

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092654** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.10

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/50 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.06.07

(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ СЕРДЦА С ПОМОЩЬЮ AAV ПРИ КАРДИОМИОПАТИИ

(31) 62/682,772; 62/822,015

(72) Изобретатель:

(32) 2018.06.08; 2019.03.21

Суини Хью Ли, Слипел Маргарет
Мэри (US)

(33) US

(86) PCT/US2019/036157

(74) Представитель:

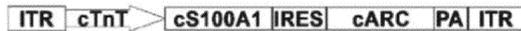
(87) WO 2019/237067 2019.12.12

Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Лебедев В.В., Парамонова К.В.
(RU)

(71) Заявитель:

ЮНИВЕРСИТИ ОФ ФЛОРИДА
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШЕН,
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам, применимым при лечении заболеваний сердца. Раскрыты композиции и способы основаны на AAV-терапии, содержащей вектор рекомбинантного AAV для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта, причем трансгены содержат белок семейства S100 и ингибитор апоптоза. Согласно некоторым аспектам нацеленное воздействие на несколько источников одного или нескольких заболеваний сердца может обеспечить синергетический эффект во время лечения.



202092654
A1

202092654
A1

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ СЕРДЦА С ПОМОЩЬЮ AAV ПРИ КАРДИОМИОПАТИИ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество дат подачи предварительной заявки на выдачу патента США № 62/682772, поданной 8 июня 2018 г., и предварительной заявки на выдачу патента США №62/822015, поданной 21 марта 2019 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Дилатационная кардиомиопатия (DCM) является второй наиболее частой причиной заболеваний сердца у собак, и лечение вторичных симптомов является единственным вариантом лечения. Прогноз для пораженных собак зависит от стадии заболевания и породы. У доберман-пинчеров наблюдается особенно быстрое и равномерное прогрессирование после возникновения застойной сердечной недостаточности (CHF), при этом большинство из них живут менее 6 месяцев. Дилатационная кардиомиопатия (DCM) представляет собой наиболее распространенный тип кардиомиопатии человека, встречающийся в основном у взрослых от 20 до 60 лет. Он поражает желудочки и предсердия сердца, нижнюю и верхнюю камеры сердца, соответственно. Большинство форм DCM являются приобретенными формами по ряду причин, включая в себя ишемическую болезнь сердца, сердечный приступ, высокое кровяное давление, сахарный диабет, заболевания щитовидной железы, вирусный гепатит и вирусные инфекции, которые вызывают воспаление сердечной мышцы. Злоупотребление алкоголем и некоторыми наркотиками, такими как кокаин и амфетамины, а также как минимум два лекарственных препарата, применяемые для лечения рака (доксорубицин и даунорубицин), также могут привести к DCM. Кроме того, существует ряд генетических форм DCM, включая в себя без ограничения DCM, ассоциированную с мышечными дистрофиями Дюшенна и Беккера. В случае некоторых форм мышечной дистрофии Беккера, а также в большинстве случаев мышечной дистрофии Дюшенна кардиомиопатия может в конечном итоге ограничить выживаемость пациента.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Кардиомиопатия является второй наиболее частой причиной заболеваний сердца у субъектов, и лечение вторичных симптомов является единственным вариантом лечения. Прогноз для пораженных субъектов зависит от стадии заболевания и породы. Функция сердца критически зависит от кальций-зависимой передачи сигналов. Во время заболеваний сердца нарушение работы кальциевых каналов в клетках сердца способствует нарушению внутриклеточного обмена ионов кальция, дополнительно подавляя функцию сердца. Было показано, что стратегии переноса генов для уменьшения аномалий внутриклеточного обмена ионов кальция улучшают состояние при сердечно-сосудистом заболевании на моделях мелких и крупных животных, а также в клинических испытаниях с участием людей.

У людей дилатационная кардиомиопатия является наиболее распространенным типом кардиомиопатии и может возникать как в результате ряда приобретенных, так и генетических заболеваний. Как и в случае с собаками и другими моделями с использованием животных, хотя происхождение заболевания кроется в дисфункции обмена кальция, окончательное прогрессирование заболевания обусловлено митохондриальной дисфункцией и/или апоптозом кардиомиоцитов, вызванным растяжением. Хотя решение проблемы обмена кальция само по себе может быть эффективным на ранних стадиях заболевания, воздействие на сочетание обмена кальция, митохондриальной дисфункции и апоптоза будет необходимо для лечения всех форм DCM и на всех стадиях прогрессирования заболевания.

В настоящем документе раскрыты подходы к доставке генов для лечения субъектов с кардиомиопатией и застойной сердечной недостаточностью. Эти подходы включают в себя экспрессию S100A1 для решения проблемы обмена кальция и экспрессии ARC (репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспаз) для блокирования всех источников апоптоза и нормализации функции митохондрий. Экспрессия трансгенов S100A1 и ARC с помощью раскрытого подхода с самокомплементарным вектором AAV является быстрой (то есть в течение нескольких часов), что имеет решающее значение для противодействия эффектам сердечной недостаточности на конечной стадии и ограничивается сердцем. Таким образом, эти подходы решают проблему всех трех факторов возникновения и прогрессирования DCM и, следовательно, должны быть применимы к любой форме DCM на любой стадии прогрессирования заболевания.

Согласно некоторым аспектам настоящего раскрытия предусмотрены векторы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) для доставки трансгенов в сердце субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления такие векторы rAAV включают в

себя по меньшей мере два трансгена, один из которых кодирует белок семейства S100, а другой - ингибитор апоптоза. Такие гAAV-векторы могут включать в себя от 5' к 3', по порядку, последовательность первого инвертированного концевого повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), промотор, функционально связанный с трансгенами, и последовательность второго инвертированного концевого повтора AAV (ITR). Согласно некоторым вариантам осуществления два трансгена функционально связаны с одним и тем же промотором. Согласно другим вариантам осуществления каждый трансген функционально связан с отдельным промотором. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор гAAV также включает в себя по меньшей мере один сигнал полиаденилирования (например, 3' по отношению к двум трансгенам, экспрессируемым с одного промотора, или 3' по отношению к одному или обоим трансгенам, экспрессируемым с разных промоторов). Согласно аспектам настоящего раскрытия предусмотрен нуклеиновокислотный вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта, где указанный вектор содержит от 5' к 3', по порядку, последовательность первого инвертированного концевого повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), два или более трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами, сигнал полиаденилирования и последовательность второго инвертированного концевого повтора (ITR) AAV, где два или более трансгенов содержат белок семейства S100 и ингибитор апоптоза.

Трансгены согласно настоящему изобретению могут представлять собой белок семейства S100 и ингибитор апоптоза. Например, белок семейства S100 представляет собой сердечный кальцийсвязывающий белок S100 A1 (сS100A1) или его вариант. В другом примере ингибитор апоптоза представляет собой сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспаз (сARC) или его вариант.

Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько трансгенов согласно настоящему раскрытию представляют собой встречающиеся в природе последовательности. Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько трансгенов сконструированы так, чтобы быть видоспецифическими. Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько трансгенов оптимизированы по кодонам для экспрессии у представляющих интерес видов, например, у собак. Согласно определенным вариантам осуществления один или несколько трансгенов (например, трансген сARC) оптимизированы по кодонам.

Согласно некоторым вариантам осуществления участок внутренней посадки рибосомы (IRES) присутствует между двумя или более трансгенами (например, между трансгеном cS100A1 и трансгеном cARC). Согласно некоторым вариантам осуществления трансген, кодирующий белок семейства S100, расположен 5' по отношению к трансгену, кодирующему ингибитор апоптоза. Согласно другим вариантам осуществления трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, расположен 5' по отношению к трансгену, кодирующему белок семейства S100.

Согласно некоторым вариантам осуществления промотор представляет собой ограниченный для сердца промотор. Ограниченный для сердца промотор может представлять собой промотор одного из следующих генов: ген тяжелой цепи α -миозина, ген тяжелой цепи β -миозина, ген 2v легкой цепи миозина, ген 2a легкой цепи миозина, ген CARP, ген сердечного α -актина, ген сердечного мускаринового ацетилхолина m2, ANF, сердечный тропонин C, сердечный тропонин I, сердечный тропонин T (cTnT), ген сердечной Ca-АТФазы саркоплазматического ретикулума, скелетный α -актин; или искусственный сердечный промотор, происходящий из гена MLC-2v. Согласно некоторым вариантам осуществления ограниченный для сердца промотор представляет собой промотор cTnT.

Кроме того, в настоящем документе предусмотрены частицы гAAV, содержащие раскрытые в настоящем документе векторы гAAV, инкапсидированные в капсиды AAV. Согласно некоторым вариантам осуществления капсид AAV содержит капсидные белки, происходящие из серотипов AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV8 или AAV9. Согласно некоторым вариантам осуществления капсид AAV содержит капсидные белки, происходящие из серотипа AAVrh.10.

Другие аспекты настоящего изобретения включают в себя композиции, содержащие описанные в настоящем документе частицы гAAV. Такие композиции можно вводить субъекту для генной терапии заболевания сердца. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание сердца вызывает сердечную недостаточность у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание сердца представляет собой кардиомиопатию. Согласно другим вариантам осуществления заболевание сердца представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию или дилатационную кардиомиопатию. Согласно другим вариантам осуществления заболевание сердца представляет собой острую ишемию.

Композиции согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту различными путями. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят путем инъекции

в сердце субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления введение композиции приводит к экспрессии трансгенов в сердце субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является млекопитающим. Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающее представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающее является животным-компаньоном. Например, животное-компаньон может представлять собой собаку, кошку, лошадь, свинью, корову, овцу, кролика или другое домашнее животное.

Каждый из элементов настоящего изобретения может включать в себя различные варианты осуществления настоящего изобретения. Поэтому предполагается, что каждое из ограничений настоящего изобретения, связанных с любым одним элементом или комбинациями элементов, может быть включено в каждый аспект настоящего изобретения. Настоящее изобретение не ограничено в своем применении деталями конструкции и расположением компонентов, изложенными в нижеследующем описании или проиллюстрированными в графических материалах. Настоящее изобретение может иметь другие варианты осуществления и применяться на практике или осуществляться различными способами.

Краткое описание графических материалов

Представленные ниже графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Раскрытие можно лучше понять, обратившись к нижеследующему описанию изобретения вместе с прилагаемыми графическими материалами, на которых одинаковые позиционные обозначения обозначают одинаковые элементы.

На фиг. 1 изображена схема иллюстративного конструкта AAV. За первым инвертированным концевым повтором AAV (ITR) следует промотор сердечного тропонина T (сTnT), затем оптимизированная по кодонам последовательность для видоспецифического кальцийсвязывающего белка S100 A1 (сS100A1), за которым следует участок внутренней посадки рибосомы (IRES), за которым следует оптимизированная по кодонам последовательность для видоспецифического репрессора апоптоза с доменом рекрутирования каспаз (сARC), за которой следует последовательность полиаденилирования (PA) и второй ITR AAV.

На фиг. 2 изображена диастолическая МРТ у собаки, получавшей лечение от мышечной дистрофии, в начале исследования и через несколько недель после доставки гена. Данные

подтверждают стабильное или слегка улучшенное ремоделирование сердца с умеренным уменьшением диастолического объема левого желудочка.

