сывороточному NT-3 после внутримышечной инъекции scAAV1.tMCK.NTF3 и scAAV1.CMV.NTF3 в 3 дозах ( $3 \times 10^9$  в. г.,  $1 \times 10^{10}$  в. г. и  $3 \times 10^{10}$  в. г.). Введение вектора scAAV1.CMV.NTF3 при  $1 \times 10^{11}$  в. г. обеспечивало значительно более высокие уровни NT-3, чем однокитевой вектор при той же дозе, что согласуется с большей активностью, наблюдаемой при использовании самокомплементарных векторов. При уменьшенной на половину логарифма дозе ( $3 \times 10^{10}$  в. г.) векторы как с CMV, так и с tMCK обеспечивали сывороточные уровни NT-3, сопоставимые с уровнями, полученными от мышей, получавших ssAAV1.CMV.NTF3 в дозе  $1 \times 10^{11}$  в. г., что обеспечивало биологический ответ. Уровни NT-3 (среднее  $\pm$  SEM) у мышей TrJ через 24 недели после инъекции. Существует значительная разница в уровнях NT-3 среди всех 7 групп при значении  $p < 0,0001$ . Значительную разницу в уровнях NT-3 наблюдали для самых высоких и промежуточных доз векторов для обоих промоторов и контроля. Тем не менее, анализ не смог выявить значительную разницу для более низких доз для обоих векторов. Использовали критерий Краскела-Уоллиса для сравнения сывороточного NT-3 между всеми группами (PBS, CMV  $3E+09/1E+10/3E+10$  и tMCK  $3E+09/1E+10/3E+10$ ). Использовали U-критерий Манна-Уитни для сравнения NT-3 между каждой группой и получавшей PBS (контрольной) группой и использовали поправку Бонферрони для коррекции в отношении множественных сравнений. См. Sahenk et al., Mol. Ther. 22(3): 511-521, 2014, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00233] Мышечный диаметр увеличивался через 40 недель после обработки. Эффекты направленной на NT-3 генной терапии оценивали у мышей TrJ по размеру мышечного волокна через 40 недель после инъекции в подгруппе животных, получавших инъекцию ssAAV1.CMV.NTF3 ( $1 \times 10^{11}$  в. г.), по сравнению с получавшими PBS. Нейрогенные изменения, характеризующиеся атрофическими ангулярными волокнами и групповой атрофией, были очевидны в мышцах необработанных мышей, в то время как свидетельства реиннервации в виде группировок типов волокон и общего увеличения

размера волокон определяли как эффект обработки. Гистограммы размера мышечных волокон, полученные для контралатеральных мышц переднего и заднего отделов левой нижней конечности (передней большеберцовой и икроножной мышцы), показали увеличение диаметра волокон.

[00234] Дополнительные исследования в лаборатории авторов настоящего изобретения показали, что NT-3 стимулирует сигнальный путь Akt/mTOR в клетках SC, вызывая улучшенные миелинизацию и радиальный рост аксонов в нерве, и NT-3 также оказывает прямой стимулирующий эффект в отношении миотрубочек посредством рецепторов Trk-C, что указывает на его роль в увеличении диаметра волокон в мышцах мышей TrJ. На фигуре 3А показано, что NT-3 усиливает фосфорилирование мишеней Akt (P-Akt) и mTOR, представляющих собой 4EBP-1 (P-4EBP1) и pS6K (P-S6K), в культурах SC и миотрубочек. Эти исследования предоставляют доказательства, оправдывающие сделанный авторами настоящего изобретения выбор в пользу использования передней и задней мышц голени для доставки вектора в этом клиническом испытании.

Исследования с использованием самокомплементарного (sc) AAV1 и применением специфичного для мышц усеченного промотора креатинкиназы (tMCK)

[00235] scAAV позволяет снизить дозировку, что в совокупности повышает безопасность и уровни введения дозы, что будет отвечать производственным стандартам. Применение промотора tMCK имеет важное значение, что опять-таки обеспечивает более высокую безопасность за счет избегания нецелевых эффектов. В следующей серии экспериментов эффективность scAAV1.NTF3 под контролем промотора CMV сравнивали со специфичным для мышц промотором tMCK, оба из которых вводили в трех дозах в полулогарифмическом диапазоне ( $3 \times 10^9$  в. г.,  $1 \times 10^{10}$  в. г. и  $3 \times 10^{10}$  в. г.). Эффективность переноса гена AAV1.NTF3 в периферических нервах мышей TrJ оценивали с помощью электрофизиологических (таблица 3) и морфологических исследований через 24 недели после переноса гена. Подтверждение экспрессии трансгена оценивали путем измерения уровней NT-3 в сыворотке крови с помощью ELISA.

[00236] Таблица 3. CMAP и скорость проводимости в седалищном нерве TrJ

Группа с обработкой (число)	Задержка (мс)	Продолжи- тельность (мс)	СМАР (мВ)	Площадь (мВмс)	Скорость проводимости (м/с)	
PBS	29	2,36 ± 0,08	7,00 ± 0,42	0,42 ± 0,03*	0,70 ± 0,09	8,24 ± 0,43
AAV1.NTF3.CMV- HD	23	2,43 ± 0,10	6,58 ± 0,50	0,57 ± 0,04*	0,84 ± 0,09	10,30 ± 0,65
AAV1.NTF3.tMCK- HD	27	2,52 ± 0,07	5,64 ± 0,49	0,54 ± 0,03**	0,64 ± 0,04	8,90 ± 0,56
AAV1.NTF3.CMV- ID	21	2,08 ± 0,09	5,20 ± 0,38	0,46 ± 0,04	0,61 ± 0,07	9,00 ± 0,63
AAV1.NTF3.tMCK- ID	26	2,20 ± 0,08	5,85 ± 0,42	0,45 ± 0,03	0,61 ± 0,06	9,01 ± 0,40
AAV1.NTF3.CMV- LD	22	2,23 ± 0,10	6,38 ± 0,53	0,48 ± 0,04	0,68 ± 0,07	8,95 ± 0,74
AAV1.NTF3.tMCK- LD	23	2,18 ± 0,06	7,29 ± 0,60	0,43 ± 0,03	0,80 ± 0,08	8,40 ± 0,59

\*p = 0,0017; \*\*p = 0,0051; значения представляют собой среднее ± SEM; HD = высокая доза; ID = промежуточная доза; LD = низкая доза.

[00237] Эксперт в ходе электродиагностических исследований не был осведомлен о группах с обработкой. Не имелось статистической разницы между AAV1.NTF3.CMV (высокая доза, HD) и AAV1.NTF3.tMCK (высокая доза, HD) в отношении СМАР, и предпочтение отдавали использованию специфичного для мышц промотора tMCK. Это дополнительно подтверждалось уровнями NT-3 в анализе ELISA, при этом наблюдали значительную разницу в уровнях NT-3 для самых высоких и промежуточных доз векторов как для обоих промоторов, так и для контроля.

[00238] Полные раскрытия всех патентов, патентных заявок и публикаций и доступного в электронном виде материала, цитируемого в настоящем документе, включены посредством ссылки. Вышеизложенное подробное описание и примеры приведены исключительно для ясности понимания. Их не следует толковать как предусматривающие какие-либо необязательные ограничения. Настоящее изобретение не ограничивается точными деталями, показанными и описанными, поскольку вариации, очевидные для специалиста в данной области, будут включены в изобретение, определяемое формулой изобретения.

### Пример 3

Конструирование экспрессирующей NT-3 конструкции на основе AAV

[00239] Конструкция самокомплементарных вирусных векторов AAV с серотипом 1, содержащих кДНК NT-3 под управлением промотора tMCK или CMV, описана ранее в Sahenk et al., Mol Ther, 22(3):511-521 (2014), которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Аликвотированные вирусы выдерживали при -80°C до применения. Собирали образцы крови от обработанных и необработанных мышей путем кровопускания из сосуда глаза под анестезией через 6 и 16 недель после инъекции, и сыворотку крови анализировали на предмет уровней NT-3 с использованием ELISA с захватом. Конструкция в настоящем документе обозначается как scAAV1.tMCK.NTF3.

[00240] Последовательность промотора/энхансера tMCK использовали для

управления специфичной для мышц экспрессией гена, и она состояла из промотора мышечной креатинкиназы с добавленным энхансерным элементом (enh358MCK, 584 п. о.), слитым с ним. Тройной тандем энхансера MCK (206 п. н.) лигировали с основным промотором размером 87 п. о. с получением промотора/энхансера tMCK.

[00241] Лекарственный продукт scAAV1.tMCK.NTF3 получали с помощью трансфекции 3 плазмидными ДНК человеческих клеток HEK293 из Master Cell Bank с использованием: (i) векторной плазмиды pAAV.tMCK.NTF3 (см. фигуру 7), (ii) хелперной плазмиды на основе AAV1, называемой R88/C1, содержащей гены гер2 и Cap1 AAV дикого типа, и (iii) хелперной аденовирусной плазмиды.

[00242] Схематическое представление плазмиды с молекулярными особенностями и открытыми рамками считывания показано на фигуре 7. Геном AAV-вектора, получаемый из плазмиды pAAV.tMCK.NTF3, представляет собой самокомплементарный ДНК-геном, содержащий кассету экспрессии с кДНК NTF3 человека, фланкированную последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV2. Именно эта последовательность инкапсидируется в вирионы AAV1. Плазмиду pAAV.tMCK.NTF3 конструировали, вставляя кассету экспрессии с tMCK, управляющим последовательностью гена NTF3, в клонирующий вектор AAV psub201. Ген NTF3 человека экспрессируется под управлением мышечного трехтандемного промотора MCK, который является модификацией ранее описанного промотора СК6 и содержит тройную E-бокс-последовательность. Сигнал полиаденилирования SV40 использовали для эффективной терминации транскрипции. Кассета также содержит химерный интрон для повышенной экспрессии гена, и он состоит из 5'-донорного сайта от первого интрона гена  $\beta$ -глобина человека и точки ветвления и 3'-сайта акцептора сплайсинга от интрона, который находится между лидерной областью и телом варибельной области тяжелой цепи гена иммуноглобулина. Кассета экспрессии NTF3 имеет консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом ATG и 200 п. о. сигнал поли-A SV40 для эффективной терминации мРНК. кДНК NTF3 включена полностью (эталонная последовательность NCBI: NM\_001102654). Единственные вирусные последовательности, включенные в этот вектор, представляют собой инвертированные концевые повторы AAV2, которые необходимы как для репликации вирусной ДНК, так и для ее упаковки. ITR AAV представляют собой последовательности, которые почти идентичны на обоих концах, но находятся в противоположной ориентации. В "левом" (мутантном) ITR делетирован сайт концевое разрешение, что позволяет геному формировать шпильку. Идентичность всех элементов ДНК-плазмиды подтверждается секвенированием ДНК-плазмиды, производимом в отношении исходного раствора плазмиды в качестве источника.

[00243] В таблице 4 показаны местоположения пар оснований соответствующих молекулярных признаков в ДНК-плазмиде на основе AAV-вектора под SEQ ID NO: 11.

Таблица 4. Молекулярные признаки плазмиды sc pAAV.tMCK.NTF3				
ТИП	НАЧАЛО	КОНЕЦ	НАЗВАНИЕ	ОПИСАНИЕ

ОБЛАСТЬ	7	112	5'-ITR	Инвертированный концевой повтор AAV2 с делетированным сайтом концевой разрешения
ОБЛАСТЬ	147	860	Промотор/энхансер tMCK	Промотор/энхансер мышечной креатинкиназы мышцы
ОБЛАСТЬ	892	1024	химерный интрон	5'-донорный сайт из человеческого $\beta$ -глобина и точка ветвления и 3'-сайт акцептора сплайсинга из варибельной области HC IgG
ГЕН	1077	1850	Ген NTF3 человека	Ген NTF3 человека
ОБЛАСТЬ	1860	2059	pA SV40	Сигнал полиаденилирования SV40
ОБЛАСТЬ	2121	2248	3'-ITR	Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа
ГЕН	4032	4892	AmpP <sup>r</sup>	Ген устойчивости AmpP <sup>r</sup>
ОБЛАСТЬ	5040	5707	ori	Точка начала репликации плазмиды

#### Пример 4

##### Фаза I исследования по внутримышечному введению

[00244] Для начальной фазы I исследования безопасности внутримышечного (в/м) введения устойчивая экспрессия трансгена NT-3 является предложенным критерием эффективности на этой первой фазе и является важной по нескольким причинам. Истинная оценка токсичности зависит от демонстрации экспрессии генов. Если мышца не трансдуцирована, то тесты на токсичность (побочные эффекты) будет труднее интерпретировать (неудача трансдукции в сравнении с потерей экспрессии гена). Исследование дает возможность установить способы для однозначного распознавания экспрессии трансгена и дифференцирования его от экспрессии эндогенного гена.