На фиг. 3 изображена систолическая МРТ у собаки, получавшей лечение от мышечной дистрофии, в начале исследования и через несколько недель после доставки гена. Данные подтверждают стабильную или слегка улучшенную систолическую функцию левого желудочка после лечения с небольшим уменьшением систолического объема, предполагающим улучшение сократимости и увеличение сердечного выброса левого желудочка.

На фиг. 4 показана фракция выброса, пиковая деформация и сердечный выброс у мышей D2.mdx после лечения с помощью AAVrh.10-S100A1/ARC. В течение 24-недельного периода у мышей, которым вводили терапевтический AAV, лучше поддерживались фракции выброса, развитие деформации и сердечный выброс по сравнению с мышами, которым вводили имитацию.

На фиг. 5 показаны уровни экспрессии S100A1 и ARC у мышей, получавших рекомбинантный вектор AAVrh.10-S100A1/ARC, и контрольных мышей. Анализ белка (вестерн-блоттинг) подтвердил, что уровни как S100A1, так и ARC были повышены в обработанных тканях по сравнению с контролем (которому вводили с помощью инъекции имитацию).

На фиг. 6 показаны кардиомиоциты контрольных и получивших лечение мышей при 10-кратном и 20-кратном увеличении. Данные гистологии сердца показывают, что у получивших лечение мышей наблюдалась меньшая патология DMD по сравнению с контрольными сердцами.

На фиг. 7 показано, что у первой (из двух) собак с дефицитом дистрофина (собаки GRMD), Кэлвина, улучшилась сердечная функция после лечения рекомбинантным AAVrh.10-S100A1/ARC. Обе собаки, которым вводили инъекции, показали улучшение фракции выброса и других сердечных параметров после лечения, измеренных с помощью МРТ сердца и подтвержденных данными эхокардиографии.

На фиг. 8 показаны данные о том, что у второй собаки GRMD, Себастьяна, улучшилась сердечная функция после лечения с помощью AAVrh.10-S100A1/ARC.

На фиг. 9A-9C показано, что лечение с помощью AAVrh.10-S100A1/ARC снижает уровни креатинкиназы (СК) в сыворотке и предотвращает атрофию мышц у собак GRMD, Себастьяна и Кэлвина. МРТ-измерения мышечной массы конечностей измеряли по площади обеих лап (фиг. 9A), максимальной площади поперечного сечения (CSA) (фиг. 9B) и объему

обеих лап (фиг. 9C). Результаты показывают, что масса скелетных мышц либо увеличилась, либо осталась неизменной после кардиологического лечения.

На фиг. 10 показано, что уровни циркулирующей креатинкиназы (СК) в скелетных мышцах субъектов GRMD были снижены после инъекции AAVrh.10-S100A1/ARC, что указывает на снижение продолжающегося повреждения мышц.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам кардиологической генной терапии заболеваний сердца, например кардиомиопатии, у субъекта. Способы согласно настоящему изобретению относятся к применению частиц рекомбинантного AAV (rAAV) для одновременной доставки и экспрессии двух трансгенов. Трансгены согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере два класса белков, каждый из которых выполняет определенную функцию для воздействия на различные аспекты заболеваний сердца. Один класс трансгенов регулирует передачу сигналов кальция в кардиомиоцитах, например, белки семейства S100. Другой класс трансгенов включает в себя репрессоры апоптоза. Согласно некоторым вариантам осуществления трансгены могут представлять собой сердечный кальцийсвязывающий белок S100 A1 (cS100A1) или его вариант, а также сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспаз (cARC) или его вариант.

Композиции и способы согласно настоящему изобретению основаны, по меньшей мере частично, на синергетических эффектах двух трансгенов, например, S100A1 и ARC, когда они доставляются и экспрессируются одновременно в сердце субъекта. Белок S100A1 улучшает аспекты обмена кальция, включая в себя нормализацию транзиентов кальция в саркоплазматической ретикулярной сети, что приводит к нормализации сократительной функции. Белок ARC блокирует апоптоз, инициированный митохондриальными и немитохондриальными механизмами (например, апоптоз, вызванный растяжением), и улучшает функцию митохондрий. Другими словами, S100A1 и ARC воздействуют на два отдельных компонента сердечной недостаточности (дисфункция обмена кальция и апоптоз) с синергетическими эффектами, ведущими к лучшим долгосрочным терапевтическим результатам. Кроме того, композиции и способы согласно настоящему изобретению эффективны на любой стадии сердечной недостаточности.

Кроме того, в настоящем документе предусмотрены способы получения частиц rAAV, подходящих для доставки трансгенов, например S100A1 и ARC или их варианта, в сердце субъекта. Такие частицы rAAV могут содержать геном рекомбинантного AAV, содержащий

молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие трансгены, причем указанные молекулы нуклеиновой кислоты инкапсидированы капсидными белками AAV. Согласно некоторым вариантам осуществления частицы гAAV включают в себя нуклеиновокислотный вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV). Геном рекомбинантного AAV представляет собой одноцепочечную ДНК, которая может дополнительно содержать элементы последовательности, которые облегчают интеграцию генома AAV в геном хозяина и экспрессию трансгенов. Например, геном рекомбинантного AAV может содержать тканеспецифические промоторы для обеспечения экспрессии трансгенов в целевых тканях или органах. Такие частицы гAAV можно использовать в композиции для лечения заболеваний сердца.

Таким образом, согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрены векторы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для доставки трансгенов в сердце субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые векторы гAAV включают в себя по меньшей мере два трансгена, один из которых кодирует белок семейства S100, а другой - ингибитор апоптоза. Эти векторы гAAV могут включать в себя от 5' к 3', по порядку, последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), промотор, функционально связанный с трансгенами, и последовательность второго инвертированного концевой повтора AAV (ITR). Согласно некоторым вариантам осуществления два трансгена функционально связаны с одним и тем же промотором. Согласно другим вариантам осуществления каждый трансген функционально связан с отдельным промотором. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор гAAV также включает в себя по меньшей мере один сигнал полиаденилирования (например, 3' по отношению к двум трансгенам, экспрессируемым с одного промотора, или 3' по отношению к одному или обоим трансгенам, экспрессируемым с разных промоторов).

Согласно настоящему раскрытию также предусмотрен нуклеиновокислотный вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта, где указанный вектор содержит от 5' к 3', по порядку, последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), два или более трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами, сигнал полиаденилирования и последовательность второго инвертированного концевой повтора (ITR) AAV, где два или более трансгенов содержат белок семейства S100 и ингибитор апоптоза.

Используемый в настоящем документе термин «трансген» относится к гену или генетическому материалу, который был перенесен естественным путем или с помощью любой из ряда методик генной инженерии от одного организма к другому. Трансген может представлять собой представляющий интерес белок или полипептид (например, S100A1, ARC) или представляющую интерес РНК (например, миРНК или микроРНК). Согласно некоторым вариантам осуществления один вектор rAAV может содержать кодирующую последовательность для одного или нескольких трансгенов. Например, один вектор rAAV может содержать кодирующую последовательность для 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 трансгенов. Согласно некоторым вариантам осуществления векторы rAAV согласно настоящему раскрытию содержат кодирующую последовательность как S100A1, так и ARC или их вариантов. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор rAAV дополнительно содержит область, кодирующую белок Rep. Трансгены согласно настоящему раскрытию включают в себя два класса белков, каждый из которых выполняет определенную функцию для воздействия на различные аспекты одного или нескольких заболеваний сердца. Один класс трансгенов может регулировать передачу сигналов кальция в кардиомиоцитах, например, белки семейства S100. Другой класс трансгенов может включать в себя репрессоры апоптоза.

Используемый в настоящем документе термин «вариант» относится к нуклеиновой кислоте с характеристиками, которые отличаются от того, что встречается в природе, например, «вариант» является по меньшей мере приблизительно на 70% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичным или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичным нуклеиновой кислоте дикого типа. Например, вариант трансгена представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую одну или несколько замен в нуклеотидах трансгена по сравнению с его последовательностью дикого типа. Эти замены могут являться молчащими, т.е. они не модифицируют аминокислотную последовательность любого кодируемого белка (или иным образом приводят к вариантной аминокислотной последовательности). Альтернативно, эти замены могут приводить к модификациям аминокислотной последовательности кодируемого белка, в результате чего кодируемый белок содержит одну или несколько аминокислотных замен (например, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15 или 15-20 аминокислотных замен) относительно последовательности белка дикого

типа. Эти замены включают в себя химические модификации, а также усечения. Согласно некоторым вариантам осуществления белок с одной или несколькими аминокислотными заменами сохраняет функцию белка дикого типа или сохраняет практически ту же функцию (например, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, например 50-75% или 75-100% функции) по отношению к функции белка дикого типа. Этот термин также включает в себя функциональные фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа.

Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько раскрытых трансгенов представляют собой встречающиеся в природе последовательности. Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько трансгенов сконструированы так, чтобы являться видоспецифическими. Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько трансгенов оптимизированы по кодонам для экспрессии у представляющего интерес вида, например у собак. Согласно определенным вариантам осуществления трансген сARC оптимизирован по кодонам.

Белки семейства S100, которые можно использовать в соответствии с настоящим раскрытием, включают в себя без ограничения S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A5, S100A6, S100A7 (например, псориазин), S100A8 (например, кальгранулин А), S100A9 (например, кальгранулин В), S100A10, S100A11, S100A12 (например, кальгранулин С), S100A13, S100A14, S100A15 (например, кобнеризин), S100A16, S100B, S100P и S100Z или их варианты.

Согласно некоторым вариантам осуществления белок семейства S100 может представлять собой кальцийсвязывающий белок S100 A1 (S100A1). Согласно некоторым вариантам осуществления S100A1 представляет собой сердечный S100A1 (сS100A1) или его вариант. Белок сS100A1 является регулятором сократимости миокарда. Содержания белка сS100A1 снижаются в гипертрофированной ткани правого желудочка в модели легочной гипертензии. Кроме того, S100A1 является регулятором генетической программы, лежащей в основе сердечной гипертрофии, в том смысле, что S100A1 ингибирует альфа-адренергическую стимуляцию гипертрофических генов, включая в себя MYH7, ACTA1 и S100B. В кардиомиоцитах S100A1 регулирует контролируемую кальцием сеть SR, функцию саркомеров и митохондриальную функцию посредством модуляции активности RyR2, SERCA2, титина и митохондриальной F1-АТФазы. В результате кардиомиоциты и сердца с повышенной экспрессией S100A1 демонстрируют повышенную систолическую и диастолическую функциональные характеристики, что является результатом улучшенных амплитуд

транзиентов Ca^{2+} в результате увеличения нагрузки Ca^{2+} SR и последующего систолического высвобождения Ca^{2+} вместе с уменьшением диастолической утечки Ca^{2+} SR и усиленной ресеквестрации Ca^{2+} . Одновременно S100A1 увеличивает выработку митохондриального высокоэнергетического фосфата и, таким образом, координирует снабжение энергией с помощью повышенной потребности в аденозин-5'-трифосфате (АТФ) за счет увеличения метаболизма Ca^{2+} кардиомиоцитов. Снижение экспрессии S100A1 в кардиомиоцитах связано со сниженной сократительной функцией, что подтверждает патофизиологическое значение этого белка.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность кДНК S100A1 (трансгена) характеризуется 100% идентичности по отношению к встречающейся в природе последовательности S100A1. Согласно другим вариантам осуществления последовательность кДНК S100A1 характеризуется по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности по отношению к встречающейся в природе последовательности S100A1.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность кДНК S100A1 сконструирована так, чтобы являться видоспецифической. Согласно конкретным вариантам осуществления последовательность кДНК S100A1 оптимизирована по кодонам для экспрессии у представляющего интерес вида. Неограничивающие примеры последовательности кДНК S100A1 перечислены ниже.