[00245] Это клиническое испытание представляет собой открытое исследование однократной инъекции с нарастающей дозой, при котором scAAV1.tMCK.NTF3 вводят путем внутримышечной инъекции в икроножные и передние большеберцовые мышцы обеих ног субъектов с СМТ1А с дубликацией гена PMP22. Девять взрослых пациентов с СМТ1А возрастом 18 лет и старше включали в одну из двух когорт в этом испытании. Первых трех субъектов включали в когорту 1, предусматривающую низкую минимально

эффективную дозу ( $2,0 \times 10^{12}$  в. г./кг), распределенную билатерально между обеими конечностями. Дополнительно шесть субъектов включали когорту 2, предусматривающую увеличение дозы в 3 раза ( $6,0 \times 10^{12}$  в. г./кг). Мониторинг после переноса гена включает в себя визиты последующего наблюдения в дни 7, 14, 30, 60, 90, 120 и с интервалами 3 месяца в течение оставшейся части испытания, продолжающегося в течение 2 лет. Безопасность является первичной конечной точкой этого клинического испытания переноса гена. Критерии прекращения основаны на развитии неприемлемой токсичности, определяемой как возникновение любой глазной или системной токсичности II степени, не разрешающейся через две недели, или любой токсичности III степени или выше. Вторичной конечной точкой является эффективность, определяемая как прекращение снижения способностей, что измерено по педиатрической шкале СМТ (СМТPedS) через 2 года после переноса гена. СМТPedS представляет собой 11-компонентную шкалу, включающую функциональный тест на ловкость, тест с девятью отверстиями и стержнями (9НРТ), определение силы сжатия рукой, подошвенного сгибания стопы и тыльного сгибания стопы с использованием ручной миометрии, чувствительность к уколу и вибрации, тест Бруининк-Озерецкого с оценкой баланса, оценку походки, прыжок в длину и тест шестиминутной ходьбы (6MWT). Исследуемые критерии эффективности будут включать в себя тест на время прохождения 100 метров (100M), амплитуду СМАР перонеального и локтевого нервов и скорость проводимости сенсорного и моторного нервов, пересмотренное сенсорное тестирование с повышением чувствительности к уколу, тест с использованием прикосновения и оценку на чувствительность к вибрации, шкалы визуальных аналогов боли и усталости, краткий опросник по оценке состояния здоровья (SF-36) как показатель качества жизни и уровни NT-3 в кровообращении.

[00246] Включенные в испытание пациенты принадлежат любым расе, этнической группе или полу. Критерии для этого заболевания были определены и будут следовать руководящим принципам, ранее установленным Shy et al. (*Neurology* 64: 1209-1214, 2001 и *Neurology* 70:378-383, 2008).

[00247] Далее приведены критерии включения в исследование.

Взрослые субъекты (> 18 лет) с диагнозом СМТ1А.

Должны иметь дупликацию 1,5 Мб в 17p11.2, включающую ген периферического белка миелина 22 (PMP22).

Мужчины и женщины любой этнической или расовой группы.

Должны демонстрировать слабость мышцы, обеспечивающей дорсифлексию голеностопа (должны иметь полный ROM преодоления силы тяжести, но не могут поддерживать полную дорсифлексию при преодолении силы тяжести или не могут стоять на пятках в течение 3 секунд или больше (критерии Northstar)).

Аномальные значения скорости нервной проводимости.

Способность сотрудничать для клинической оценки и повторного исследования нервной проводимости.

Готовность, если являются сексуально активными субъектами, применять надежный

метод контрацепции на протяжении исследования.

[00248] Далее приведены критерии исключения из исследования.

Активная вирусная инфекция на основании клинических наблюдений или серологических признаков наличия инфекции ВИЧ или гепатита А, В или С.

Продолжающаяся иммуносупрессивная терапия или иммуносупрессивная терапия в течение 6 месяцев после начала исследования (например, кортикостероиды, циклоспорин, такролимус, метотрексат, циклофосфамид, внутривенный иммуноглобулин).

Персистирующая лейкопения или лейкоцитоз ( $WBC \leq 3,5$  тыс./мкл или  $\geq 20,0$  тыс./мкл) или абсолютное количество нейтрофилов  $< 1,5$  тыс./мкл.

Субъекты с титрами AAV1-связывающих антител  $\geq 1:50$ , как определено иммуноанализом ELISA.

Сопутствующее заболевание или потребность в хроническом лекарственном лечении, которое, по мнению главного исследователя, создает ненужные риски при переносе генов.

Контрактуры голеностопного сустава или хирургические вмешательства, препятствующие надлежащему тестированию мышечной силы.

Беременность, кормление грудью или планирование беременности.

Другие причины нейропатии.

Хирургическое вмешательство в отношении конечностей в последние шесть месяцев.

**Таблица 5. Схема исследования**

Когорта	Доза (в. г./кг)	*Масса пациента (кг)	*Конц. (в. г./мл)	Объем/70 кг пациента (мл)	Объем/нога (мл)	Иньекции и/нога (количество)
1. Билатеральная при низкой дозе (n=3)	$2 \times 10^{12}$	70	$1,5 \times 10^{13}$	9.33	4.67	5
2. Билатеральная при высокой дозе (n=6)	$6 \times 10^{12}$	70	$1,5 \times 10^{13}$	28.00	14	14

\*В таблице 5 в общих чертах представлен план введения дозы на основе веса пациента, составляющего 70 кг, в качестве примера. Объемы введения дозы основаны на концентрации целевого продукта, составляющей примерно  $1,5 \times 10^{13}$  в. г./мл.

***Исходные измерения до инъекции (от дня -30 до дня -1)***

[00249] После получения письменного информированного согласия и завершения процедур регистрации в больнице будут выполнены следующие исходные медицинские

процедуры и измерения.

Медицинский анамнез.

Прием сопутствующих лекарственных препаратов.

Физический осмотр.

Рентгенограмма грудной клетки.

Эхокардиограмма.

ЭКГ.

Гематологические анализы крови (CBC).

Параметры коагуляции: тромбоциты, PT/INR, PTT.

Клинические биохимические анализы крови: билирубин, азот мочевины в крови (BUN), GGT.

Щелочная фосфатаза, альфа-фетопротеин (AFP), креатинин, амилаза, электрофорез сывороточных белков, электролиты, глюкоза, креатинкиназа.

Анализ мочи.

Вирусный скрининг (гепатит и ВИЧ).

Тест на беременность (только женщины детородного возраста).

Иммунология крови: нейтрализующие антитела (AAV1) и ELISpots. (NT-3 и AAV1).

Сыворотка крови для ELISA (циркулирующий NT-3).

Критерии эффективности.

Исследовательские критерии.

Фотографии участка инъекции.

#### ***Доза преднизолона перед инъекцией***

[00250] Перед переносом гена каждый пациент получит пероральную дозу преднизона 1 мг/кг/сутки с максимальной дозой 60 мг/сутки, а затем вторую дозу в день переноса гена. Субъект будет получать преднизон через 24 и 48 часов после переноса гена, предусматривая в общей сложности 4 дозы.

#### ***Протокол для переноса гена***

[00251] Самокомплементарный AAV1, несущий ген NTF3 человека под контролем промотора tMCK (scAAV1.tMCK.NTF3), вводят однократной билатеральной внутримышечной инъекцией в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую (ТА) мышцу.

#### ***Процедура переноса гена***

[00252] Далее приведена процедура переноса гена.

Процедуру инфузии для переноса гена проводят в стерильных условиях.

Вектор доставляют без разбавителя в общем объеме от примерно 10 мл до 28 мл на пациента (5-14 мл на конечность, которые распределяют на 3 мышцы).

Вектор доставляют в процедурный кабинет в предварительно маркированных шприцах, запечатанных в двойные герметичные пакеты, переносимые в специальном маркированном холодильнике.

В общей сложности вводят от 5 мл до 14 мл вектора в каждую из латеральных головок икроножной мышцы и мышцы ТА, предусматривая в общей сложности от 3 до 6 инъекций на мышцу (объем каждой инъекции будет составлять 0,5-1,0 мл). См. схему участков инъекции на фигурах 8А и 8В.

Инъекции осуществляют на по меньшей мере 0,25 см ниже фасции, при этом инъекции выполняют, следуя по продольной оси мышцы, руководствуясь ультразвуком.

Каждая инъекция находится на расстоянии примерно 1,5 см друг от друга.

#### ***Мониторинг стационарных пациентов***

[00253] После инъекции для переноса гена субъектов возвращают в отведенную стационарную кровать с тщательным мониторингом показателей жизнедеятельности и дыхательной функции. Показатели жизнедеятельности контролируют примерно каждый час в течение первых 4 часов, а затем каждые 4 часа до выписки. Безопасность оценивают с помощью физического осмотра и лабораторной оценки. Субъектам дают третью дозу преднизона перорально (день 1), а четвертую и последнюю дозу преднизона дают на следующий день (через 48 часов после введения, день 2). Пациенты будут выписаны через примерно 48 часов после переноса гена (если не наблюдается побочных эффектов).

#### ***Мониторинг амбулаторных пациентов***

[00254] После выписки пациенты возвращаются для визитов последующего наблюдения в дни 7, 14, 30, 60, 90, 120 и с интервалами 3 месяца в течение оставшейся части испытания, продолжающегося в течение 2 лет после переноса гена. Образцы крови, получаемые при всех визитах, оценивают в отношении экспрессии белка NT-3, как продемонстрировано с антителами к NT-3 в сывороточном ELISA. Кроме того, пациенты будут тестироваться при визитах в дни 7, 9, 11, 13 и 14 в отношении критериев эффективности и исследовательских критериев. Сывороточный ELISA обеспечивает непосредственную меру экспрессии функционального гена со вторичными критериями эффективности, демонстрирующими эффективность циркулирующего трансгена.

#### ***Первичная конечная точка***

[00255] Безопасность является первичной конечной точкой этого клинического испытания переноса гена. Ее оценивают на основании развития неприемлемой токсичности, определяемой как возникновение каких-либо непредвиденных связанных с лечением проявлений токсичности III степени или выше.

#### ***Измерение безопасности***

[00256] Безопасность будут измерять в каждом исследовании со сбором данных в отношении роста и веса, показателей жизнедеятельности, физического осмотра и оценки систем и набора лабораторных анализов крови. Лабораторные анализы будут предусматривать СВС, тромбоциты, азот мочевины в крови (BUN), GGT, билирубин, щелочную фосфатазу, альфа-фетопроtein, креатинин, амилазу, электрофорез сывороточных белков, электролиты, глюкозу, PT/INR и PTT, СК, анализ мочи. Иммунология предусматривает нейтрализующие антител к AAV1 и ELISA для выявления антител к NT-3, ELISpots для выявления ответов Т-клеток на AAV1 и NT-3. Все

нежелательные явления будут регистрироваться и оцениваться на предмет их связи с переносом гена.

#### ***Вторичная конечная точка***

[00257] Вторичной конечной точкой клинического испытания переноса гена является эффективность, определяемая как прекращение снижения способностей, что измерено по педиатрической шкале СМТ (СМТPedS) через 2 года после переноса гена.

[00258] Тестирование мышечной силы верхней и нижней конечности проводят с помощью ручного динамометра для дистальных движений верхней конечности (сжатие рукой) и ног (дорсифлексия стопы). Подлежащую тестированию конечность иммобилизуют для тестирования, что значительно повышает достоверность измерений изометрического сокращения стопы (29). Функцию верхней конечности измеряют с помощью теста с 9 отверстиями и стержнями (9НРТ). Функцию нижней конечности измеряют с помощью теста времени пробегания/прохождения 10 метров (Т10МВ).

#### ***Исследуемые критерии эффективности***

[00259] Исследуемые критерии эффективности включают тест на время прохождения 100 метров (100М), амплитуду СМАР перонеального и локтевого нервов и скорость проводимости сенсорного и моторного нервов, пересмотренное сенсорное тестирование с повышением чувствительности к уколу, тест с использованием прикосновения и оценку на чувствительность к вибрации, шкалы визуальных аналогов боли и усталости, краткий опросник по оценке состояния здоровья (SF-36) как показатель качества жизни и уровни NT-3 в кровообращении.

[00260] Электрофизиологическое тестирование включает измерение амплитуды локтевого чувствительного нерва и амплитуды суммарного мышечного потенциала действия (СМАР) локтевого нерва (регистрируют с помощью мышцы, отводящей мизинец) и перонеального нерва (регистрируют с помощью передней большеберцовой мышцы) и показателей скорости сенсорной и моторной проводимости. Было показано, что амплитуда СМАР перонеального нерва от передней большеберцовой мышцы является применимым критерием эффективности для клинических испытаний у пациентов с СМТ1А (30); а для моторных симптомов верхних конечностей наиболее информативным параметром оказалась амплитуда СМАР локтевого нерва (31). Во время этих процедур тестирования температуры ног и рук будут поддерживаться на уровне 32-34°C. Шкалы визуальных аналогов будут использоваться для измерения боли и усталости (32). Краткий опросник по оценке состояния здоровья (SF-36) используют как документальный источник информации о качестве жизни для мониторинга и сравнения тяжести заболевания до и после лечения.