S100A1 (*canis lupus familiaris*)

(Эталонная последовательность согласно NCBI: XM_005622816.2)

ATGGGCTCTGAGCTGGAGACAGCGATGGAGACTCTCATCAATGTGTTCCATGCC
 CACTCGGGCAAGGAGGGAAACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTAAAGGAGCTG
 CTGCAGACTGAGCTCTCCGGCTTCTGGACGCCAGGAAGGATGCGGATGCTGTGGACA
 AGGTGATGAAAGAGCTAGATGAGAATGGAGATGGGGAGGTGGACTTCCAGGAGTATGT
 GGTGCTGGTGGCTGCCCTCACAGTGGCCTGTAACAACCTTCTTCTGGGAAAACAGTTGA
 (SEQ ID NO: 1)

S100A1 (*felis catus*)

(Эталонная последовательность согласно NCBI: XM_003999773.3)

ATGGGCTCAGAGCTGGAGACGGCGATGGAGACTCTCATCAACGTGTTCCACGCC
 CACTCGGGCAAGGAGGGAGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTAAAAGAGCTG
 CTGCAGACCGAGCTCTCTGGCTTCCTGGACGCCCAGAAGGATGCCGACGCTGTGGACA
 AGGTGATGAAAGAGCTAGACGAGAATGGAGATGGGGAGGTGGACTTCCAAGAGTATG
 TGGTGCTGGTGGCTGCCCTCACAGTGGCCTGTAACAACCTTTTTCTGGGAGAACAGTTGA
 (SEQ ID NO: 2)

Некоторые аспекты настоящей заявки относятся к композициям и способам, которые включают в себя доставку трансгена, кодирующего ингибитор апоптоза (например, антиапоптотический агент). Иллюстративные примеры ингибиторов апоптоза включают в себя *fink*, *p35*, *crmA*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Mcl-1*, *E1B-19K* из аденовируса, а также антагонисты проапоптотических агентов (например, антисмысловые агенты, рибозимы, антитела и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор апоптоза представляет собой репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспаз (ARC). Согласно другим вариантам осуществления ингибитор апоптоза представляет собой сердечный ARC или его вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть желательно доставлять белок семейства S100 и ингибитор апоптоза отдельно. Согласно определенным вариантам осуществления трансген, кодирующий белок семейства S100, доставляется одновременно или последовательно с одним или несколькими низкомолекулярными ингибиторами апоптоза. Иллюстративные низкомолекулярные ингибиторы апоптоза включают в себя ингибиторы *c-Myc*, ингибиторы *Wax*, ингибиторы *p53*, ингибиторы *tBid*, ингибиторы каспаз и ингибиторы представителей проапоптотического семейства *BCL-2*. Согласно некоторым вариантам осуществления репрессор апоптоза может представлять собой сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспаз (сARC).

сARC представляет собой белок регуляции апоптоза, экспрессируемый почти исключительно в миогенных клетках. Он содержит домен рекрутирования каспаз (CARD), через который он блокирует активацию некоторых каспаз-инициаторов. ARC также блокирует независимые от каспаз события, ассоциированные с апоптозом. Апоптоз, вызванный острой ишемией и последующим ремоделированием желудочков, вовлечен как медиатор сердечной недостаточности. Хотя постишемическая сердечная недостаточность может иметь несколько

причин, в последнее время внимание было направлено на понимание вклада апоптоза или запрограммированной гибели клеток. Апоптоз характеризуется сохранением митохондриальных и сарколеммальных мембран, конденсацией ядерного хроматина и фагоцитозом макрофагами или соседними клетками без запуска воспалительного ответа. Известно, что активация апоптоза происходит через механизмы, в которые вовлечены каспазы, семейство цистеиновых протеаз, которые синтезируются как неактивные предшественники и протеолитически расщепляются до их активной формы. ARC способен блокировать активацию апоптоза, блокируя каспазы.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность кДНК сARC (трансгена) характеризуется идентичностью по отношению к встречающейся в природе последовательности сARC. Согласно другим вариантам осуществления последовательность кДНК сARC характеризуется по меньшей мере приблизительно 70% идентичности, по меньшей мере приблизительно 80% идентичности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичности, по меньшей мере приблизительно 99,5% идентичности или по меньшей мере приблизительно 99,9% идентичности по отношению к встречающейся в природе последовательности сARC.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность кДНК сARC сконструирована так, чтобы являться видоспецифической. Согласно конкретным вариантам осуществления последовательность кДНК сARC оптимизирована по кодонам для экспрессии у представляющего интерес вида. Согласно конкретным вариантам осуществления последовательность кДНК сARC оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках собак.

Трансген, кодирующий белок семейства S100 (например, сS100A1), может быть расположен 5' по отношению к трансгену, кодирующему ингибитор апоптоза (например, сARC) в описанных нуклеиновокислотных векторах гAAV. Альтернативно, трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, может быть расположен 5' по отношению к трансгену, кодирующему белок семейства S100 в описанных нуклеиновокислотных векторах гAAV.

Неограничивающие примеры последовательностей кДНК сARC перечислены ниже.

ARC (*canis lupus familiaris*)

(Эталонная последовательность согласно NCBI: NM_001048121.1)

ATGCAGGAAGCGCCAGCCGCGCTGCCACGGAGCCGGGCCCCAGCCCCGTGCCT
 GCCTTCCTCGGCAAGCTGTGGGCGCTGGTGGGCGACCCGGGGACCGACCACCTCATCC
 GCTGGAGCCCGAGCGGGACCAGTTTCCTCGTCAGCGACCAGAGCCGCTTCGCCAAGGA
 AGTGCTGCCCCAGTACTTCAAGCACAGCAACATGGCGAGCTTCGTGCGGCAGCTCAAC
 ATGTACGGTTTTTCGGAAGGTGGTGAAGCATCGAGCAGGGCGGCCTGCTCAGGCCGGAGC
 GCGACCACGTGAGTTCAGCACCCGAGCTTCGTCCGCGGCCGAGAGCAACTCCTGGA
 GCGCGTGCGGCGCAAGGTGCCGCGCTGCGCAGCGACGACGGCCGCTGGCGCCCCGAG
 GACCTGGGCCGGCTGCTGGGCGAGGTGCAGGCTTTGCGGGGAGTGCAGGAGATCACCG
 AGGCGCGGCTGCGGGAGCTCAGGCAGCAGAACGAGATCTTATGGAGGGAGGTGGTGA
 CTCTGCGGCAGAGCCACGGTCAGCAGCATCGCGTCATTGGCAAGCTGATCCAGTGCCTC
 TTTGGGCCACTTCAGACAGGGTCCAGCGGCGCAGGAGCTAAGAGAAAGCTGTCTCTGA
 TGCTGGATGAGGGGAGCTCATGCCAACACCGGCCAAATTCAACACCTGTCCTTTACCT
 GGTGCCCTCTTGCAAGGATCCCTACTTTATCCAGTCGCCCCTCCAGAGACCACCTGGG
 CCTCAGCAGCTCTCATAGGACCAGGGGCCCTATCATCTCTGACATCCATGAAGACTCTC
 CCTCCCCTGATGGGACCAGGCTTTCTCCTTCCAGTGGTGGCAGGAGGGAGAAGGGCCTG
 GCACTGCTCAAAGAAGAGCCGGCCAGCCAGGGGGGGAAGGCGAGGCCGGGCTGGCC
 CTGGCCCCAAACGAGTGTGACTTCTGCGTGACAGCCCCCCCCCTGTCCGTGGCTGT
 GGTGCAGGCCATCCTGGAAGGGAAGGGGAACTTCAGCCCCGAGGGGCCCAGGAATGCC
 CAACAGCCTGAACCAAGGGGTCCCAGGGAGGTACCTGACAGGGGGACTCTGGGCCTGG
 ACAGGGGGGCACGAAGCCCAGAGAATCTGCTGCCTCCCATGCTGCTTCGGGCCCCCCT
 GAAAGTGTGGAGCCTGCAGGGCCCCTGGATGTGCTGGGCCCCAGCCATCAAGGGCGAG
 AATGGACCCTGATGGACTTGGACATGGAGCTGTCCCTGATGCAGCCCTTGGGTCCAGAG
 AGGAGTGAGACTGAGCTGGCGGTCAAGGGGTAAATCTCCGGGGCCAGGGAAGGACT
 CCACACTTGGGGCACCACTCCTGCTCGATGTCCAAGCGGCTTTGGGAGGCCAGCTCTC
 AGCCTTCCTGGAGCTTTAACCATTTACAGCACCCCTGAGAGCCGAGCCAACCTAGG
 CCCAGGGGCCAATCCCTCCCCCTGA (SEQ ID NO: 3)

ARC (*felis catus*)

(Эталонная последовательность согласно NCBI: XM_006941587.2)

ATGGGCAATGCGCAGGAGCGGCCCTCAGAGACGATCGATCGCGAGCGGAAACG
 CCTAGTGGAGACGCTGCAGGACGACTCCGGGCTGCTGCTGGATGCACTGCTGGCGCGC

GGCGTGCTCACCGGGCCTGAGTATGAGGGCGTTGGACGCGCTGCCTGATGCCGAGCGCA
 GGGTGGCGTCGCCTGCTGCTGCTGGTACAAAGCAAGGGCGAGGCCGCCTGCCAGGAGCT
 GCTGCACTGCGCCCAGCGTACTACGCGCGCGCCAGACCCGGCCTGGGACTGGCAGCAC
 GTGGGCACTGGCTACCGGGAACGCAGCTACGACTCTCCATGCCCTGGCCACTGGACGC
 CTGAGGCACCTGACTTGAGGACCGCTTGCCCCGAAACGCCAGAGCTTCAGACTGCGA
 CGAGGCTGGGGTTTCAGGGGGCTCGGAGGCAGTATCCGGAACCCTCGAGGAACTCGAT
 CCGGAAGTGGAAGCTGAAGTCTCTGAAGGGGCTGAGCCAGAGCCAGAGCCAGAGCCC
 GACTTTGAGGCGGGTGATGAGTCTGAAGATTCC (SEQ ID NO: 4)

Векторы рекомбинантного AAV (rAAV)

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к векторам рекомбинантного AAV, которые можно использовать для генной терапии заболеваний сердца. Используемый в настоящем документе термин «вектор» может относиться к нуклеиновокислотному вектору (например, плазмиде или рекомбинантному вирусному геному), геному AAV дикого типа или вирусу, который содержит вирусный геном.