[00261] Пациентам предлагается финансовый стимул для проведения необязательных фасцикулярных биопсий икроножного нерва. В случае согласия биопсии проводят до начала лечения (из левого икроножного нерва) и в конце исследования (из правого икроножного нерва). Биопсии проводят при амбулаторном визите под местной анестезией. Ткани будут обработаны и исследованы для оценки эффектов NT-3 в отношении регенерации миелинизированного волокна. Для приведения в соответствие

уровней материала до и после лечения в отношении длины всего нерва проксимальный конец разреза (длиной 2,5 см) располагается точно на 10 см выше ахиллова сухожилия (8).

#### *Статистический анализ*

[00262] Безопасность является первичной конечной точкой этого клинического испытания переноса гена. Ее будут оценивать на основании развития неприемлемой токсичности, определяемой как возникновение каких-либо непредвиденных связанных с лечением проявлений токсичности III степени или выше. Безопасность будут измерять в каждом исследовании со сбором данных в отношении роста и веса, показателей жизнедеятельности, физического осмотра и оценки систем и набора лабораторных анализов крови. Лабораторные анализы будут предусматривать СВС, тромбоциты, азот мочевины в крови (BUN), GGT, билирубин, щелочную фосфатазу, альфа-фетопротеин, креатинин, амилазу, электрофорез сывороточных белков, электролиты, В12, глюкозу, PT/INR и PTT, СК, анализ мочи. Иммунология будет предусматривать нейтрализующие антитела к AAV1 и ELISA для выявления антител к NT-3, ELISpots для выявления ответов Т-клеток на AAV1 и NT-3. Все нежелательные явления будут регистрироваться и оцениваться на предмет их связи с переносом гена.

[00263] Основной вторичный критерий эффективности определяют как отсутствие ухудшения в отношении тяжести заболевания по баллу педиатрической шкалы заболевания СМТ (СМТPedS). В компьютеризированной балльной системе СМТPedS используют z-баллы для нормативной выборки для определения балла для индивидуумов исходя из числа стандартных отклонений, на которое характеристики пациентов, отличаются от таковых у здоровой популяции. Определение балла СМТPedS проводится для фиксированного возраста 20 лет для всех пациентов на протяжении всего исследования, что необходимо по двум причинам. Первая причина заключается в том, что оригинальная шкала СМТPedS основывается на нормативных значениях для отдельных компонентов шкалы при расчете окончательного балла, но нормативные значения не существуют для возраста индивидуумов после 2030 года. Вторая причина заключается в том, что, хотя балл, сравнивающий ребенка со здоровыми сверстниками, важен для детей, которые все еще развиваются, он имеет ограничение наложения функционального снижения после следующего дня рождения ребенка. Даже если исходный балл ребенка по тесту не изменяется, критерии определения балла рассчитаны на то, чтобы с возрастом становиться более строгими, что отражает ожидаемое улучшение двигательных навыков, обычно наблюдаемое у здоровых детей. Тем не менее, в клинических испытаниях в отношении дегенеративного заболевания остановка фактического прогрессирования будет рассматриваться как успешное испытание. Сохранение сопоставимости по возрасту для эталонных контрольных данных на протяжении всего исследования позволяет использовать валидированную систему определения балла, встроенную в СМТPedS. Это также позволяет наблюдать за фактическими изменениями при оценке, чтобы выявить остановку в прогрессировании.

[00264] Долю пациентов, у которых баллы СМТPedS улучшились или остались

неизменными на протяжении двухлетнего периода при использовании биномиальных тестов, оценивают с 95% доверительными интервалами. В качестве исследовательской цели долю пациентов с отсутствием снижения в каждом из 11 компонентов CMTPedS оценивают отдельно, а также по тесту на время прохождения 100 метров (100M), амплитудам СМАР, шкале визуальных аналогов интенсивности боли (VAS), баллам по краткому опроснику по оценке состояния здоровья (SF-36) и уровням NT-3 в кровообращении. Кроме того, коэффициенты корреляции Пирсона или Спирмена используют для каждой точки измерения для оценки связи между уровнями NT-3 в кровообращении и каждым критерием эффективности. Поскольку это исследование находится на предварительных стадиях, р-значения для множественных сравнений корректироваться не будут. Тем не менее выполняют анализ чувствительности, и он показывает, какие ассоциации являются статистически значимыми после корректировки, основываясь при этом на использовании нисходящей процедуры Бонферрони-Холма.

[00265] На основании данных продольных исследований течения заболевания (31, 32) успешный вторичный критерий эффективности определяют как остановку скорости ухудшения стандартизированного суммарного балла для силы сжатия рукой и силы сгибания голеностопа, времени выполнения теста с 9 отверстиями и стержнями и времени прохождения/пробега 10 метров.

### **Пример 5**

#### **Токсикологическое исследование**

[00266] Цель данного исследования заключалась в оценивании безопасности самокомплементарного вектора на основе аденоассоциированного вируса (scAAV), экспрессирующего кДНК нейротрофического фактора 3 (NTF3) человека под контролем специфичного для мышц промотора tMCK (scAAV1.tMCK.NTF3) у мышей дикого типа (C57BL/6) и мышей Trembler ( $Tr^J$ ) после однократной внутримышечной инъекции в икроножную мышцу. Результаты данного отчета демонстрируют, что однократная внутримышечная инъекция у мышей дикого типа и мышей Trembler является безопасной и хорошо переносимой вплоть до 48 недель после инъекции.

#### ***Тестируемые животные***

[00267] Мышам C57BL/6 дикого типа (отрицательный контроль) и  $Tr^J$  (тестируемый препарат) вводили инъекцией внутримышечно либо среду-носитель (0,9% стерильный солевой раствор), либо  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг scAAV1.tMCK.NTF3 в суммарном объеме 50 мкл. Эта линия мышей-носителей доступна от Jackson Laboratories (учетный № 000664) или Charles River (учетный № 027). Мыши  $Tr^J$  доступны от Jackson Laboratories (учетный № 002504).

[00268] Возраст мышей Trembler составлял 8-10 недель на момент инъекции. Ввиду доступности животных и известных проблем размножения линии животных подгруппу животных обрабатывали в возрасте 12 недель.

[00269] Всего в исследовании использовали 88 (44 самца/44 самки) животных. 44 животных (22 C57BL/6, 22  $Tr^J$ ) обрабатывали контролем в виде солевого раствора и 44 животных (22 C57BL/6, 22  $Tr^J$ ) обрабатывали тестируемым препаратом на основе

scAAV1.tMCK.NTF3. Из этих количеств половину животных из каждой когорты подвергали эвтаназии через 24 недели после обработки, а остальных животных подвергали эвтаназии через 48 недель после обработки. Животных однозначно идентифицировали с помощью ушных бирок.

#### ***Схема исследования***

[00270] Чтобы оценить безопасность тестируемого препарата на основе scAAV1.tMCK.NTF3, мышам C57BL/6 дикого типа возрастом 4-6 недель и мышам Tg<sup>J</sup> возрастом 8-12 недель вводили инъекцией либо среду-носитель (0,9% стерильный солевой раствор), либо  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг scAAV1.tMCK.NTF3 в суммарном объеме 50 мкл путем однократной в/м инъекции в левую икроножную мышцу. Животных наблюдали ежедневно в течение всего курса исследования на предмет общего состояния здоровья и заболеваемости. Проверки на смертность проводили два раза в сутки. Массу тела измеряли каждые 2 недели. Функциональное тестирование на гиперчувствительность (тестирование с горячей пластиной и реакции вздрагивания на звуковой стимул) проводили каждые 8 недель. Поведенческие тесты (удерживания на вращающемся стержне и с подвешиванием на проволоке) проводили каждые 2 недели.

[00271] Тестирование термочувствительности начинали за две недели до инъекции, а затем в день 0 и каждые 8 недель с использованием теста для грызунов на горячей пластине. Для проведения теста животное помещали на поверхность пластины, которая поддерживалась при температуре 55°C, и передвижение ограничивалось площадью 100 см<sup>2</sup> с использованием плексигласовой стенки высотой 15 см, окружающей поверхность пластины. Таймер запускали в тот момент, когда животное помещали на нагретую поверхность, и время задержки реакции фиксировали с помощью секундомера до 0,1 с. Следующие действия считали реакцией на тепловой раздражитель: лизание задней лапы или отдергивание/дрожание, попытка убежать с помощью прыжков также является приемлемым ответом. Мышь немедленно удаляли, когда наблюдали этот ответ.

[00272] Акустическую чувствительность тестировали за две недели до инъекции, а затем в день 0 (исходный уровень), на пике уровней NT-3 в сыворотке крови (от 8 до 12 недель) и каждые 8 недель после этого, при этом всех животных тестировали на слуховую гиперчувствительность с использованием теста реакции вздрагивания на звуковой стимул (AST). Реакцию вздрагивания измеряли с использованием одной камеры для тестирования вздрагивания (SR-Lab, San Diego Instruments, Сан-Диего, Калифорния), как ранее описано в Beigneux et al., Behavioral Brain Res. 171:295-302, 2006.

[00273] Камера состояла из прозрачного неограничивающего цилиндра из плексигласа, опирающегося на платформу внутри вентилируемой камеры. Высокочастотный динамик внутри камеры создавал непрерывный фоновый шум в 65 дБ и различные акустические раздражители. Вибрации цилиндра из плексигласа, вызванные реакцией вздрагивания всего тела животного, преобразовывали в аналоговые сигналы пьезоэлектрическим устройством, прикрепленным к платформе. Затем сигналы оцифровывали и сохраняли в компьютере. Регистрировали шестьдесят пять показаний с

интервалами в 1 мс, начиная с подачи стимула, и среднюю амплитуду ( $V_{avg}$ ) использовали для определения реакции вздрагивания на звуковой стимул. Уровень фонового шума 65 дБ подавали в течение 5-минутного периода адаптации и продолжали подачу в течение всего сеанса тестирования. Все сеансы тестирования с предимпульсным торможением (PPI) состояли из испытаний вздрагивания (только импульс), испытаний с предимпульсом (предимпульс+импульс) и испытаний, не предусматривающих стимула (без стимула). Испытание только с импульсом предусматривало импульс 40 мс 120 дБ широкополосного шума. PPI измеряли в испытаниях с предимпульсом+импульс, которые предусматривали 20 мс шумового предимпульса, 100 мс задержки, а затем 40 мс 120 дБ вызывающего вздрагивание импульса. Интенсивности акустического предимпульса составляли 69, 73 и 81 дБ. Испытание без стимула предусматривало только фоновый шум. Сессию тестирования начинали и заканчивали пятью процедурами испытания только с импульсом; причем в промежутки между этими процедурами испытания каждого типа осуществляли 10 раз в псевдослучайном порядке. Между испытаниями проходило в среднем 15 с (диапазон 12-30 с).

[00274] Для анализа удерживания на вращающемся стержне потребовалась по меньшей мере одна неделя обучения, чтобы гарантировать, что все субъекты обучились навыку в одинаковой степени. Согласно протоколу ускоренного вращения стержня животных помещали на стержень, который ускорялся до 5 об./мин., а затем скорость увеличивалась на 5 об./мин./7 секунд. Животные проходили три испытания за сеанс, данные которых усредняли.

[00275] Для анализа с подвешиванием на проволоке животных помещали четырьмя их лапами на металлическую проволоку диаметром 2 мм, поддерживаемую горизонтально на 35 см выше толстого слоя мягкой подстилки. Регистрировали период времени до падения мышью с проволоки, и после каждого падения мышам давали 1-минутный период восстановления. Каждый сеанс тестирования состоял из трех испытаний, оценки которых усредняли.

[00276] Через 22 и 46 недель после инъекции (за 2 недели до эвтаназии) собирали кровь из ретроорбитального синуса для гематологических исследований (количество эритроцитов, гематокрит, гемоглобин, количество лейкоцитов, общий и дифференциальный, средний эритроцитарный гемоглобин, средняя концентрация эритроцитарного гемоглобина, средний эритроцитарный объем, средний объем тромбоцитов, количество тромбоцитов, количество ретикулоцитов). Клинические биохимические анализы проводили по следующим параметрам: аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, аспаратаминотрансфераза, билирубин (общий и прямой), азот мочевины в крови, креатинин, креатинкиназа, глюкоза, общий белок.