Геном AAV дикого типа представляет собой одноцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту (оцДНК) с положительным или отрицательным направлением. Геном содержит два инвертированных концевых повтора (ITR), по одному на каждом конце цепи ДНК, и две открытые рамки считывания (ORF): гер и сар между ITR. ORF гер содержит четыре перекрывающихся гена, кодирующих белки Rep, необходимые для жизненного цикла AAV. ORF сар содержит перекрывающиеся гены, кодирующие капсидные белки: VP1, VP2 и VP3, которые взаимодействуют друг с другом с образованием вирусного капсида. VP1, VP2 и VP3 транслируются с одного транскрипта мРНК, который может быть сплайсирован двумя разными способами. Либо более длинный, либо более короткий интрон может быть вырезан, что приведет к образованию двух изоформ мРНК: изоформы мРНК длиной ~ 2,3 т.п.н. и изоформы мРНК длиной ~ 2,6 т.п.н. Капсид образует супрамолекулярную сборку приблизительно из 60 индивидуальных субъединиц капсидного белка в безболоечную икосаэдрическую решетку T-1, способную защищать геном AAV. Зрелый капсид AAV состоит из VP1, VP2 и VP3 (молекулярные массы приблизительно 87, 73 и 62 кДа соответственно) в соотношении приблизительно 1:1:10.

Частицы рекомбинантного AAV (rAAV) могут содержать рекомбинантный нуклеиновокислотный вектор (далее именуемый «вектором rAAV»), который может содержать как минимум следующее: (а) одна или несколько гетерологичных областей

нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую трансген; и (b) одна или несколько областей, содержащих последовательности, которые облегчают интеграцию области гетерологичной нуклеиновой кислоты (необязательно с одной или несколькими областями нуклеиновой кислоты, содержащими последовательность, которая способствует экспрессии) в геном субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности, облегчающие интеграцию гетерологичной области нуклеиновой кислоты (необязательно с одной или несколькими областями нуклеиновой кислоты, содержащими последовательность, которая облегчает экспрессию) в геном субъекта, представляют собой последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) (например, последовательности ITR дикого типа или сконструированные последовательности ITR), фланкирующие одну или несколько областей нуклеиновой кислоты (например, области гетерологичных нуклеиновых кислот). Последовательности ITR могут происходить из любого серотипа AAV (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) или могут происходить из более чем одного серотипа. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности ITR происходят из серотипов AAV2 или AAV6. Согласно некоторым вариантам осуществления первый серотип, представленный в настоящем документе, не является серотипом AAV2 или AAV8. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности ITR первого серотипа происходят из AAV3, AAV5 или AAV6. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности ITR происходят из AAV2, AAV3, AAV5 или AAV6. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности ITR имеют тот же серотип, что и капсид (например, последовательности ITR AAV6 и капсид AAV6 и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления последовательности ITR происходят из серотипа AAVrh.10.

Последовательности ITR и плазмиды, содержащие последовательности ITR, известны в настоящей области техники и коммерчески доступны (см., например, продукты и услуги, доступные от Vector Biolabs, Филадельфия, Пенсильвания; Cellbiolabs, Сан-Диего, Калифорния; Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния; и Addgene, Кембридж, Массачусетс; и Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Byrne BJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):14082-7; и Curtis A. Machida. *Methods in Molecular Medicine™. Viral Vectors for Gene Therapy Methods and Protocols*. 10.1385/1-59259-304-6:201 © Humana Press Inc. 2003. Chapter 10. Targeted Integration by Adeno-Associated Virus. Matthew D. Weitzman, Samuel M. Young Jr., Toni Cathomen and Richard Jude

Samulski; патенты США №№ 5139941 и 5962313, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV содержит остов плазмиды pTR-UF-11, которая представляет собой плазмиду, содержащую ITR AAV2. Эта плазида коммерчески доступна из Американской коллекции типовых культур (ATCC MBA-331).

Согласно некоторым вариантам осуществления векторы гAAV согласно настоящему изобретению содержат как трансген cS100A1, так и трансген ARC для их одновременной доставки и экспрессии у субъекта. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления вектор гAAV содержит одну или несколько областей, содержащих последовательность, которая способствует экспрессии трансгена (например, гетерологичная нуклеиновая кислота), например, последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеиновой кислотой. В настоящей области техники известно множество таких последовательностей. Неограничивающие примеры последовательностей контроля экспрессии включают в себя промоторы, инсуляторы, сайленсеры, элементы ответа, интроны, энхансеры, сайты инициации, участки внутренней посадки рибосомы (IRES), сигналы терминации и сигналы поли(A). В настоящем документе рассматривается любая комбинация таких контрольных последовательностей (например, промотор и сигнал поли(A)). Согласно некоторым вариантам осуществления векторы гAAV содержат промотор, который функционально связан с кодирующей последовательностью трансгенов и способствует экспрессии трансгенов.

Используемый в настоящем документе термин «промотор» относится к контрольной области нуклеиновой кислоты, в которой контролируется инициация и скорость транскрипции оставшейся части последовательности нуклеиновой кислоты. Промотор управляет транскрипцией последовательности нуклеиновой кислоты, которую он регулирует, таким образом, он, как правило, расположен в сайте начала транскрипции гена или рядом с ним. Промотор может характеризоваться длиной, например, от 100 до 1000 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления промотор функционально связан с нуклеиновой кислотой или последовательностью нуклеиновой кислоты (нуклеотидной последовательностью). Промотор считается «функционально связанным» с последовательностью нуклеиновой кислоты, которую он регулирует, когда промотор находится в правильном функциональном положении и ориентации относительно последовательности, так что промотор регулирует (например, для контроля («управления») транскрипционной инициации и/или экспрессии) эту последовательность.

«Промоторы, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, могут включать в себя любой промотор, который может управлять экспрессией трансгенов в сердце субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления промотор может являться тканеспецифическим промотором. Используемый в настоящем документе термин «тканеспецифический промотор» относится к промоторам, которые могут функционировать только в определенном типе ткани, например в сердце. Таким образом, «тканеспецифический промотор» не способен управлять экспрессией трансгенов в других типах тканей. Согласно некоторым вариантам осуществления промотор, который можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой ограниченный для сердца промотор. Например, промотор может без ограничения являться промотором из одного из следующих генов: ген тяжелой цепи α -миозина, ген тяжелой цепи β -миозина, ген 2v легкой цепи миозина, ген 2a легкой цепи миозина, ген CARP, ген сердечного α -актина, ген сердечного мускаринового ацетилхолина m2, ANF, сердечный тропонин C, сердечный тропонин I, сердечный тропонин T (cTnT), ген сердечной Ca-АТФазы саркоплазматического ретикулула, скелетный α -актин; или искусственный сердечный промотор, происходящий из гена MLC-2v.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытых векторов гAAV два или более трансгена функционально контролируются одним промотором. Согласно другим вариантам осуществления каждый из двух или более трансгенов функционально контролируется отдельным промотором.

Согласно некоторым вариантам осуществления векторы гAAV согласно настоящему изобретению дополнительно содержат участок внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES представляет собой нуклеотидную последовательность, которая позволяет инициировать трансляцию в середине последовательности информационной РНК (мРНК) как часть более широкого процесса синтеза белка. Как правило, у эукариот трансляция может быть инициирована только на 5'-конце молекулы мРНК, поскольку распознавание 5'-кэпа необходимо для сборки комплекса инициации. Согласно некоторым вариантам осуществления IRES располагается между трансгенами. Согласно таким вариантам осуществления белки, кодируемые разными трансгенами, транслируются индивидуально (т.е. в отличие от трансляции в виде белка слияния).

Согласно некоторым вариантам осуществления векторы гAAV согласно настоящему раскрытию дополнительно содержат сигнал полиаденилирования (pA). Эукариотические мРНК, как правило, транскрибируются как мРНК-предшественники. мРНК-предшественник процессируется с образованием зрелой мРНК, включая в себя процесс полиаденилирования.

Процесс полиаденилирования начинается по окончании транскрипции гена. Расположенный наиболее 3' сегмент новообразованной мРНК-предшественника сначала отщепляется с помощью набора белков. Затем эти белки синтезируют поли(А) хвост на 3'-конце РНК. Сайт расщепления, как правило, содержит сигнал полиаденилирования, например, AAUAAA. Хвост поли(А) важен для ядерного экспорта, трансляции и стабильности мРНК.

Согласно некоторым вариантам осуществления векторы гAAV согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере по порядку от 5' к 3' последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), промотор, функционально связанный с первым трансгеном, IRES, функционально связанный со вторым трансгеном, сигналом полиаденилирования и последовательностью второго инвертированного концевой повтора (ITR) AAV.

Согласно некоторым вариантам осуществления гAAV является кольцевым. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор гAAV является линейным. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор гAAV является одноцепочечным. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор гAAV является двухцепочечным. Согласно некоторым вариантам осуществления вектор гAAV представляет собой самокомплементарный вектор гAAV. Любой вектор гAAV, описанный в настоящем документе, может быть инкапсидирован вирусным капсидом, таким как капсид AAV6, или любым другим серотипом (например, серотипом, который имеет тот же серотип, что и последовательности ITR).

Частицы рекомбинантного AAV (rAAV)

Кроме того, в настоящем документе представлены частицы гAAV или препараты гAAV, содержащие такие частицы. Частицы гAAV содержат вирусный капсид и вектор гAAV, как описано в настоящем документе, который инкапсидирован вирусным капсидом. Способы получения частиц гAAV известны в настоящей области техники и коммерчески доступны (см., например, Zolotukhin *et al.* Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* 28 (2002) 158–167; и патентные публикации США №№ US 2007/0015238 и US 2012/0322861, которые включены в настоящий документ посредством ссылки; а также плазмиды и наборы, доступные от ATCC и Cell Biolabs, Inc.). Например, плазмиду, содержащую вектор гAAV, можно объединить с одной или несколькими плазмидами-помощниками, например, которые содержат ген *rep* (например, кодирующий Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40) и ген *cap* (кодирующий VP1, VP2 и VP3, включая в себя модифицированную область VP3, как описано в настоящем документе), и трансфицировать в

линию клеток-продуцентов таким образом, чтобы частица гAAV могла быть упакована и впоследствии очищена.

Частицы гAAV или частицы в препарате гAAV, как раскрыто в настоящем документе, могут относиться к любому серотипу AAV, включая в себя любое производное или псевдотип (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 2/1, 2/5, 2/8, 2/9, 3/1, 3/5, 3/8 или 3/9). Используемый в настоящем документе серотип гAAV и частицы гAAV относятся к серотипу капсидных белков рекомбинантного вируса. Согласно некоторым вариантам осуществления частица гAAV представляет собой гAAV6 или гAAV9. Неограничивающие примеры производных и псевдотипов включают в себя AAVrh.10, гAAV2/1, гAAV2/5, гAAV2/8, гAAV2/9, гибрид AAV2-AAV3, AAVhu.14, AAV3a/3b, AAVrh32.33, AAV-HSC15, AAV-HSC17, AAVhu.37, AAVrh.8, CHt-P6, AAV2.5, AAV6.2, AAV2i8, AAV-HSC15/17, AAVM41, AAV9.45, AAV6(Y445F/Y731F), AAV2.5T, AAV-HAE1/2, клон 32/83 AAV, AAVShH10, AAV2 (Y->F), AAV8 (Y733F), AAV2.15, AAV2.4, AAVM41 и AAVr3.45. Такие серотипы и производные/псевдотипы AAV, а также способы получения таких производных/псевдотипов известны в настоящей области техники (см., например, Mol Ther. 2012 Apr;20(4):699-708. doi: 10.1038/mt.2011.287. Epub 2012 Jan 24. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. Asokan A1, Schaffer DV, Samulski RJ.). Согласно некоторым вариантам осуществления частица гAAV представляет собой псевдотипированную частицу гAAV, которая содержит (a) вектор гAAV, содержащий ITR одного серотипа (например, AAV2, AAV3), и (b) капсид, состоящий из капсидных белков, полученных из другого серотипа (например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10). Способы получения и использования псевдотипированных векторов гAAV известны в настоящей области техники (см., например, Duan *et al.*, *J. Virol.*, 75:7662-7671, 2001; Halbert *et al.*, *J. Virol.*, 74:1524-1532, 2000; Zolotukhin *et al.*, *Methods*, 28:158-167, 2002; и Auricchio *et al.*, *Hum. Molec. Genet.*, 10:3075-3081, 2001).