[00277] Через 24 и 48 недель после инъекции кровь собирали путем внутрисердечной пункции, при этом сыворотку крови использовали для иммунологических исследований. Образцы сыворотки крови собирали для титрования антител к AAV1 и антител к NT-3 у всех животных в каждой группе (независимо от обработки или пола). Образцы сыворотки

крови дополнительно использовали для анализа ELISA уровней NT-3 в кровообращении.

[00278] Через 24 и 48 недель после инъекции для гистопатологического анализа от животных Tr<sup>J</sup> получали следующие ткани: половую железу, головной мозг, селезенку, почку, тощую кишку, толстую кишку, поджелудочную железу, сердце, легкое, желудок, печень, паховые лимфатические узлы, спинной мозг, икроножную мышцу (правую и левую) и макроскопические поражения (при наличии). Ткани фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, нарезали и окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологический анализ был выполнен SNBL USA.

[00279] Через 24 и 48 недель после инъекции ткань собирали для проводимого собственными средствами гистопатологического анализа у 6 животных на когарту (3M, 3F), за исключением контрольной когорты Tr<sup>J</sup> (n=5, 3M, 2F). Мышей умерщвляли и перфузировали транскардиально 4% параформальдегидом в фосфатном буфере (0,1 M, pH 7,4). Препарировали поясничный отдел спинного мозга, ганглии дорсального корешка (DRG) и весь сегмент седалищного нерва (от седалищной вырезки до подколенной ямки), проксимальную половину седалищного сегмента по его длине *in situ* и один поясничный DRG переносили в глутаральдегидный фиксатор, обрабатывали для заливки пластиком и нарезания на срезы толщиной 1 мкм. Остальную часть седалищного нерва и поясничных DRG криоконсервировали в 30% сахарозе, замораживали в изопентане, охлажденном в жидком азоте, и нарезали на 12-мкм срезы для иммуногистохимии с целью выявления положительности в отношении CGRP в нейронах и аксонах DRG (спинной мозг и головной мозг мышей Tr<sup>J</sup> помещали в 10% нейтральный забуференный формалин.

Таблица 6. Схема исследования

Когорта Число	Линия	Исследуемое средство	Доза (в. г./кг)	Обработка День 0	Конечные точки умерщвления			
					Неделя 24	Неделя 48	Дополнительные	
6	Высокая доза	C57BL/6	scAAV1.tMCK.NTF3	$1 \times 10^{13}$	n=10 (5M/5F)	n=10 (5M/5F)	+2 (1M/1F)	
7	Высокая доза	Tr <sup>J</sup>	scAAV1.tMCK.NTF3	$1 \times 10^{13}$	Однократная в/м инъекция в икроножную мышцу одной ноги	n=10 (5M/5F)	n=10 (5M/5F)	+2 (1M/1F)
8	Контроль	C57BL/6	Среда-носитель (0,9% стерильный солевой раствор)	0		n=10 (5M/5F)	n=10 (5M/5F)	+2 (1M/1F)
0	Контроль	Tr <sup>J</sup>	Среда-носитель (0,9% стерильный солевой раствор)	0		n=10 (5M/5F)	n=10 (5M/5F)	+2 (1M/1F)
ВСЕГО МЫШЕЙ					N=88 (44M/44F)			

### ***Ведение дозы, наблюдение и анализ животных***

[00280] Указанным животным вводили одну дозу в день 0 объемом 50 мкл путем однократной в/м инъекции в левую икроножную мышцу. Чтобы выполнить точное введение дозы, животных анестезировали ингаляцией изофлурана в течение минимум 15 минут. Дозы вводили прямыми инъекциями в левую икроножную мышцу. Уделяли внимание тому, чтобы точно поместить всю дозу вектора в мышцу. После выполнения введения дозы за животными наблюдали до достижения амбулаторного состояния и возвращали в клетку. Наблюдения за каждым животным проводили ежедневно в течение всей продолжительности исследования. Массу тела измеряли каждые 2 недели. Проверку на смертность проводили дважды в день.

[00281] В соответствующем возрасте мышам вводили избыточную дозу смеси кетамин/ксилазин (200 мг/кг/20 мг/кг). Кровь собирали через пункцию сердца. Затем ткани собирали и отправляли на анализ.

[00282] Значения массы тела, результаты гематологических и клинических биохимических анализов мышей наносили на график для каждой когорты для каждого предусмотренного момента времени. Анализы ELISA для антител к AAV1 в кровообращении, антител к NT-3 в кровообращении и уровней NT-3 в кровообращении проводили для всех конечных точек. Функциональное тестирование гиперчувствительности с использованием горячей пластины для грызунов и аппарата для регистрации реакции вздрагивания на звуковой стимул проводили каждые 8 недель для всех животных. Тестирование поведения проводили каждые две недели для испытаний удерживания на вращающемся стержне и подвешивания на проволоке для всех животных. Выполняли формальный гистопатологический анализ органов для всех животных. Проводили выполняемый собственными средствами гистопатологический анализ поясничного отдела спинного мозга и DRG у 6 мышей на когорту (3M, 3F), за исключением когорты Tr<sup>J</sup>, которая включала в себя 5 животных (3M, 2F). Гистопатологическая оценка включала в себя иммуноцитохимическое распределение положительности в отношении CGRP (в поясничных нейронах DRG и спинном мозге) и заливку пластиком седалищных нервов и нейронов DRG для анализа патологических изменений.

### **Результаты**

#### ***Заболеваемость и смертность***

[00283] Все мыши пережили процедуру инъекции, и начальный период наблюдения прошел без каких-либо признаков дистресса. Четверо животных Tr<sup>J</sup> погибли из-за неисправности в системе доставки воды. Не было ни одной смерти, связанной с тестируемым препаратом.

#### ***Значения массы тела***

[00284] Значения массы тела всех мышей в каждой группе измеряли каждые две недели на протяжении всего исследования. Все группы с обработкой продолжали прибавлять в весе на протяжении всего исследования.

[00285] У самцов животных C57BL/6 не было значительных различий между

животными, которым инъекцией вводили тестируемый препарат, и контролями. Среди самок животных значения массы были несколько выше у контрольных животных по сравнению с животными, которым инъекцией вводили тестируемый препарат. Среди самцов животных Tg<sup>J</sup> обработанная солевым раствором когорта характеризовалась значительно большей массой, чем обработанная NT-3 когорта. Среди самок мышей Tg<sup>J</sup> не было значительных различий в значениях массы тела.

#### **Гематологические и клинические биохимические анализы**

[00286] Не наблюдали каких-либо связанных с тестируемым препаратом изменений в гематологических параметрах на 22 и 46 неделях или в биохимических характеристиках сыворотки крови в моменты времени, соответствующие неделям 24 и 48.

#### **Анализы ELISA**

[00287] Анализы ELISA в отношении антител к AAV1, антител к NT-3 и NT-3 в кровообращении проводили с образцами сыворотки крови, собранными во время некропсии на 24 и 48 неделе.

[00288] Для измерения антител к AAV1 в кровообращении образцы сыворотки собирали через 24 и 48 недель после введения вектора и определяли титры антител с помощью твердофазного иммуоферментного анализа связывания (ELISA), см. таблицу 7 ниже. Животные, обработанные scAAV1.tMCK.NTF3, имели повышенные уровни антител к капсиду AAV1 в кровообращении. Титры антител были схожими у самцов и самок в оба момента времени. Положительный титр (> 1:50) не выявляли у контрольных животных, обработанных солевым раствором.

Таблица 7. Медианные титры сывороточных антител к капсиду AAV1 в кровообращении у мышей, обработанных scAAV1.tMCK.NT-3				
Время после введения вектора	Группа с обработкой			
	Группа 1: контроль в виде солевого раствора (0)			
	Медиана		Диапазон	
	Самец	Самка	Самец	Самка
24 недели	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
48 недель	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
	Группа 2: вектор scAAV1.tMCK.NT-3 (2,0×10 <sup>11</sup> )			
	Медиана		Диапазон	
	Самец	Самка	Самец	Самка
24 недели	1:25600	1:25600	1:25600-1:25600	1:25600-1:25600
48 недель	1:3200	1:12800	1:3200-1:25600	1:12800-1:25600

[00289] Для измерения антител к NT-3 в кровообращении образцы сыворотки крови собирали через 24 и 48 недель после введения вектора и определяли титры антител к NT-3

с помощью твердофазного иммуноферментного анализа связывания (ELISA). Все мыши имели титры антител < 1:50 (рассматриваемые как отрицательные) через 24 и 48 недель после введения вектора. См. таблицу 8.

Таблица 8. Медианные титры сывороточных антител к пептиду NT-3 в кровообращении у мышей, обработанных scAAV1.tMCK.NT-3				
Время после введения вектора	Уровень дозы (в. г.)			
	Группа 1: контроль в виде солевого раствора (0)			
	Медиана		Диапазон	
	Самец	Самка	Самец	Самка
24 недели	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
48 недель	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
Группа 2: вектор scAAV1.tMCK.NT-3 ( $2,0 \times 10^{11}$ )				
	Медиана		Диапазон	
	Самец	Самка	Самец	Самка
24 недели	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
48 недель	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50

[00290] Уровни NT-3 в кровообращении определяли в образцах сыворотки крови мышей Tr<sup>J</sup>, собранных через 24 и 48 недель после введения вектора путем стандартного анализа связывания ELISA. Внутримышечная инъекция вектора scAAV1.tMCK.NTF3 приводила к устойчивой экспрессии и секреции NT-3 у мышей Tr<sup>J</sup> через 24 и 48 недель после введения вектора. В таблице 9 показаны среднее и стандартные отклонения для уровней сывороточного NT-3 через 24 и 48 недель после инъекции у мышей Tr<sup>J</sup> из получавших инъекцию солевого раствора и вектора групп. Половая принадлежность не оказывала эффекта в отношении уровней NT-3 в кровообращении.

Таблица 9. Уровни сывороточного NT-3 в кровообращении (нг/мл)						
Группа	Доза (в. г./кг)	Пол	24 недели		48 недель	
			Среднее	SD	Среднее	SD
Солевой раствор	0	M	0.000	0.000	0.019	0.038
		F	0.003	0.004	0.000	0.000
scAAV1.tMCK.NT-3	$1.0 \times 10^{13}$	M	10.808	6.705	7.616	4.572
		F	10.410	3.729	9.312	4.809

#### **Тестирование гиперчувствительности**

[00291] Тестирование термочувствительности проводили на исходном уровне (до обработки либо тестируемым препаратом, либо контролем в виде солевого раствора) и каждые 8 недель вплоть до недели 48 после инъекции мышам C57BL/6 и TrJ. Различий

между получавшими инъекцию контроля и вектора когортами мышей C57BL/6 и TrJ не наблюдали. Также не наблюдали значительных различий в задержках отдергивания лапы между самцами и самками мышей в каждой когорте.

[00292] Результаты измерений слуховой чувствительности, выполненных в ходе теста вздрагивания на звуковой стимул, показали, что АСТ четко подавлялся предимпульсом при всех интенсивностях (69, 73 и 81 дБ), а уровень подавления зависел от интенсивности предимпульса как у мышей дикого типа, так и у мышей TrJ. Обработка тестируемым препаратом не изменяла ответы РРІ у мышей C57BL/6 дикого типа. % РРІ был заметно ниже для обработанных контролем животных TrJ, значение которого улучшалось в сторону нормализации у обработанных тестируемым препаратом (NT-3) животных TrJ. Это улучшение у обработанных NT-3 животных TrJ наблюдали преимущественно у животных мужского пола.

#### ***Тестирование поведения***

[00293] Что касается оценки посредством теста с вращающимся стержнем, то животные в когорте C57BL/6 не демонстрировали зависимых от обработки различий в функциональном тестировании с вращающимся стержнем. Животные в когорте TrJ, обрабатываемой NT-3, демонстрировали значительное улучшение характеристик в тесте с вращающимся стержнем по сравнению с контрольными животными TrJ, которое начиналось с недели 16 после обработки и сохранялось вплоть до конечной точки.

[00294] Что касается оценки посредством подвешивания на проволоке, то животные в когорте C57BL/6 не демонстрировали зависимых от обработки различий в функциональном тестировании с подвешиванием на проволоке. Животные в когортах TrJ, обрабатываемых NT-3, демонстрировали значительное улучшение способности удерживаться при подвешивания на проволоке по сравнению с контрольными животными TrJ, которое начиналось с недели 28 после обработки и сохранялось вплоть до конечной точки.

#### ***Гистопатология***

[00295] Выполняли формальный гистопатологический анализ. Перечень проанализированных органов и тканей представлен ниже в таблице 10.