Генная терапия с помощью гAAV при заболеваниях сердца

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим одну или несколько раскрытых частиц или препаратов гAAV. Согласно некоторым вариантам осуществления препарат гAAV содержит частицу гAAV, содержащую вектор гAAV, содержащий ITR первого серотипа (например, AAV3, AAV5, AAV6 или AAV9) и капсидные белки, инкапсидирующие вектор гAAV. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидные белки относятся к первому серотипу (например, AAV3, AAV5, AAV6 или AAV9). Согласно некоторым вариантам осуществления препарат характеризуется по меньшей мере в

четыре раза более высокой эффективностью трансдукции (например, в клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека, такой как Huh7) по сравнению с препаратом, полученным с использованием вектора гAAV, содержащего ITR AAV2.

Как описано в настоящем документе, такие композиции могут дополнительно содержать фармацевтическое вспомогательное вещество, буфер или разбавитель, и могут быть составлены для введения в клетку-хозяин *ex vivo* или *in situ* у животного и, в частности, человека. Такие композиции могут дополнительно необязательно содержать липосому, липид, липидный комплекс, микросферу, микрочастицу, наносферу или наночастицу, или могут быть составлены иным образом для введения в клетки, ткани, органы или тело субъекта, нуждающегося в этом. Такие композиции могут быть составлены для использования в различных типах терапии, таких как, например, уменьшение интенсивности, профилактика и/или лечение состояний, таких как недостаточность пептида, недостаточность полипептида, избыточная экспрессия пептида, избыточная экспрессия полипептида, включая в себя, например, состояния, которые приводят к заболеваниям или нарушениям, как описано в настоящем документе.

Векторы гAAV, частицы гAAV или композицию, содержащую частицы гAAV согласно настоящему раскрытию, можно использовать для генной терапии заболеваний сердца у нуждающегося в этом субъекта. Примеры заболеваний сердца, которые можно лечить с использованием способов и композиций согласно настоящему изобретению, включают в себя без ограничения кардиомиопатию и острую ишемию. Согласно некоторым вариантам осуществления кардиомиопатия сердца представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию или дилатационную кардиомиопатию. Сердечная недостаточность, вызванная кардиомиопатией или другими заболеваниями сердца, состоит из двух компонентов: дисфункции обмена кальция и апоптоза. Векторы гAAV, частицы гAAV и композиции, содержащие частицы гAAV, можно использовать для лечения такой сердечной недостаточности при введении нуждающемуся в этом субъекту, например, посредством прямой инъекции в сердце. Векторы гAAV, частицы гAAV и композиции, содержащие частицы гAAV, управляют одновременной экспрессией белка cS100A1 и белков ARC в кардиомиоцитах субъекта. S100A1 улучшит аспекты обмена кальция, включая в себя нормализацию транзистов кальция в саркоплазматической ретикулярной сети, что приведет к нормализации сократительной функции. ARC блокирует апоптоз, инициированный митохондриальными и немитохондриальными механизмами (например, апоптоз, вызванный растяжением), а также улучшает функцию митохондрий. Таким образом, синергетические преимущества двух

белков, экспрессируемых трансгенами согласно настоящему раскрытию, могут привести к лучшим долгосрочным терапевтическим результатам за счет нацеленного воздействия на оба аспекта кардиомиопатии.

Таким образом, другие аспекты настоящего изобретения относятся к введению нуждающемуся в этом субъекту частиц гAAV согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления количество частиц гAAV, вводимых субъекту, может быть порядка от приблизительно 10^6 - приблизительно 10^{14} частиц/мл или приблизительно 10^3 - приблизительно 10^{13} частиц/мл, или составлять любые значения между ними для любого диапазона, например, приблизительно 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} или 10^{14} частиц/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления количество частиц гAAV, вводимых субъекту, может находиться в диапазоне от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^{14} векторных геномов (vgs)/мл или от 10^3 до 10^{15} vgs/мл, или составлять любые промежуточные значения для любого диапазона, например, приблизительно 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} или 10^{14} vgs/мл. Частицы гAAV можно вводить в виде разовой дозы или разделить на два или более введения, что может потребоваться для достижения терапии конкретного заболевания или нарушения, которое лечат. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту доставляют дозы в диапазоне от приблизительно 0,0001 мл до приблизительно 10 мл.

При необходимости частицы гAAV и векторы гAAV также можно вводить в комбинации с другими агентами, такими как, например, белки или полипептиды или различные фармацевтически активные агенты, включая в себя одно или несколько введений терапевтических полипептидов, биологически активных фрагментов или их вариантов. Фактически, практически нет ограничений для других компонентов, которые также могут быть включены, при условии, что дополнительные агенты не вызывают значительного неблагоприятного воздействия при контакте с клетками-мишенями или тканями хозяина. Таким образом, частицы или препараты гAAV можно доставлять вместе с различными другими фармацевтически приемлемыми агентами, как требуется в конкретном случае. Такие композиции можно очищать из клеток-хозяев или других биологических источников или, альтернативно, можно химически синтезировать, как описано в настоящем документе.

Составы, содержащие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и/или растворы-носители, хорошо известны специалистам в настоящей области техники, как и разработка подходящих режимов введения доз и схем лечения для использования конкретных композиций, описанных в настоящем документе, в различных схемах лечения, включая в себя,

например, пероральное, парентеральное, внутривенное, интраназальное, внутрисуставное и внутримышечное введение и состав.

Как правило, эти составы могут содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% терапевтического агента (например, частицу или препарат гAAV и/или вектор гAAV) или более, хотя процент активного(ых) ингредиента(ов) может, конечно, варьироваться и, как правило, может составлять от приблизительно 1 или 2% до приблизительно 70 или 80% или более от массы или объема всей композиции. Естественно, количество терапевтического(их) агента(ов) в каждой терапевтически применимой композиции можно получить таким образом, чтобы подходящая дозировка была получена в любой данной стандартной дозе соединения. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полужизни, путь введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические соображения, будут учитываться специалистом в настоящей области техники при получении таких фармацевтических составов. Кроме того, могут быть желательны различные дозировки и схемы лечения.

В определенных обстоятельствах будет желательно доставлять частицы гAAV или препараты гAAV и/или векторы гAAV в фармацевтических композициях, составленных подходящим образом, описанных в настоящем документе; будь то подкожно, интракардиально, внутриглазным способом, интравитреально, парентерально, подкожно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, внутримышечно, интратекально, перорально, внутрибрюшинно, с помощью пероральной или назальной ингаляции, или путем прямой инъекции в одну или несколько клеток (например, кардиомиоциты и/или другие клетки сердца), ткани или органы. Согласно некоторым вариантам осуществления частицы гAAV или композицию, содержащую частицы гAAV согласно настоящему изобретению, вводят непосредственно в сердце субъекта. Прямая инъекция в сердце может включать в себя инъекцию в одну или несколько тканей миокарда, сердечную оболочку или скелетную мышцу, окружающую сердце, например, с использованием игольчатого катетера.

Фармацевтические составы композиций, подходящие для инъекций, включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии. Согласно некоторым вариантам осуществления состав является стерильным и жидким до такой степени, чтобы его можно было легко набрать с помощью шприца. Согласно некоторым вариантам осуществления форма стабильна в условиях производства и хранения и защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может являться растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, физиологический раствор, этанол, многоатомный спирт

(например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси, растительные масла или другие фармацевтически приемлемые носители, такие как те, которые в целом признаны безопасными (GRAS) Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае диспергирования и использования поверхностно-активных веществ.

Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или несущей среде, с которыми вводят частицу rAAV или препарат rAAV и/или векторы rAAV. Такие фармацевтические носители могут являться стерильными жидкостями, такими как вода и масла, в том числе масла на нефтяной основе, такого как минеральное масло, растительное масло, такое как арахисовое масло, соевое масло и кунжутное масло, масло животного происхождения или масло синтетического происхождения. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей.

Для введения водного раствора для инъекций, например, раствор можно подходящим образом забуферить, если необходимо, и жидкий разбавитель можно сначала сделать изотоническим с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, интравитреального, подкожного и внутрибрюшинного введения. В этой связи стерильная водная среда, которую можно использовать, будет известна специалистам в настоящей области техники в свете настоящего раскрытия. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса, либо ввести в предполагаемое место инфузии (см., например, «Remington's Pharmaceutical Sciences» 15-е изд., стр. 1035-1038 и 1570-1580). Некоторое изменение дозировки обязательно произойдет в зависимости от состояния субъекта, которого лечат. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определяет подходящую дозу для отдельного субъекта. Более того, для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, а также общим стандартам безопасности и чистоты, как того требует, например, стандарты Управления по биологическим препаратам FDA.

Стерильные растворы для инъекций получают путем включения частиц rAAV или препаратов rAAV, белков Rep и/или векторов rAAV в необходимом количестве в соответствующий растворитель с несколькими другими ингредиентами, перечисленными выше, если требуется, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии

получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются способы вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые дают на выходе порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным желаемым ингредиентом из его раствора, предварительно стерилизованного фильтрацией.

Количество частиц гAAV или препарата гAAV и/или композиций вектора гAAV и время введения таких композиций будут находиться в пределах компетенции квалифицированного специалиста, ознакомившегося с настоящими идеями. Однако вполне вероятно, что введение терапевтически эффективных количеств композиций согласно настоящему изобретению может быть достигнуто путем однократного введения, такого как, например, однократная инъекция достаточного количества инфекционных частиц для обеспечения терапевтического эффекта пациенту, проходящему такое лечение. В качестве альтернативы, в некоторых обстоятельствах может быть желательно обеспечить многократное или последовательное введение частиц гAAV или препарата гAAV и/или композиций вектора гAAV в течение относительно короткого или относительно длительного периода времени, что может быть определено практикующим врачом, наблюдающий за введением таких композиций.

Композиции согласно настоящему изобретению могут включать в себя частицы гAAV или препараты гAAV и/или векторы гAAV, отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными ингредиентами, которые могут быть получены из природных или рекомбинантных источников или синтезированы химическим путем. Согласно некоторым вариантам осуществления частицы гAAV или препараты гAAV вводят в комбинации, либо в одной и той же композиции, либо вводят как часть одной и той же схемы лечения, с ингибитором протеасом, таким как бортезомиб, или гидроксимочевинной.

Используемый в настоящем документе термин «лечить» заболевание означает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, испытываемого субъектом. Описанные выше композиции, как правило, вводят субъекту в эффективном количестве, которое является количеством, способным дать требуемый результат. Требуемый результат будет зависеть от вводимого активного агента. Например, эффективное количество частицы гAAV может представлять собой количество частицы, которое способно переносить гетерологичную нуклеиновую кислоту в орган-хозяин, ткань-хозяин или клетку-хозяин.