Таблица 10. Перечень органов, исследованных в отношении гистологии	
Орган/ткань	Гистопатология
Половые железы	X
Головной мозг	X
Селезенка	X
Почки	X
Тощая кишка	X
Толстая кишка	X
Поджелудочная железа	X

Таблица 10. Перечень органов, исследованных в отношении гистологии	
Орган/ткань	Гистопатология
Сердце	X
Легкое	X
Желудок	X
Печень	X
Паховые лимфатические узлы	X
Спинной мозг	X
Икроножная мышца*	X
Макроскопические поражения (при наличии)	X
*Правая и левая икроножные мышцы	

[00296] После эвтаназии удаляли поясничный отдел спинного мозга, ганглии дорсального корешка (DRG) и весь седалищный нерв (от седалищной вырезки до подколенной ямки) и обрабатывали для гистопатологического оценивания. Перечень отдельных животных, использованных в выполненном собственными средствами гистопатологическом исследовании, показан в таблице 11.

Таблица 11. Общая характеристика выполненного собственными средствами гистопатологического анализа после введения scAAV1.tMCK.NTF3 путем внутримышечной инъекции в икроножную мышцу мышам Tr <sup>J</sup> и C57BL/6							
Линия	Идентификационный номер	Пол	Вводимый инъекцией препарат	Линия	Идентификационный номер	Пол	Вводимый инъекцией препарат
Конечная точка: 24 недели				Конечная точка: 48 недель			
Tr <sup>J</sup>	3935	F	0,9% стерильный солевой раствор	Tr <sup>J</sup>	3901	M	0,9% стерильный солевой раствор
	3936	F			3902	M	
	3937	F			3903	M	
	3915	M			3928	F	
	3913	M			3943	F	
	3914	M					
Tr <sup>J</sup>	3940	F	scAAV1.tMCK.NTF3	Tr <sup>J</sup>	3904	M	scAAV1.tMCK.NTF3
	3941	F			3905	M	
	3942	F			3906	M	
	3924	M			3930	F	

Таблица 11. Общая характеристика выполненного собственными средствами гистопатологического анализа после введения scAAV1.tMCK.NTF3 путем внутримышечной инъекции в икроножную мышцу мышам Tr <sup>J</sup> и C57BL/6							
	3922	M			3931	F	
	3923	M			3932	F	
C57BL/ 6	931	F	0,9% стерильный солевой раствор	C57BL/ 6	926	F	0,9% стерильный солевой раствор
	931	F			927	F	
	933	F			928	F	
	942	M			937	M	
	943	M			939	M	
	946	M			940	M	
C57BL/ 6	956	F	scAAV1.tMCK .NTF3	C57BL/ 6	951	F	scAAV1.tMC K.NTF3
	957	F			952	F	
	958	F			953	F	
	964	M			959	M	
	965	M			960	M	
	966	M			963	M	

#### ***Иммуноцитохимический анализ распределения CGRP***

[00297] Для иммуноцитохимического анализа распределения CGRP выполняли исследование поперечных срезов сегментов поясничного отдела спинного мозга через 24 и 48 недель после инъекции. Этот анализ не выявил зависимость от препарата лечения увеличения реактивности CGRP в отношении NT-3 у животных Tr<sup>J</sup> и C57BL/6.

[00298] Анализировали патологические изменения в залитых пластиком срезах. Залитые пластиком левые седалищные нервы и левые поясничные нейроны DRG, исследованные через 24 и 48 недель после инъекции, не демонстрировали патологических изменений у животных C57BL/6. Связанные с возрастом изменения, такие как миелиновые складки/впячивания и выпячивания, свидетельствующие об аксональной атрофии, наблюдали в обоих когортах получавших обработку животных C57BL/6 через 48 недель после обработки. У животных Tr<sup>J</sup>, обработанных солевым раствором, отмечали заметное сокращение числа миелинизированных волокон и многочисленные гипомиелинизированные или обнаженные аксоны. Животные Tr<sup>J</sup>, обработанные тестируемым препаратом, демонстрировали видимое увеличение тонких миелинизированных волокон, толщины слоя миелина и уменьшение количества обнаженных аксонов. Не наблюдали каких-либо побочных эффектов обработки NT-3 у мышей Tr<sup>J</sup>, о чем свидетельствует отсутствие разрастания аксонов в DRG.

[00299] В целом, отсутствие проявления неблагоприятных результатов, связанных с

обработкой, на протяжении всего исследования как у животных C57BL/6, так и у животных Tr<sup>J</sup> указывает на то, что обработка хорошо переносилась в течение 48 недель после инъекции.

### **Обсуждение**

[00300] Для оценки безопасности scAAV1.tMCK.NTF3, доставляемого посредством однократной внутримышечной инъекции, разрабатывали токсикологическое исследование, включающее в себя в общей сложности 88 (44 самца/44 самки) животных. 44 животных (22 C57BL/6, 22 Tr<sup>J</sup>) обрабатывали контролем в виде 0,9% стерильного солевого раствора и 44 животных (22 C57BL/6, 22 Tr<sup>J</sup>) обрабатывали тестируемым препаратом на основе scAAV1.tMCK.NTF3 при концентрации  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг. Из этих животных половину животных из каждой когорты подвергали эвтаназии через 24 недели после обработки, а остальных животных подвергали эвтаназии через 48 недель после обработки.

[00301] Данные в этом отчете демонстрируют, что обработка животных дозой, в 10 раз превышающей предлагаемую клиническую дозу, не приводила к проявлению неблагоприятных с точки зрения безопасности эффектов, связанных с тестируемым препаратом. На протяжении всего исследования животных ежедневно наблюдали на предмет общего состояния здоровья и заболеваемости, причем смертность проверяли два раза в сутки. Массу тела животных измеряли каждые 2 недели. Функциональное тестирование на гиперчувствительность (тепловую и звуковую) проводили каждые 8 недель. Тестирование поведения проводили каждые 2 недели. Все животные пережили процедуру инъекции, и начальный период наблюдения прошел без признаков дистресса. Из-за неисправности в системе доставки воды произошло 4 смерти среди животных Tr<sup>J</sup>, которые не были связаны с введением тестируемого препарата. Никаких других смертей в этом исследовании не регистрировали.

[00302] После некропии измеряли гематологические показатели крови и клинические биохимические показатели, и в ходе этого не было выявлено каких-либо различий, связанных с тестируемым препаратом. Выполняли ELISA на антитела к AAV1 в сыворотке крови и демонстрировали ожидаемое увеличение антител в кровообращении у животных, обработанных тестируемым препаратом, которое не было специфическим в отношении пола. Выполняли ELISA на антитела к NT-3 в сыворотке крови, при этом для всех животных демонстрировали отрицательные титры антител для всех временных точек. Также измеряли уровни NT-3 в кровообращении для всех групп с обработкой, и они были повышены только у обработанных тестируемым препаратом животных. Не наблюдали какого-либо специфического в отношении половой принадлежности эффекта в отношении уровней NT-3 в кровообращении. Тестирование термической гиперчувствительности не выявляло каких-либо специфических в отношении обработки или половой принадлежности изменений у животных C57BL/6 или Tr<sup>J</sup>. Измерения звуковой чувствительности не выявляли связанных с тестируемым препаратом изменений у животных C57BL/6, но демонстрировали дефицит у обработанных контрольным препаратом животных Tr<sup>J</sup> с улучшением в сторону нормализации у обработанных тестируемым препаратом животных

Tr<sup>J</sup>. Это улучшение было отмечено преимущественно у самцов животных Tr<sup>J</sup>. Оценка контроля моторики с использованием вращающегося стержня у животных C57BL/6 не выявляла различий, связанных с обработкой тестируемым препаратом. Обработанные тестируемым препаратом животные Tr<sup>J</sup> демонстрировали значительное улучшение по сравнению с контрольными животными Tr<sup>J</sup>, начиная с недели 16 после обработки. Подобным образом, оценка с подвешиванием на проволоке в когорте C57BL/6 не выявляла различий, связанных с тестируемым препаратом. Животные Tr<sup>J</sup>, обработанные тестируемым препаратом, демонстрировали значительное улучшение в отношении времени нахождения в подвешенном состоянии на проволоке, начиная с недели 28 после обработки, что сохранялось до конечной точки.

[00303] Оценивали ткани и органы, собранные из всех когорт через 24 и 48 недель после обработки. Подводя итог, минимальную инфильтрацию мононуклеарных клеток наблюдали в подвергнутой инъекции тестируемым препаратом левой икроножной мышце у 3 из 4 самцов группы 1 и 4 из 5 самок группы 1 при некропсии через 24 недели. Однако подобную инфильтрацию также наблюдали в икроножной мышце, которая не подвергалась инъекции, у оставшейся самки из группы 1 (животное 3942). Это изменение не наблюдали ни в подвергнутой инъекции солевым раствором левой, ни в оставленной без инъекции правой икроножных мышцах ни для одного из животных группы 2 (контроль) при некропсии через 24 недели. При некропсии животных через 48 недель снова наблюдали минимальную инфильтрацию мононуклеарных клеток в подвергнутой инъекции тестируемым препаратом левой икроножной мышце у 2 из 5 самцов группы 1 и 1 из 6 самок группы 1. Все другие обнаруженные при микроскопии особенности, которые были случайным образом распределены среди контрольных и обработанных животных, являлись фоновыми особенностями для вида или считались случайными в отношении введения тестируемого препарата.

[00304] Проводили выполняемое собственными средствами гистологическое исследование на срезе поясничного отдела спинного мозга, ганглиях дорсального корешка и седалищном нерве подгруппы животных (3 М, 3 F на группу). Изучение поперечных срезов сегментов поясничного отдела спинного мозга не выявило зависимость от обработки повышения активности CGRP в отношении NT-3 у животных. Оценивание патологии залитых пластиком седалищных нервов и поясничных DRG нейронов не показывало изменений у животных C57BL/6, кроме возрастных различий. У животных Tr<sup>J</sup> обработка тестируемым препаратом приводила к облегчению патологии, о чем свидетельствует увеличение тонких миелинизированных волокон, увеличение толщины слоя миелина и уменьшение количества обнаженных аксонов. Отсутствие разрастания аксонов в DRG дополнительно подтверждает безопасность тестируемого препарата.

[00305] В целом, собранные данные, представленные в данном исследовании, показывают, что тестируемый препарат на основе scAAV1.tMCK.NTF3, инъецируемый непосредственно в икроножную мышцу путем однократной внутримышечной инъекции в дозе  $1 \times 10^{13}$  в. г./кг, хорошо переносился в течение 48 недель после инъекции как самцами,

так и самками мышей C57BL/6 дикого типа и мышей Tr<sup>J</sup>, о чем свидетельствуют многочисленные измерения, представленные выше.

#### Ссылки

1. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, et al. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991;66:219-232.
2. Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 2011;69:22-33.
3. Sahenk Z. Abnormal Schwann cell-axon interactions in CMT neuropathies. The effects of mutant Schwann cells on the axonal cytoskeleton and regeneration-associated myelination. *Ann N Y Acad Sci* 1999;883:415-426.
4. Verhamme C, de Haan RJ, Vermeulen M, Baas F, de Visser M, van Schaik IN. Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *BMC medicine* 2009;7:70.
5. Micallef J, Attarian S, Dubourg O, et al. Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2009;8:1103-1110.
6. Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, et al. Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol* 2011;10:320-328.
7. Lewis RA, McDermott MP, Herrmann DN, et al. High-dosage ascorbic acid treatment in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: results of a randomized, double-masked, controlled trial. *JAMA neurology* 2013;70:981-987.
8. Sahenk Z, Nagaraja HN, McCracken BS, et al. NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients. *Neurology* 2005;65:681-689.
9. de Waegh SM, Brady ST. Local control of axonal properties by Schwann cells: neurofilaments and axonal transport in homologous and heterologous nerve grafts. *J Neurosci Res* 1991;30:201-212.
10. Yin X, Crawford TO, Griffin JW, et al. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 1998;18:1953-1962.
11. de Waegh S, Brady ST. Altered slow axonal transport and regeneration in a myelin-deficient mutant mouse: the trembler as an in vivo model for Schwann cell-axon interactions. *J Neurosci* 1990;10:1855-1865.
12. de Waegh SM, Lee VM, Brady ST. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 1992;68:451-463.
13. Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet* 1995;11:274-280.
14. Adlkofer K, Frei R, Neubergh DH, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *J Neurosci* 1997;17:4662-4671.

15. Anzini P, Neuberg DH, Schachner M, et al. Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J Neurosci* 1997;17:4545-4551.
16. Bosio A, Bussow H, Adam J, Stoffel W. Galactosphingolipids and axono-glial interaction in myelin of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 1998;292:199-210.
17. Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M. Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 1995;11:281-286.
18. Sahenk Z, Chen L. Abnormalities in the axonal cytoskeleton induced by a connexin32 mutation in nerve xenografts. *J Neurosci Res* 1998;51:174-184.
19. Sahenk Z, Chen L, Freimer M. A novel PMP22 point mutation causing HNPP phenotype: studies on nerve xenografts. *Neurology* 1998;51:702-707.
20. Sahenk Z, Chen L, Mendell JR. Effects of PMP22 duplication and deletions on the axonal cytoskeleton. *Ann Neurol* 1999;45:16-24.
21. Sanchez I, Hassinger L, Paskevich PA, Shine HD, Nixon RA. Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation. *J Neurosci* 1996;16:5095-5105.
22. Sahenk Z, Serrano-Munuera C, Chen L, Kakabadze I, Najagara HN. Evidence for impaired axonal regeneration in PMP22 duplication: studies in nerve xenografts. *J Peripher Nerv Syst* 2003;8:116-127.
23. Ramer MS, Bishop T, Dockery P, et al. Neurotrophin-3-mediated regeneration and recovery of proprioception following dorsal rhizotomy. *Molecular and cellular neurosciences* 2002;19:239-249.
24. Helgren ME, Cliffer KD, Torrento K, et al. Neurotrophin-3 administration attenuates deficits of pyridoxine-induced large-fiber sensory neuropathy. *J Neurosci* 1997;17:372-382.
25. Mizisin AP, Calcutt NA, Tomlinson DR, Gallagher A, Fernyhough P. Neurotrophin-3 reverses nerve conduction velocity deficits in streptozotocin-diabetic rats. *J Peripher Nerv Syst* 1999;4:211-221.
26. Mizisin AP, Kalichman MW, Bache M, Dines KC, DiStefano PS. NT-3 attenuates functional and structural disorders in sensory nerves of galactose-fed rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:803-813.
27. Shy ME, Blake J, Krajewski K, et al. Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology* 2005;64:1209-1214.
28. Shy ME, Chen L, Swan ER, et al. Neuropathy progression in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology* 2008;70:378-383.
29. Solari A, Laura M, Salsano E, Radice D, Pareyson D. Reliability of clinical outcome measures in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord* 2008;18:19-26.
30. Komyathy K, Neal S, Feely S, et al. Anterior tibialis CMAP amplitude correlations with impairment in CMT1A. *Muscle & nerve* 2013;47:493-496.
31. Mannil M, Solari A, Leha A, et al. Selected items from the Charcot-Marie-Tooth

(CMT) Neuropathy Score and secondary clinical outcome measures serve as sensitive clinical markers of disease severity in CMT1A patients. *Neuromuscul Disord* 2014;24:1003-1017.

32. Pareyson D, Schenone A, Fabrizi GM, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of long-term ascorbic acid treatment in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL): the study protocol [EudraCT no.: 2006-000032-27]. *Pharmacological research* 2006;54:436-441.

33. Piscoquito G, Reilly MM, Schenone A, et al. Responsiveness of clinical outcome measures in Charcot-Marie-Tooth disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2015;22:1556-1563.

Хотя настоящее изобретение было описано посредством конкретных вариантов осуществления, следует понимать, что вариации и модификации будут очевидны специалистам в данной области. Соответственно, на изобретение должны быть наложены только те ограничения, которые указаны в формуле изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Нуклеиновая кислота, содержащая в направлении от 5'- к 3'-концу:

(i) последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) AAV2;

(ii) последовательность промотора/энхансера мышечной креатинкиназы, представленную нуклеотидами 147-860 из SEQ ID NO: 11;

(iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид NT-3 человека; и

(iv) последовательность второго ITR AAV2;

где полипептид NT-3 человека характеризуется аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2, или кодируется нуклеотидной последовательностью, на 90% идентичной нуклеотидам 1077-1850 из SEQ ID NO: 11 или на 100% идентичной нуклеотидам 1077-1850 из SEQ ID NO: 11.

2. Нуклеиновая кислота по п.1, дополнительно содержащая расположенный со стороны 3'-конца относительно промотора/энхансера химерный интрон, представленный нуклеотидами 892-1024 из SEQ ID NO: 11.

3. Нуклеиновая кислота по п.1 или п.2, дополнительно содержащая расположенный со стороны 3'-конца относительно указанной нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид NT-3 человека, сигнал полиаденилирования SV40, представленный нуклеотидами 1860-2059 из SEQ ID NO: 11.

4. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-3,

где указанный первый ITR представлен нуклеотидами 7-112 из SEQ ID NO: 11, и/или

где указанный второй ITR представлен нуклеотидами 2121-2248 из SEQ ID NO: 11.

5. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-3,

где указанный первый ITR представлен нуклеотидами 7-112 из SEQ ID NO: 11, и

где указанный второй ITR представлен нуклеотидами 2121-2248 из SEQ ID NO: 11.

6. Нуклеиновая кислота, содержащая геном scAAV1.tMCK.NTF3, который на по меньшей мере 90% идентичен нуклеотидной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11.

7. Нуклеиновая кислота, содержащая геном scAAV1.tMCK.NTF3, представленный под SEQ ID NO: 11.

8. Частица рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-7, где rAAV обладает инфицирующей способностью.

9. Частица rAAV по п.8, где rAAV характеризуется серотипом AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11 или AAVrh.74.

10. Частица rAAV по пп. 8-10, где ДНК AAV в геноме rAAV происходит из AAV-1.

11. Композиция, содержащая частицу rAAV по любому из пп. 8-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Композиция по п.11, где композиция составлена для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта.

13. Композиция по п.11, где композиция составлена для стимуляции мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта.

14. Способ лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий стадию введения субъекту-человеку нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид NT-3; где

a) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1,

b) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1;

c) нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2,

d) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-7,

e) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV вводят в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3,

f) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг,

g) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг,

i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг,

j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

k) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем

введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или

l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

15. Способ улучшения мышечной силы или стимулирования мышечного роста у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий стадию введения субъекту-человеку нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид NT-3; где

a) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1,

b) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1;

c) нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2,

d) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-7,

e) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV вводят в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3,

f) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг,

g) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг,

i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг,

ж) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

к) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или

л) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, путем введения является внутримышечная инъекция при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

16. Способ по п.14 или п.15, где нуклеиновую кислоту вводят с использованием вирусного вектора.

17. Способ по п.16, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса.

18. Способ по любому из пп. 14-17, где нуклеиновая кислота функционально связана со специфичным для мышц промотором.

19. Способ по любому из пп. 14-18, где специфичный для мышц промотор представляет собой промотор специфичной для мышц креатинкиназы.

20. Способ по любому из пп. 14-19, где scAAV1.tMCK.NTF3 содержит несущую NT-3 генную кассету, представленную в SEQ ID NO: 11.

21. Способ по любому из пп. 14-20, где путем введения является внутримышечная инъекция.

22. Способ по любому из пп. 14-21, где путь введения представляет собой внутримышечную билатеральную инъекцию в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу.

23. Способ по любому из пп. 15-22, где улучшение мышечной силы у субъекта происходит в верхних или нижних конечностях.

24. Способ по любому из пп. 15-22, где улучшение мышечной силы измеряют как снижение суммарного балла по педиатрической шкале СМТ (СМТPeds) или как снижение прогрессирования заболевания на протяжении двухлетнего периода времени.

25. Композиция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид NT-3, для применения в лечении связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у субъекта-человека, где:

а) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1,

б) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID

NO: 1;

с) нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2,

д) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-7,

е) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV вводят в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3,

ф) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг,

г) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг,

и) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг,

j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

к) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или

l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

26. Композиция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид NT-3, для применения в улучшении мышечной силы или стимуляции мышечного роста у субъекта-человека, где

а) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1,

б) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1;

в) нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2,

г) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-7,

д) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV вводится в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3,

е) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг,

ж) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

з) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг,

и) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг,

к) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

л) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1

мл, или

1) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

27. Композиция по п.25 или п.26, где нуклеиновая кислота составлена для введения с использованием вирусного вектора.

28. Композиция по п.27, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса.

29. Композиция по любому из пп. 25-28, где нуклеиновая кислота функционально связана со специфичным для мышц промотором.

30. Композиция по любому из пп. 25-29, где специфичный для мышц промотор представляет собой промотор специфичной для мышц креатинкиназы.

31. Композиция по любому из пп. 25-29, где scAAV1.tMCK.NTF3 содержит несущую NT-3 генную кассету, представленную в SEQ ID NO: 11.

32. Композиция по любому из пп. 25-31, где композиция составлена для внутримышечной инъекции.

33. Композиция по любому из пп. 25-32, где композиция составлена для внутримышечной билатеральной инъекции в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу.

34. Композиция по любому из пп. 26-33, где улучшение мышечной силы происходит в верхних или нижних конечностях субъекта.

35. Композиция по любому из пп. 26-33, где улучшение мышечной силы измеряется как снижение суммарного балла по педиатрической шкале CMT (CMTPeds) или как снижение прогрессирования заболевания на протяжении двухлетнего периода времени.

36. Применение нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид NT-3, для получения лекарственного средства для лечения связанного с истощением мышечной ткани нарушения или нейропатии у субъекта-человека, где:

a) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1,

b) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1;

c) нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2,

d) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-7,

e) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом

гAAV вводится в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3,

f) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечного пути введения, и доза гAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг,

g) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечного пути введения, и доза гAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечного пути введения, и доза гAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг,

i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечного пути введения, и доза гAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг,

j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечного пути введения, и вводимая доза гAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

к) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или

l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

37. Применение дозы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид NT-3, для получения лекарственного средства для улучшения мышечной силы или стимуляции мышечного роста у субъекта-человека, где:

a) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая на 90% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1,

b) нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1;

c) нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 2 или на 100% идентична SEQ ID NO: 2,

d) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-7,

e) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, и при этом rAAV вводится в дозе, которая приводит к устойчивой экспрессии низкой концентрации полипептида NT-3,

f) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, композиция составлена для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6,5 \times 10^{12}$  в. г./кг,

g) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг до приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

h) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{12}$  в. г./кг,

i) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечного пути введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $4 \times 10^{12}$  в. г./кг,

j) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечного пути введения, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $6 \times 10^{12}$  в. г./кг,

k) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством 3-6 инъекций на мышцу в объеме приблизительно 0,5-1 мл, или

l) нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NT-3, представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAV1.tMCK.NTF3, лекарственный препарат составлен для внутримышечной инъекции при концентрации приблизительно  $2 \times 10^{13}$  в. г./мл, которую вводят посредством нескольких инъекций в суммарном объеме приблизительно 5-14 мл.

38. Применение по п.36 или п.37, где нуклеиновая кислота составлена для введения с использованием вирусного вектора.

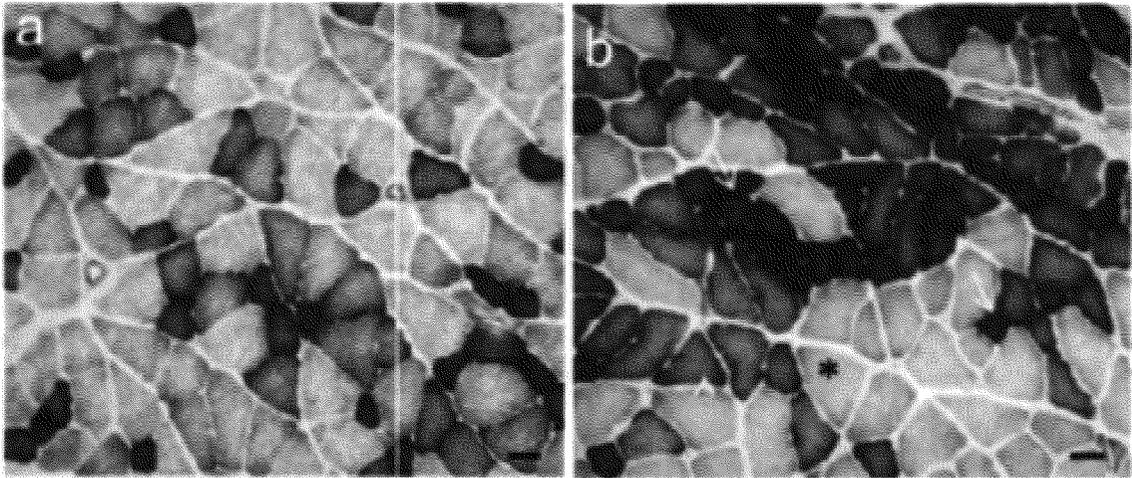
39. Применение по пп. 36-38, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса.
40. Применение по любому из пп. 36-39, где нуклеиновая кислота функционально связана со специфичным для мышц промотором.
41. Применение по любому из пп. 36-40, где специфичный для мышц промотор представляет собой промотор специфичной для мышц креатинкиназы.
42. Применение по любому из пп. 36-41, где scAAV1.tMCK.NTF3 содержит несущую NT-3 генную кассету, представленную в SEQ ID NO: 11.
43. Применение по любому из пп. 36-42, где лекарственное средство составлено для внутримышечной инъекции.
44. Применение по любому из пп. 36-43, где лекарственное средство составлено для внутримышечной билатеральной инъекции в медиальную и латеральную головки икроножной мышцы и переднюю большеберцовую мышцу.
45. Применение по любому из пп. 37-44, где улучшение мышечной силы у субъекта происходит в верхних или нижних конечностях.
46. Применение по любому из пп. 37-45, где улучшение мышечной силы измеряется как снижение суммарного балла по педиатрической шкале CMT (CMTPedS) или как снижение прогрессирования заболевания на протяжении двухлетнего периода времени.
47. Способ, композиция или применение по любому из пп. 14-46, где субъект подвержен риску развития мышечной атрофии.
48. Способ, композиция или применение по любому из пп. 14-46, где субъект страдает мышечной атрофией.
49. Способ, композиция или применение по любому из пп. 14-46, где у субъекта имеется мышечная дистрофия.
50. Способ, композиция или применение по любому из пп. 14-46, где субъект страдает нейропатией.
51. Способ, композиция или применение по любому из пп. 14-46, где субъект страдает нейропатией Шарко-Мари-Тута (СМТ).
52. Способ, композиция или применение по п.51, где субъект характеризуется наличием одного из генных вариантов, представленных в таблице 1.
53. Способ, композиция или применение по любому из пп. 14-46, где субъект страдает транстиретиновой амилоидной нейропатией.
54. Способ, композиция или применение по п.52, где субъект характеризуется наличием одного из генных вариантов Val30Met, Ile107Val и Ser77Tyr.
55. Способ, композиция или применение по любому из пп. 14-46, где субъект страдает приобретенной нейропатией, обусловленной раком, сахарным диабетом, инфекцией вирусом иммунодефицита человека (HIV), нарушением щитовидной железы, гипотиреозом, гипогликемией, уреимией, почечной недостаточностью, печеночной дисфункцией, печеночной недостаточностью, полицитемией, нарушениями соединительной ткани, болезнью Лайма, целиакией, лепрой, порфирией, синдромом