Токсичность и эффективность композиций, используемых в способах по настоящему изобретению, можно определить стандартными фармацевтическими процедурами с использованием либо клеток в культуре, либо экспериментальных животных для определения LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение доз между токсичностью и эффективностью представляет собой терапевтический индекс, который может быть выражен как отношение LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительными являются те композиции, которые демонстрируют большие терапевтические индексы. Хотя можно использовать композиции, которые проявляют токсические побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая сводит к минимуму потенциальное повреждение от таких побочных эффектов. Дозировка описанных в настоящем документе композиций, как правило, находится в диапазоне, который включает в себя ED₅₀ с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способам и препаратам для применения в отношении субъекта, такого как человек или субъект, не являющийся человеком, клетки-хозяина *in situ* у субъекта или клетки-хозяина, полученной от субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является млекопитающим. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой животное-компаньон. Используемый в настоящем документе термин «животное-компаньон» относится к домашним и другим одомашненным животным. Неограничивающие примеры животных-компаньонов включают в себя собак и кошек; домашний скот, такой как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы и куры; и других животных, таких как мыши, крысы, морские свинки и хомяки. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта характеризуется наличием или у него подозревается заболевание сердца, которое можно лечить с помощью генной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект находится на любой стадии сердечной недостаточности. Согласно некоторым вариантам осуществления сердечная недостаточность вызвана кардиомиопатией. Согласно некоторым вариантам осуществления сердечная недостаточность вызвана гипертрофической кардиомиопатией или дилатационной кардиомиопатией.

Следующие ниже примеры предназначены для иллюстрации определенных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения. Полное содержание всех ссылок (включая в себя литературные ссылки, выданные патенты,

опубликованные заявки на патенты и совместно рассматриваемые заявки на патенты), цитируемые в настоящей заявке, явно включены в настоящий документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Терапевтически нацеленное воздействие на несколько аспектов сердечной недостаточности

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к композициям и способам, которые можно использовать для лечения одного или нескольких состояний сердца (например, кардиомиопатии, гипертрофической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, сердечной недостаточности, заболевания сердца и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления композиции, предусмотренные настоящей заявкой, можно вводить субъекту посредством множественных прямых инъекций в сердце. Иллюстративный конструкт AAV, который может быть предоставлен субъекту, изображен на фиг. 1. Согласно определенным вариантам осуществления такой иллюстративный конструкт инкапсидирован рекомбинантным AAV (например, AAV6) и содержит видоспецифические кодирующие последовательности кальцийсвязывающего белка S100 A1 (S100A1) и репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспаз (ARC) для решения двух отдельных аспектов одного или нескольких состояний сердца (например, кардиомиопатии). Оба трансгена иллюстративного конструкта на фиг. 1 управляются сердечным промотором TnT и поэтому экспрессируются только в кардиомиоцитах.

S100A1 улучшит аспекты обмена кальция, включая в себя нормализацию транзиентов кальция в саркоплазматической ретикулярной сети, что приведет к нормализации сократительной функции. ARC блокирует апоптоз, инициированный митохондриальными и немитохондриальными механизмами (например, апоптоз, индуцированный растяжением), а также улучшает функцию митохондрий. На эти два отдельных компонента сердечной недостаточности (дисфункция обмена кальция и апоптоз) воздействуют отдельно, но никогда вместе. Таким образом, синергетические преимущества такого подхода предоставляют терапевтические возможности, которые могут привести к улучшению долгосрочных результатов лечения. Путем нацеленного воздействия на оба аспекта кардиомиопатии композиции и способы, предусмотренные в настоящей заявке, можно использовать для лечения нескольких состояний сердца (например, гипертрофической или дилатационной кардиомиопатии) и они будут благоприятны на любой стадии сердечной недостаточности.

Все публикации, патенты и записи в базе данных последовательностей, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация или патент были специально и индивидуально включены посредством ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая в себя любые определения в настоящем документе, будет иметь преимущественную силу.

Пример 2: Генная терапия дилатационной кардиомиопатии у собак

Дилатационная кардиомиопатия (DCM) представляет собой вторую по частоте причину приобретенных пороков сердца у собак, чаще всего поражающая собак крупных пород, таких как доберман-пинчер, немецкие доги и ирландские волкодавы. У людей, страдающих этим заболеванием, существуют хирургические варианты, такие как трансплантация сердца и вспомогательные устройства для левого желудочка. Однако в ветеринарии единственным терапевтическим вариантом является лечение симптомов сердечной недостаточности. Прогноз для пораженной собаки зависит от стадии заболевания и породы. Например, большинство доберман-пинчеров живут менее 6 месяцев после развития застойной сердечной недостаточности (CHF). Напротив, другие породы, такие как коккер-спаниели, как правило, живут дольше. По мере прогрессирования заболевания сердца нарушение работы каналов, которые регулируют движение кальция в клетках сердца, способствует нарушению внутриклеточного обмена ионов кальция, дальнейшему нарушению регуляции сокращения и расслабления сердца. Примечательно, что нарушения транспорта кальция были обнаружены у собак с встречающимся в природе DCM5, а также возникают при сердечной недостаточности, вторичной по отношению к различным этиологиям.

Стратегии переноса генов, разработанные для нормализации аномалий внутриклеточного обмена ионов кальция, улучшают сердечно-сосудистые заболевания в моделях с использованием мелких и крупных животных с различными формами заболеваний сердца. Фактически, клинические испытания на людях уже проводят для проверки этого терапевтического подхода к кардиомиопатии, и предварительные результаты обнадеживают. Пилотное исследование оценивает эффективность доставки генов, предназначенных для нормализации обмена кальция у доберман-пинчеров, страдающих DCM и демонстрирующих CHF. Доберман-пинчеры используют потому, что DCM широко распространен в этой породе, и заболевание имеет тенденцию быстро и равномерно прогрессировать в этой породе после развития CHF. Новые способы борьбы с DCM окажут значительное влияние на все породы

собак, предрасположенных к этому идиопатическому заболеванию, включая в себя доберман-пинчеров, боксеров, немецких догов, немецких овчарок, золотистых ретриверов и т.д. Примечательно, что в предыдущих исследованиях содержания белка миокарда в образцах от собак с наиболее распространенными формами встречающихся в природе заболеваний сердца (дегенеративная болезнь клапана у собак и DCM) обнаружили, что содержания нескольких белков (включая в себя S100A1) являлись патологическими (S100A1 был снижен).

Эти результаты позволяют предположить, что доставка генов, нацеленная на S100A1, может эффективно лечить DCM, а также миокардиальную недостаточность, развивающуюся вторично по отношению к дегенеративному заболеванию клапана. Кроме того, апоптоз (запрограммированная гибель клеток) чаще встречается в пораженном миокарде, а ARC является мощным и многофункциональным ингибитором апоптоза. В настоящее время стандартом лечения сердечной недостаточности в ветеринарии является лечение гиперволемии и застоя. Техники доставки генов, направленные на патологические регуляторные молекулы миокарда, предлагают механистическую мишень, которая может позволить врачу-ветеринару впервые конкретно воздействовать на процесс заболевания миокарда. Более того, стоимость, связанная с современными технологиями производства векторов и интрамиокардиальной доставкой вектора, делает стоимость этой терапии доступной для многих владельцев, при этом ожидается, что со временем затраты снизятся.

Минимально инвазивный способ переноса генов с использованием векторов AAV 2/6 привел к трансдукции >75% клеток миокарда у нормальных собак (см. Bish LT, Sleeper MM, Brainard B, *et al.* Percutaneous transendocardial delivery of self-complementary adeno-associated virus 6 achieves global cardiac gene transfer in canines. *Mol. Ther.* 16, 1953-9 (2008)). Шесть нормальных беспородных собак лечили вектором AAV2 или AAV6, кодирующим доминантно-отрицательную форму фосфоламбана (dn-PLN) (псевдофосфорилированная форма, которая конкурирует с нативным фосфоламбаном, что снижает его ингибирующее действие на SERCA2a) (n = 4) или AAV2/6 dn-PLN и S100A1 (n=2). Все собаки оставались здоровыми с нормальной функцией сердечно-сосудистой системы в течение 2 лет после лечения, что указывает на то, что терапия не вызывала миокардит или существенно не изменяла сердечную функцию, что подтверждает безопасность этого терапевтического подхода. Действительно, инъекции были сделаны более чем 40 нормальным и больным собакам (см. ниже), и результаты, полученные на сегодняшний день, показывают, что техника инъекции хорошо переносится. Кроме того, в 20 случайных случаях у собак в Ветеринарной больнице Мэтью Дж. Райана Пенсильванского университета (Matthew J. Ryan Veterinary Hospital of the

University of Pennsylvania) взяли образцы антител к rAAV2/6 и обнаружили, что титры находятся в приемлемом диапазоне для лечения у 19 из 20 собак, что указывает на то, что предыдущие иммунные ответы не исключают значительную часть терапевтических кандидатов. Чтобы определить, был ли этот терапевтический подход эффективным для лечения DCM, затем лечили португальских водяных собак с тяжелой формой быстро прогрессирующей ювенильной DCM. Примечательно, что собаки, которым вводили AAV2/6 dn-PLN, демонстрировали заметное снижение фосфорилированного PLN, что подтверждает потенциальную способность этого подхода нормализовать обмен кальция в этой модели заболевания. Более того, доставка гена с помощью вектора, содержащего как dn-PLN, так и S100A1, замедляла развитие CHF, вторичной по отношению к DCM, в большей степени, чем доставка вектора, содержащего только dn-PLN. Комбинированный вектор отсрочивал начало CHF в среднем на 4 недели по сравнению с терапией только dn-PLN. По этой причине комбинированный векторный подход используют в пилотном исследовании, чтобы определить, эффективна ли генная терапия для продления жизни доберманов, страдающих возникшей во взрослом возрасте DCM и застойной сердечной недостаточностью.

Дизайн исследования: слепое, плацебо-контролируемое исследование. На основании последних 12 пролеченных случаев DCM и CHF у доберман-пинчеров средняя выживаемость составила 148 дней (стандартное отклонение 160 дней). Используя мощность, составляющую 0,8, критерий альфа (двусторонний), составляющий 0,05, и отношение случаев к контролю, равное 1, требуется размер выборки из 13 собак в каждой группе для выявления разницы в 6-месячной выживаемости. Этот расчет произвели с использованием параметрического критерия размера выборки. В исследование включали 26 доберман-пинчеров с DCM и контролируемой CHF. Чтобы иметь право на участие в исследовании, собака должна содержать титр циркулирующих нейтрализующих антител к AAV2/6 менее 1:20 и не должна характеризоваться наличием внесердечных заболеваний. Кроме того, исключаются собаки с сопутствующим врожденным пороком сердца или признаками первичного порока митрального клапана. На исходном уровне (время включения в исследование) для целей скрининга используют титр антител, общий анализ крови и биохимический анализ крови. Собакам делают 3-минутную электрокардиограмму (ЭКГ) и полную эхокардиограмму (ЕЧНО), а владельцы заполняют ранее утвержденный опросник качества жизни. ЭКГ оценивают на предмет продолжительности интервалов и наличия аритмий. ЕЧНО включает в себя исследования в 2D, M-режиме и доплеровском режиме (включая в себя тканевый

доплер). Рентгенограммы грудной клетки используют для определения стадии заболевания (у собак застойная сердечная недостаточность в анамнезе клинически компенсируется).

Собак, отвечающих требованиям для включения в исследование, случайным образом распределяют в группу плацебо (инъекция в сердце с помощью физиологического раствора) или группа генной терапии (инъекция в сердце с помощью AAV2/6-ARC-s100a1). Стандартное лечение DCM и застойной сердечной недостаточности продолжается на протяжении всего исследования у всех собак (пимобendan, ингибитор ангиотензина и терапия диуретиками). Физиологический раствор вместо пустого капсула используют в качестве фиктивной терапии, чтобы контрольные собаки могли подвергнуться доставке генов, если группа лечения демонстрирует значительное улучшение по сравнению с группой плацебо. Через 2, 4, 6, 9 и 12 месяцев после терапии повторяются ЭКГ, ЭХО, опросник качества жизни и лабораторные анализы. Статистический анализ проводят каждые два месяца.

На фиг. 2 и 3 показаны данные диастолы (расслабления) и систолы (сокращения), соответственно, у собаки, получавшей лечение от мышечной дистрофии. На каждой из фигур можно увидеть контуры эндокарда и эпикарда. Данные указывают на стабильную или слегка улучшенную функцию после лечения в течение нескольких недель, как показано в таблице 1. В таблице 1 ниже показана масса левого желудочка (LVM [г]), конечный диастолический объем (EDV [мл]), конечный систолический объем (ESV [мл]), ударный объем (SV [мл]), фракция выброса (EF [%]) и сердечный выброс (CO [л/мин]) для данных, полученных в момент времени 1 (до лечения) и время 2 (после лечения).

Таблица 1

Время получения данных	LVM [г]	EDV [мл]	ESV [мл]	SV [мл]	EF [%]	CO [л/мин]
Время 2	91,395035	54,22289	24,595001	29,627889	54,640926	3,940509
Время 1	87,251524	57,471229	25,660014	31,811215	55,351548	3,117499

Пример 3: Оценка фенотипов дистрофии после доставки вектора мышам и собакам

Основанную на AAV генную доставку в сердце самокомплементарного вектора S100A1/ARC оценивали на мышцах и собаках с мышечной дистрофией Дюшенна (дефицит дистрофина). Ранее серотипы AAV8 (включая в себя несколько его вариантов), AAV9 и

AAVrh.10 сравнивали по их способности инфицировать сердца собак, и было обнаружено, что AAVrh.10 является наиболее эффективным. По этой причине AAVrh.10 использовали для всех экспериментов, описанных в этом примере.

Мышам Mdx (с дефицитом дистрофина) на фоне DBA/2J («D2.mdx») в возрасте 4 недель вводили рекомбинантный вектор AAVrh.10-S100A1/ARC (далее именуемый «терапевтический AAV») и умерщвляли 24 недели спустя. Мыши D2.mdx воспроизводят некоторые характеристики миопатии мышечной дистрофии Дюшенна у человека, такие как уменьшение мышечной массы нижних задних конечностей, атрофированные миофибриллы, усиление фиброза и воспаления и мышечная слабость. В течение этого 24-недельного периода у мышей, которым вводили терапевтический AAV, лучше сохранялись фракции выброса, развитие деформации и сердечный выброс по сравнению с мышами, которым вводили имитацию инъекции (см. фиг.4), как измерено с помощью МРТ сердца. Анализ белка (вестерн-блоттинг) подтвердил, что содержания как S100A1, так и ARC были повышены в обработанных тканях по сравнению с контролями (которым вводили имитацию инъекции) (см. фиг. 5). Кроме того, гистология сердца показала, что обработанные сердца демонстрировали гораздо меньшую патологию по сравнению с контрольными сердцами (см. фиг. 6).

Двум собакам с дефицитом дистрофина (GRMD) вводили терапевтический вектор во время первого снижения фракции выброса сердца - симптом, указывающий на начало кардиомиопатии. Более ранние результаты естественного изучения истории субъектов-собак показали, что, как только фракции выброса начинают падать, они продолжают постепенно падать в течение следующего года. Собаки, как правило, не живут дольше 8-12 месяцев после того, как фракция выброса начинает устойчиво снижаться.

Как показано на фиг. 7 и 8, оба субъекта показали улучшение фракции выброса и других параметров сердца через несколько месяцев после лечения с помощью AAVrh.10-S100A1/ARC, что было измерено с помощью МРТ сердца и подтверждено измерениями эхокардиографии. Спустя почти 12 месяцев после лечения у первого субъекта наблюдалась устойчивая фракция выброса в пределах нормы. Аналогичным образом, почти через 7 месяцев после лечения у второго субъекта наблюдалась стабильная нормальная фракция выброса.

Не только улучшилась сердечная функция, но и постоянно улучшалась способность собак к физической нагрузке, что качественно оценивали путем видеосъемки субъектов во время упражнений. В соответствии с этим улучшением способности переносить физическую нагрузку, измерения МРТ конечностей субъектов продемонстрировали, что масса скелетных мышц либо увеличилась, либо не изменилась после лечения с помощью AAV (фиг. 9А-9С).

Кроме того, содержания циркулирующей креатинкиназы (СК) в скелетных мышцах были снижены после лечения (фиг. 10), что указывает на снижение продолжающегося повреждения мышц.

Пример 4: Лечение дополнительных субъектов-собак

На сегодняшний день два субъекта доберман-пинчера получали лечение с помощью AAVrh.10-S100A1/ARC, причем обе собаки страдали сердечной недостаточностью во время лечения. Первая собака была при смерти во время лечения, показывая фракцию выброса сердца всего 10%. В течение 24 часов после лечения фракция выброса улучшилась до 25% (данные не показаны). При первом контрольном посещении собаки через 4 месяца после лечения фракция выброса оставалась стабильной на уровне 26%. Этот субъект все еще оставался живым через 5 месяцев после лечения.

У второго доберман-пинчера, получавшего лечение, фракция выброса до лечения составляла 32% - фракция, которая является низкой, но не в непосредственной опасности смерти. Фракция выброса собаки улучшилась до 49% в течение 24 часов после лечения (данные не показаны), что находится в пределах нормы. Сообщается, что вторая собака чувствует себя хорошо через 5 недель после лечения. У этого субъекта первый контрольный визит был через 4 месяца после лечения.

На основании этих предварительных результатов, лечение с помощью AAVrh.10-S100A1/ARC способно восстановить сердечную функцию у собак до нормального уровня.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя в настоящем документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалисты в настоящей области техники легко смогут представить себе множество других средств и/или структур для выполнения функции и/или получения результатов и/или одного или нескольких описанных в настоящем документе преимуществ, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема описанных в настоящем документе вариантов осуществления настоящего изобретения. В более общем плане, специалисты в настоящей области техники легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящем документе, предназначены для примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используются идеи настоящего изобретения. Специалисты в настоящей области

узнают или смогут установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем документе. Следовательно, следует понимать, что вышеизложенные варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления изобретения могут быть реализованы иначе, чем конкретно описано и заявлено. Множественные варианты осуществления настоящего изобретения направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанные в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, статей, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, статьи, материалы, наборы и/или способы не противоречат друг другу, включена в изобретательский объем настоящего раскрытия.

Все определения, как они определены и используются в настоящем документе, должны пониматься как имеющие преимущественную силу по отношению к определениям в словарях, определениям в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычным значениям определенных терминов.

Все ссылки, патенты и заявки на патенты, раскрытые в настоящем документе, включены посредством ссылки в отношении предмета, для которого каждый из документов цитируется, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Неопределенные артикли, используемые в настоящем документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как «по меньшей мере один».

Фраза «и/или», используемая в настоящем документе в описании и формуле изобретения, должна пониматься как означающая «один или оба» из элементов, соединенных таким образом, то есть элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других случаях присутствуют порознь. Множественные элементы, перечисленные с помощью «и/или», должны толковаться одинаково, то есть «один или несколько» элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать и другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных условием «и/или», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на «А и/или В» при использовании в сочетании с неограничивающей фразой, такой как «содержащий», может относиться, согласно одному варианту осуществления, только к А (необязательно включая в себя элементы, отличные от В); согласно другому варианту осуществления только к В (необязательно включая в себя

элементы, отличные от А); согласно еще одному варианту осуществления как к А, так и к В (необязательно включая в себя другие элементы); и т.п.

Используемый в настоящем документе в описании и формуле изобретения «или» следует понимать как имеющий то же значение, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в перечне «или» или «и/или» должны интерпретироваться как включающие, т.е. включение по меньшей мере одного, но также и более одного, из числа или перечня элементов, и, необязательно, дополнительных элементов, не внесенных в перечень. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как «только один из» или «точно один из» или, при использовании в формуле изобретения, «состоящий из» будут относиться к включению ровно одного элемента из числа или перечня элементов. Как правило, термин «или», используемый в настоящем документе, должен интерпретироваться только как указывающий на исключительные альтернативы (то есть «один или другой, но не оба»), когда ему предшествуют условия исключительности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «ровно один из». «Состоящий по существу из» при использовании в формуле изобретения имеет обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемую в настоящем документе в описании и формуле изобретения фразу «по меньшей мере один» в отношении перечня из одного или нескольких элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в перечне элементов, но не обязательно включая в себя по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также допускает, что необязательно могут присутствовать элементы, отличные от элементов, специально идентифицированных в перечне элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно идентифицированными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере один из А и В» (или, эквивалентно, «по крайней мере один из А или В»), или, что эквивалентно, «по меньшей мере один из А и/или В») может относиться, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере к одному А, необязательно включая в себя более одного А, без присутствия В (и необязательно включая в себя элементы, отличные от В); согласно другому варианту осуществления по меньшей мере к одному В, необязательно включая в себя более одного В, без присутствия А (и необязательно включая в себя элементы, отличные от А); согласно еще одному варианту осуществления по меньшей мере к одному А,

необязательно включая в себя более одного А, и по меньшей мере одному В, необязательно включая в себя более одного В (и необязательно включая в себя другие элементы); и т.п.

Также следует понимать, что, если явно не указано иное, в любых заявленных в настоящем документе способах, которые предусматривают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором перечислены стадии или действия способа.

В формуле изобретения, а также в описании выше, все переходные фразы, такие как «содержащий», «включая в себя», «несущий», «характеризующийся», «включающий в себя», «состоящий из» и т.п., следует понимать как неограничивающие, то есть означающие включение, но не ограничиваясь этим. Только переходные фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из» должны быть ограничивающими или полуограничивающими переходными фразами, соответственно, как указано в Руководстве Патентного ведомства США по процедурам патентной экспертизы, раздел 2111.03. Следует принять во внимание, что варианты осуществления, описанные в настоящем документе с использованием неограничивающей переходной фразы (например, «содержащий»), также рассматриваются в альтернативных вариантах осуществления как «состоящие из» и «состоящие по существу из» признака, описанного с помощью неограничивающей переходной фразы. Например, если в настоящем раскрытии описана «композиция, содержащая А и В», согласно настоящему раскрытию также предусмотрены альтернативные варианты осуществления «композиция, состоящая из А и В» и «композиция, состоящая по существу из А и В».