Шегрена, полиомиелитом, акромегалией, нарушениями липидного/гликолипидного метаболизма, синдромом Западного Нила, амилоидозом, митохондриальными нарушениями, диспротеинемическими нарушениями, моноклональной гаммапатией неустановленной этиологии (MGUS), синдромом POEMS, дефицитом питательных веществ/витаминов, дефицитом витамина В<sub>12</sub>, дефицитом витамина Е или дефицитом меди.

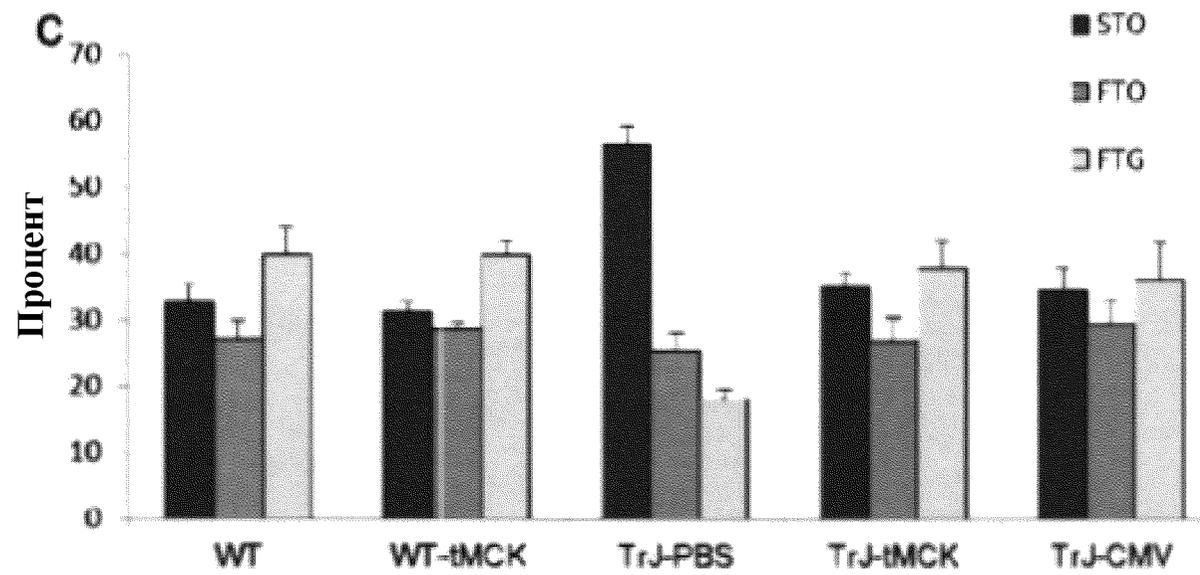
56. Способ, композиция или применение по любому из пп. 14-46, где субъект страдает наследственной миопатией, периферической нейропатией, токсической нейропатией, аутоиммунной периферической полинейропатией, острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулонейропатией (AIDP), хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулонейропатией (CIDP), васкулитным множественным мононевритом, паранейропатией, идиопатическим ганглионитом, амиотрофическим латеральным склерозом, мультифокальной моторной нейропатией с блокадой проводимости или синдромом нижнего мотонейрона, нервно-мышечным заболеванием, мышечной атрофией, индуцированной лекарственными средствами миопатией, саркопенией, кахексией, атрофией мышечных волокон II типа, возрастной мышечной атрофией или приобретенным аутоиммунным первичным мышечным нарушением.

По доверенности

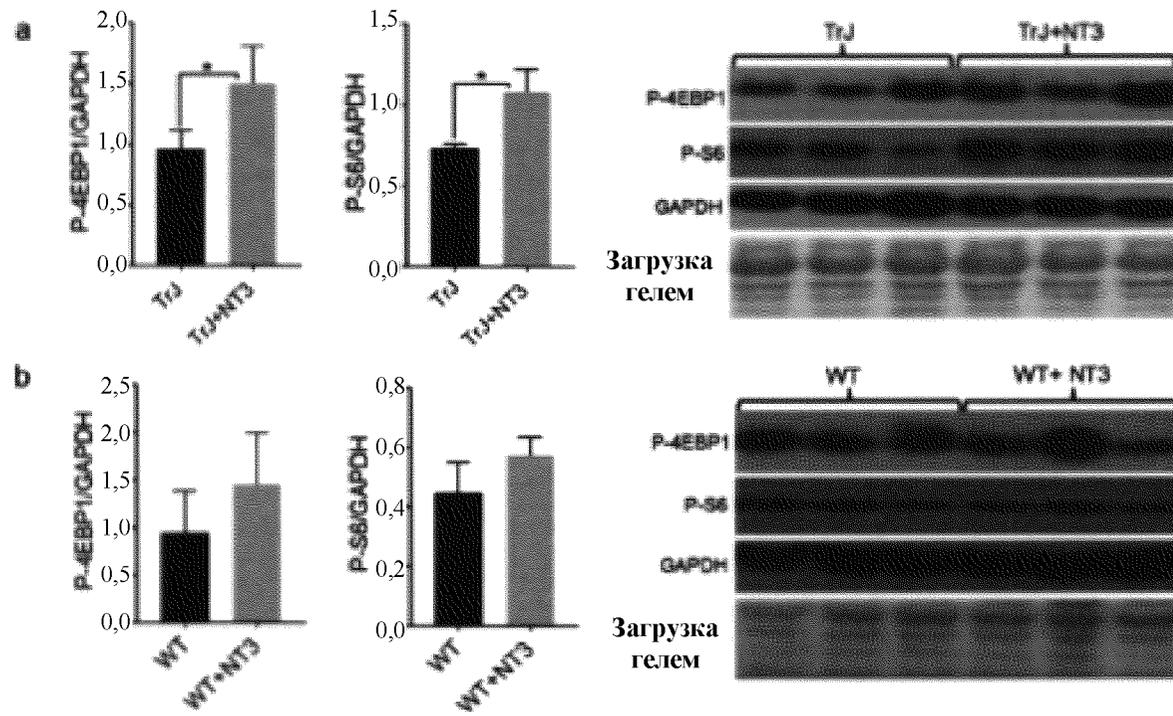
Фигура 1



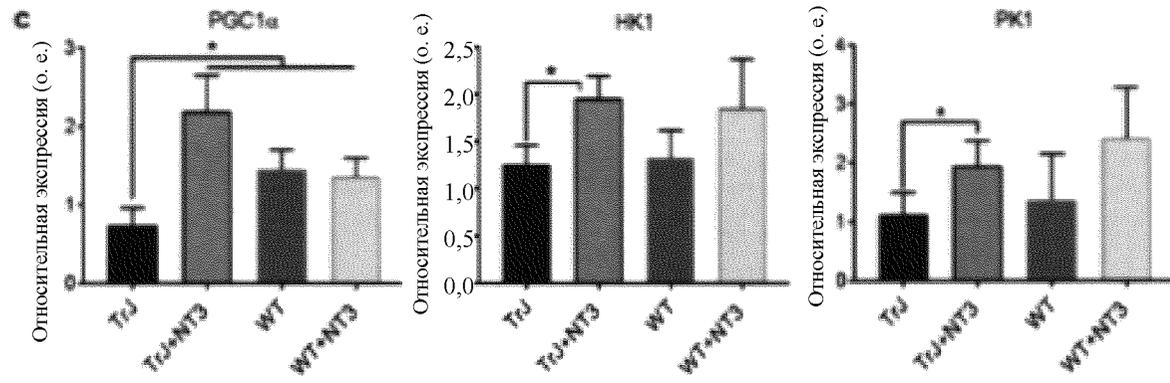
Фигура 1, продолжение



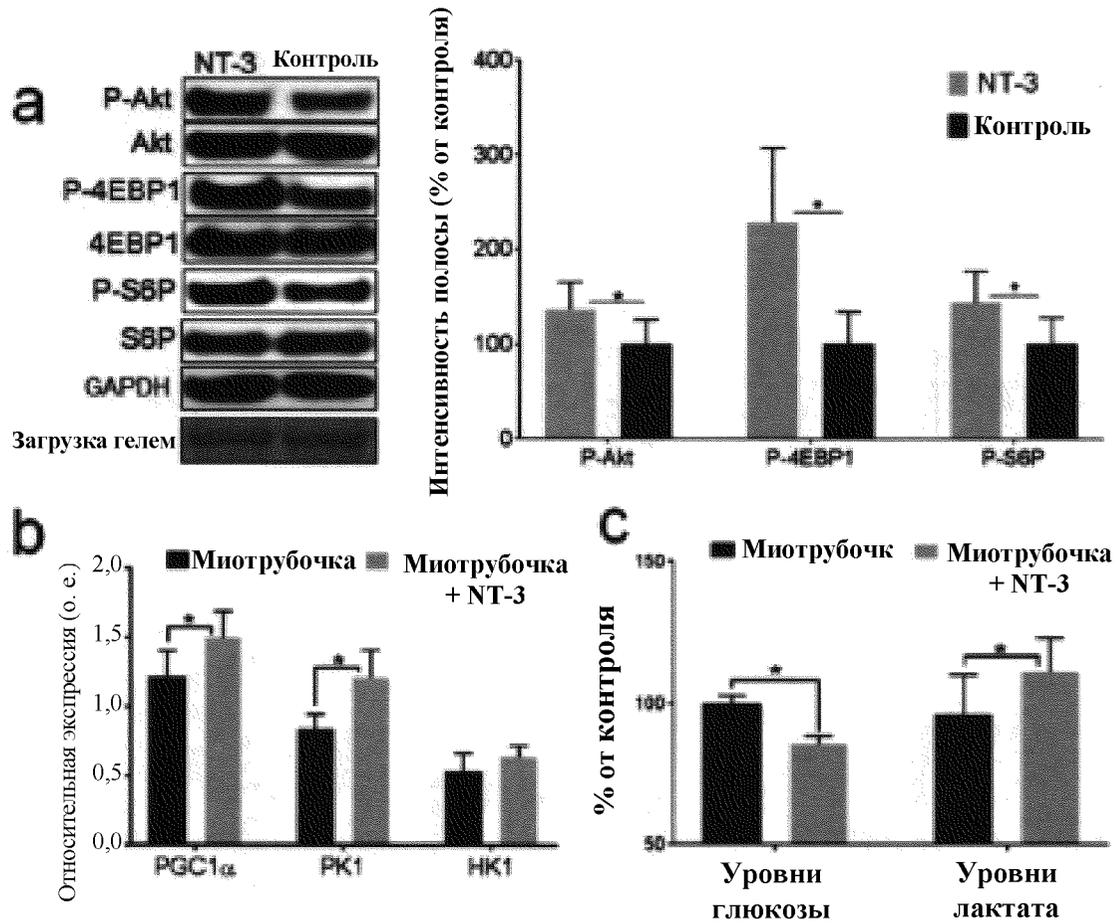
Фигура 2



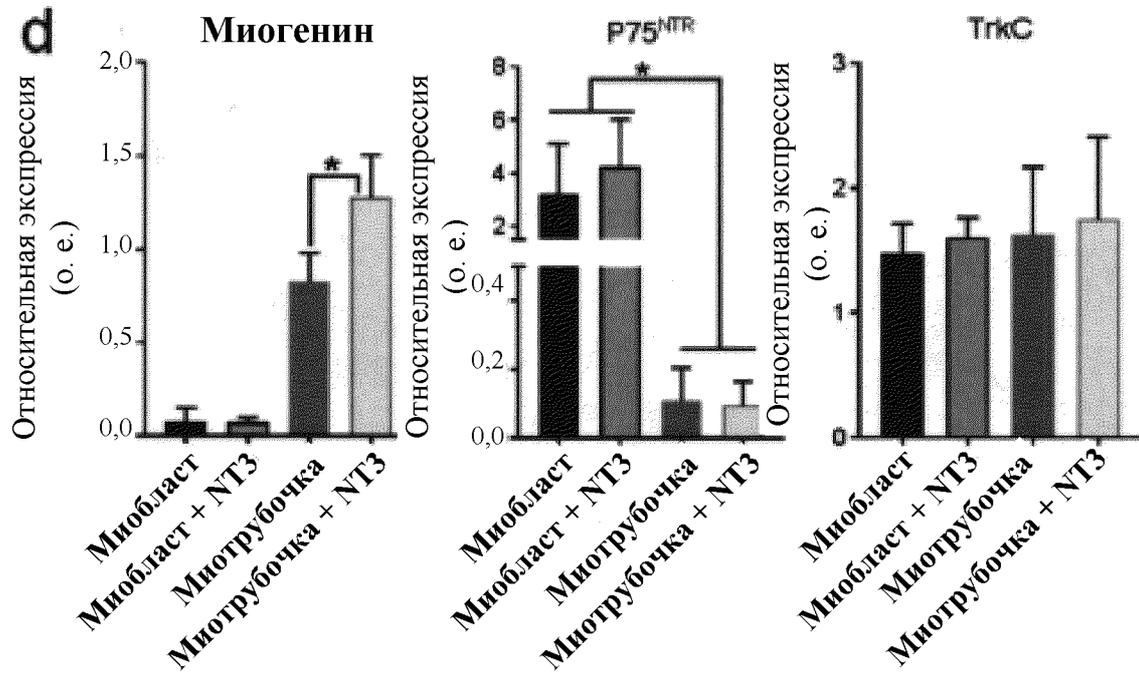
Фигура 2, продолжение



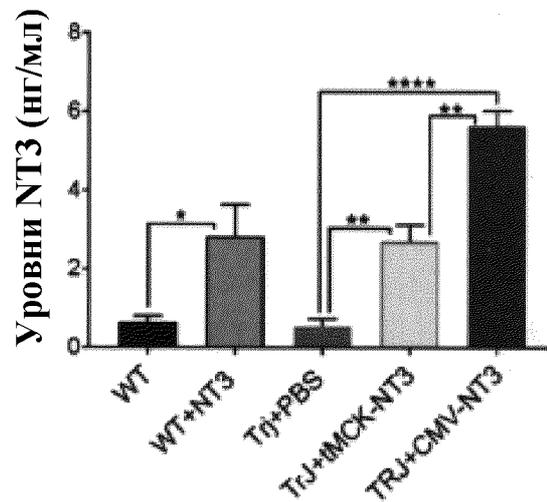
Фигура 3



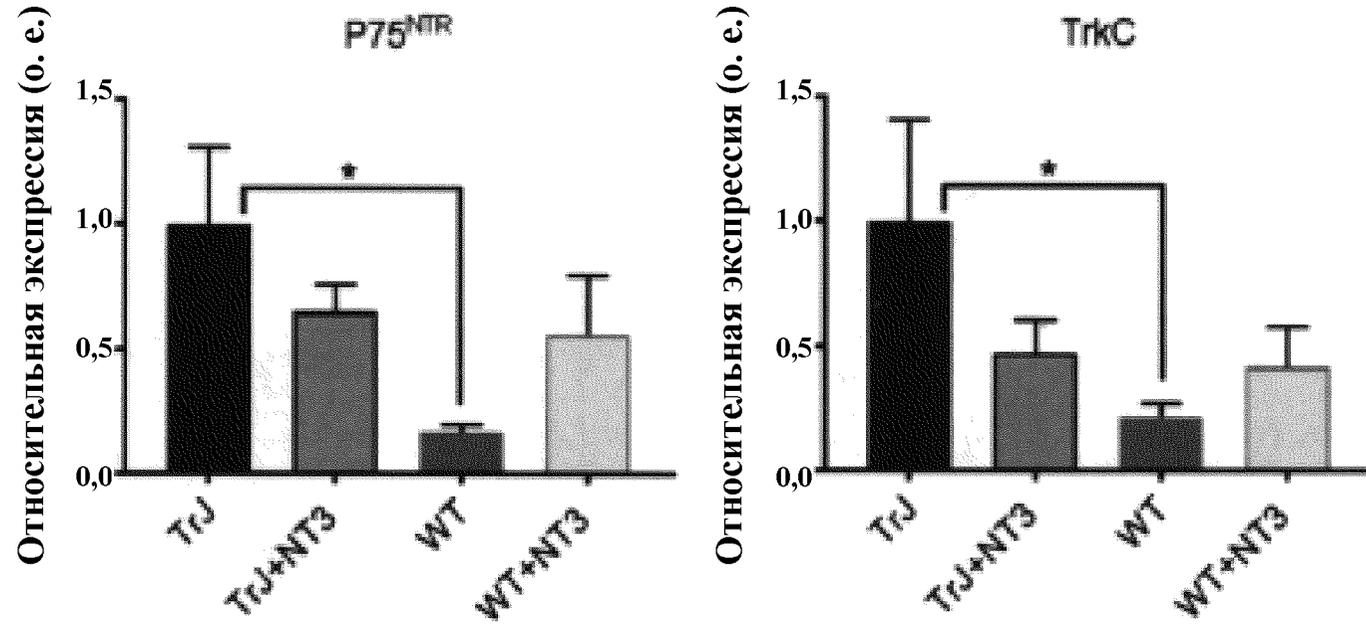
Фигура 3, продолжение



Фигура 4

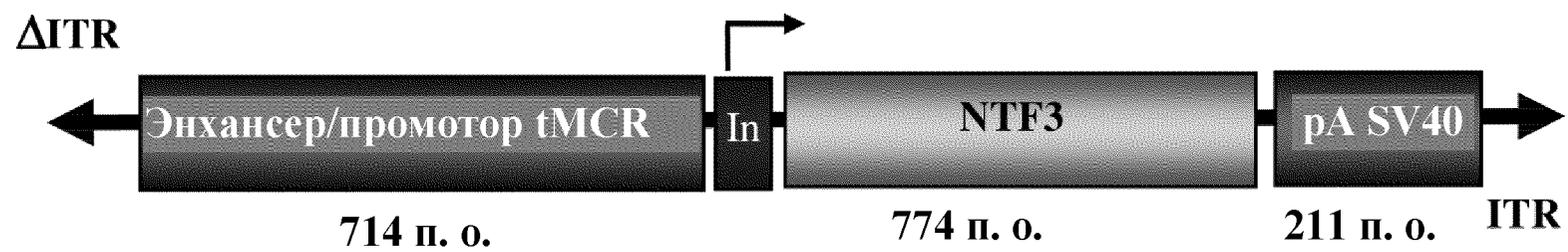


Фигура 5

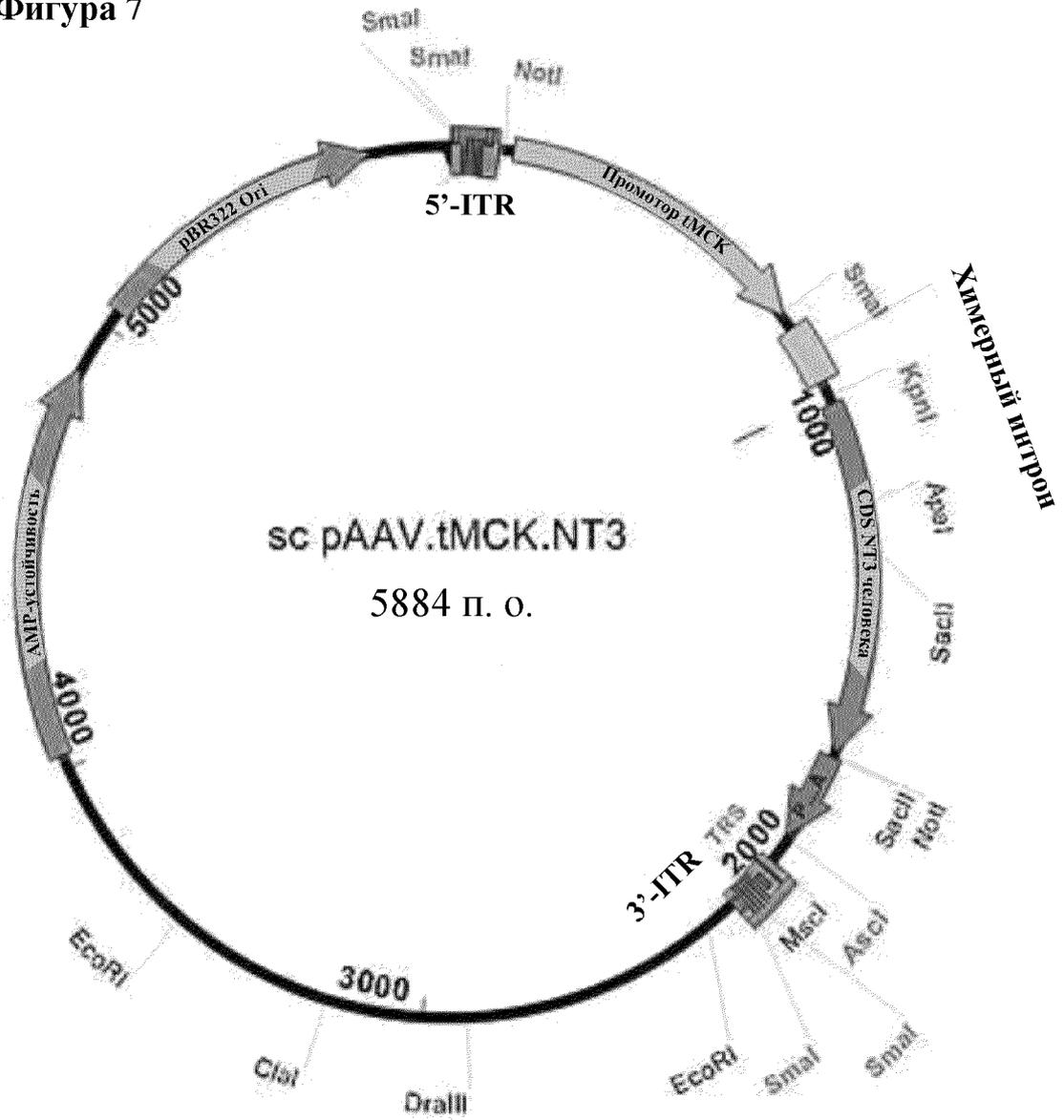


Фигура 6

Самокомплементарный scAAV1.tMCK.NTF3



Фигура 7



**Фигура 8А. Схематическая карта участков инъекций для когорты 1**



**Фигура 8В. Схематическая карта участков инъекций для когорты 3**





## Фигура 9, продолжение

TCTAAAAATTTTTATCSTTGCSTTGAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTT  
TTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTCTTTGCCTTGCCCT  
GTATGATTTATTGGATGTTGGAATTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACA  
CCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCA  
ACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCT  
CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGTCACTACCCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGAT  
ACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGA  
AATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT  
AACCTTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCT  
TATTCCTTTTTTGCGGCATTTTTGCCTTCCCTGTTTTTCTCACCCAGAAAACGCTGGTGAAGTAAAAGAT  
GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA  
GTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTTATC  
CCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC  
TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA  
TGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT  
GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAAC  
GACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTAC  
TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCG  
CTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC  
ATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA  
CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGCAGA  
CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAG  
ATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCG  
TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA  
ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGC  
TTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT  
CTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC  
GTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGT  
TCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAG  
AAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGA  
GCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGA  
CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGGCCT  
TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCTTATCCCCTGATTCTGT  
GGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG  
TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATT  
AATG