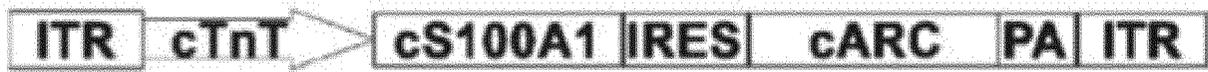
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновокислотный вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) для доставки двух или более трансгенов в сердце субъекта, где указанный вектор содержит от 5' к 3' по порядку: последовательность первого инвертированного концевого повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), два или более трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или более трансгенами, сигнал полиаденилирования и последовательность второго инвертированного концевого повтора (ITR) AAV, где два или более трансгена содержат белок семейства S100 и ингибитор апоптоза.
2. Вектор rAAV по п. 1, в котором белок семейства S100 представляет собой сердечный кальцийсвязывающий белок S100 A1 (cS100A1) или его вариант.
3. Вектор rAAV по п. 1 или 2, в котором ингибитор апоптоза представляет собой сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутирования каспаз (cARC) или его вариант.
4. Вектор rAAV по п. 2 или 3, в котором участок внутренней посадки рибосомы (IRES) присутствует между трансгеном cS100A1 и трансгеном cARC.
5. Вектор rAAV по любому из пп. 1-4, в котором трансгены являются видоспецифическими.
6. Вектор rAAV по любому из пп. 1-5, в котором промотор представляет собой ограниченный для сердца промотор.
7. Вектор rAAV по п. 6, в котором ограниченный для сердца промотор выбран из группы, состоящей из следующего: ген тяжелой цепи α -миозина, ген тяжелой цепи β -миозина, ген 2v легкой цепи миозина, ген 2a легкой цепи миозина, ген CARP, ген сердечного α -актина, ген сердечного мускаринового ацетилхолина m2, ANF, сердечный тропонин C, сердечный тропонин I, сердечный тропонин T (cTnT), ген сердечной Ca-АТФазы саркоплазматического ретикулума, скелетный α -актин; или искусственный сердечный промотор, происходящий из гена MLC-2v.

8. Вектор гAAV по п. 6 или 7, в котором ограниченный для сердца промотор представляет собой сTnT.
9. Частица гAAV, содержащая вектор гAAV по любому из пп. 1-8, инкапсидированный в капсид AAV.
10. Частица гAAV по п. 9, в которой капсид AAV содержит капсидные белки, происходящие из серотипов AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV8 или AAV9.
11. Частица гAAV по п. 9, в которой капсид AAV содержит капсидные белки, происходящие из серотипа AAVrh.10.
12. Композиция, содержащая частицу гAAV по любому из пп. 9-11.
13. Способ лечения субъекта, страдающего от заболевания сердца, предусматривающий введение субъекту композиции по п. 12 или частицы гAAV по любому из пп. 9-11.
14. Способ по п. 13, при котором заболевание сердца вызывает сердечную недостаточность у субъекта.
15. Способ по п. 13 или 14, при котором заболевание сердца представляет собой кардиомиопатию.
16. Способ по любому из пп. 13-15, при котором заболевание сердца представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию или дилатационную кардиомиопатию.
17. Способ по п. 13 или 14, при котором заболевание сердца представляет собой острую ишемию.
18. Способ по любому из пп. 13-17, при котором композицию вводят путем инъекции в сердце субъекта.

19. Способ по любому из пп. 13-18, при котором введение композиции приводит к экспрессии двух или более трансгенов в сердце субъекта.
20. Способ по любому из пп. 13-19, при котором субъект представляет собой млекопитающее.
21. Способ по п. 20, при котором млекопитающее представляет собой человека.
22. Способ по п. 20, при котором млекопитающее является животным-компаньоном.
23. Способ по п. 22, при котором животное-компаньон представляет собой собаку или кошку.
24. Вектор гAAV по любому из пп. 1-8, в котором трансген, содержащий белок семейства S100, расположен 5' по отношению к трансгену, содержащему ингибитор апоптоза.
25. Вектор гAAV по любому из пп. 1-8, в котором трансген, содержащий ингибитор апоптоза, расположен 5' по отношению к трансгену, содержащему белок семейства S100.

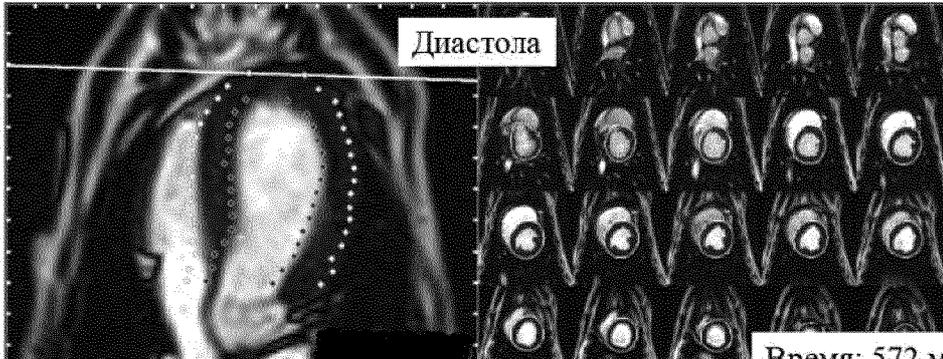
ФИГУРА 1



WnM3 Кэлвина

Диастола

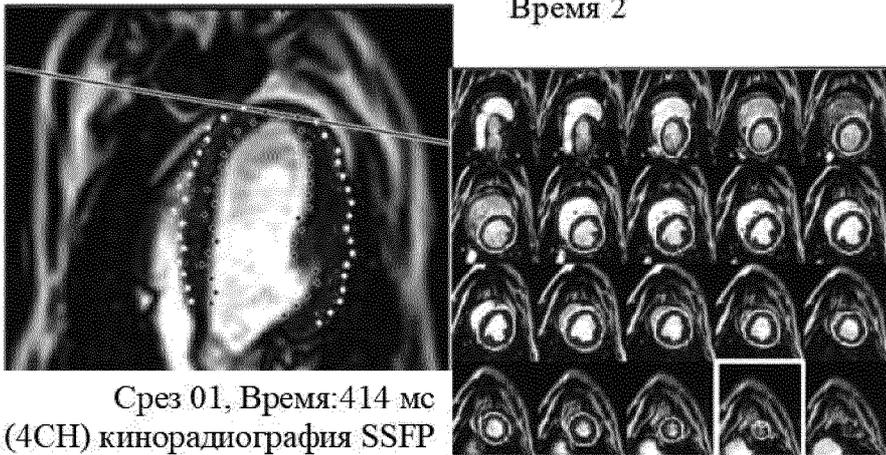
Время 1



Срез 01, Время: 572 мс
HLA (4CH) кинорадиография SSFP
Исходный/первичный/GDC
Кинорадиография, 4CH

Время: 572 мс
Короткая ось MS/MP SSFP
Исходный/первичный/GDC
Кинорадиография, короткая ось

Время 2



Срез 01, Время: 414 мс
HLA (4CH) кинорадиография SSFP
Исходный/первичный/GDC
Кинорадиография, 4CH

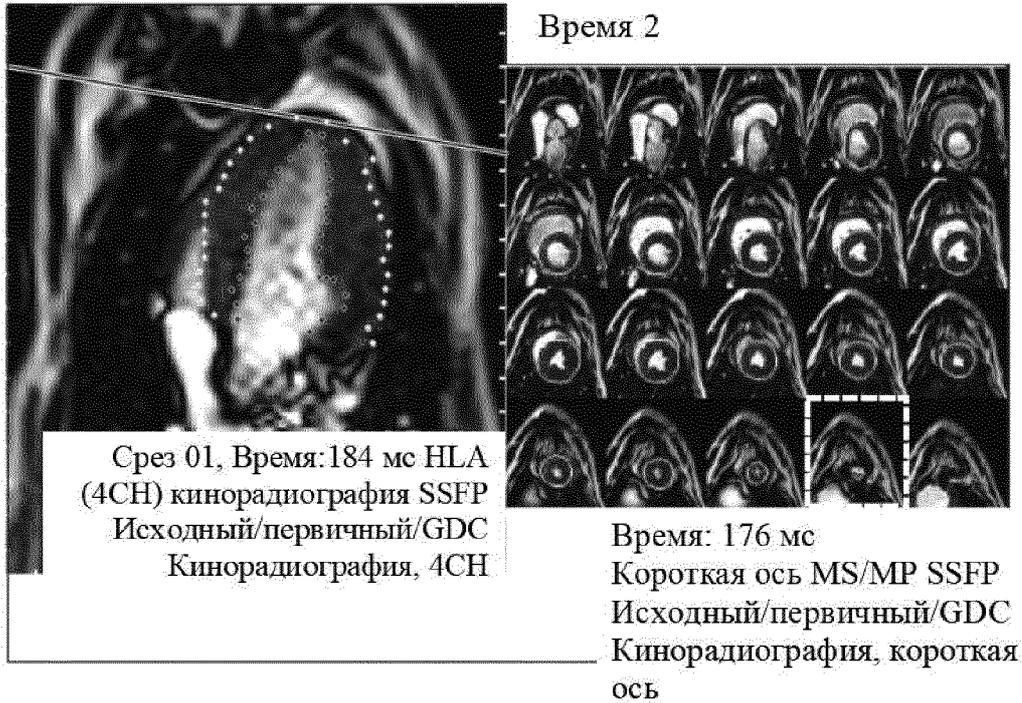
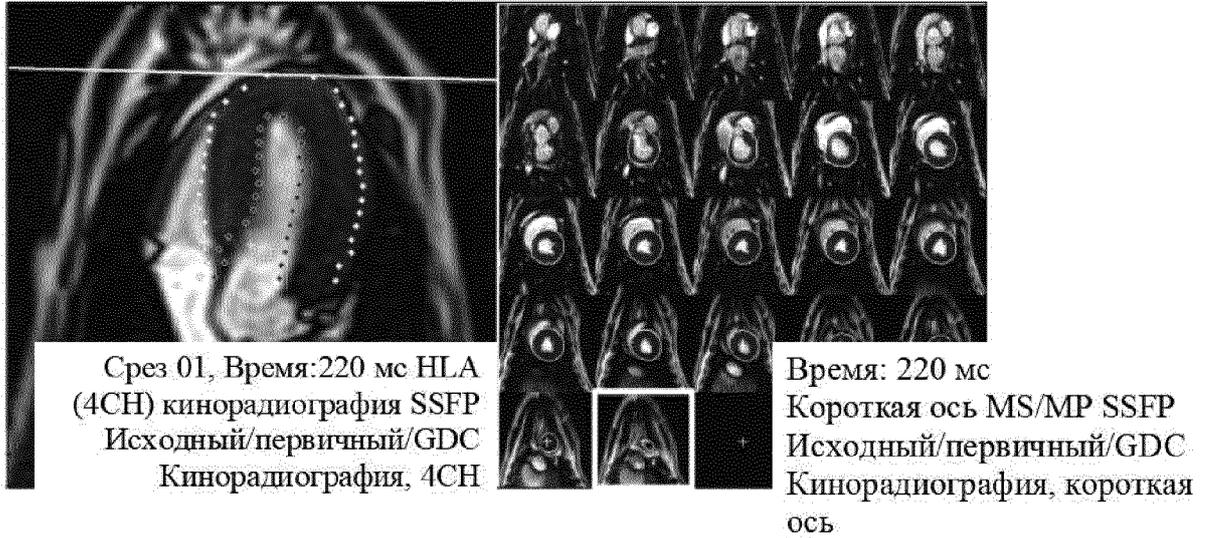
Время: 418 мс
Короткая ось MS/MP SSFP
Исходный/первичный/GDC
Кинорадиография, короткая ось

ФИГУРА 2

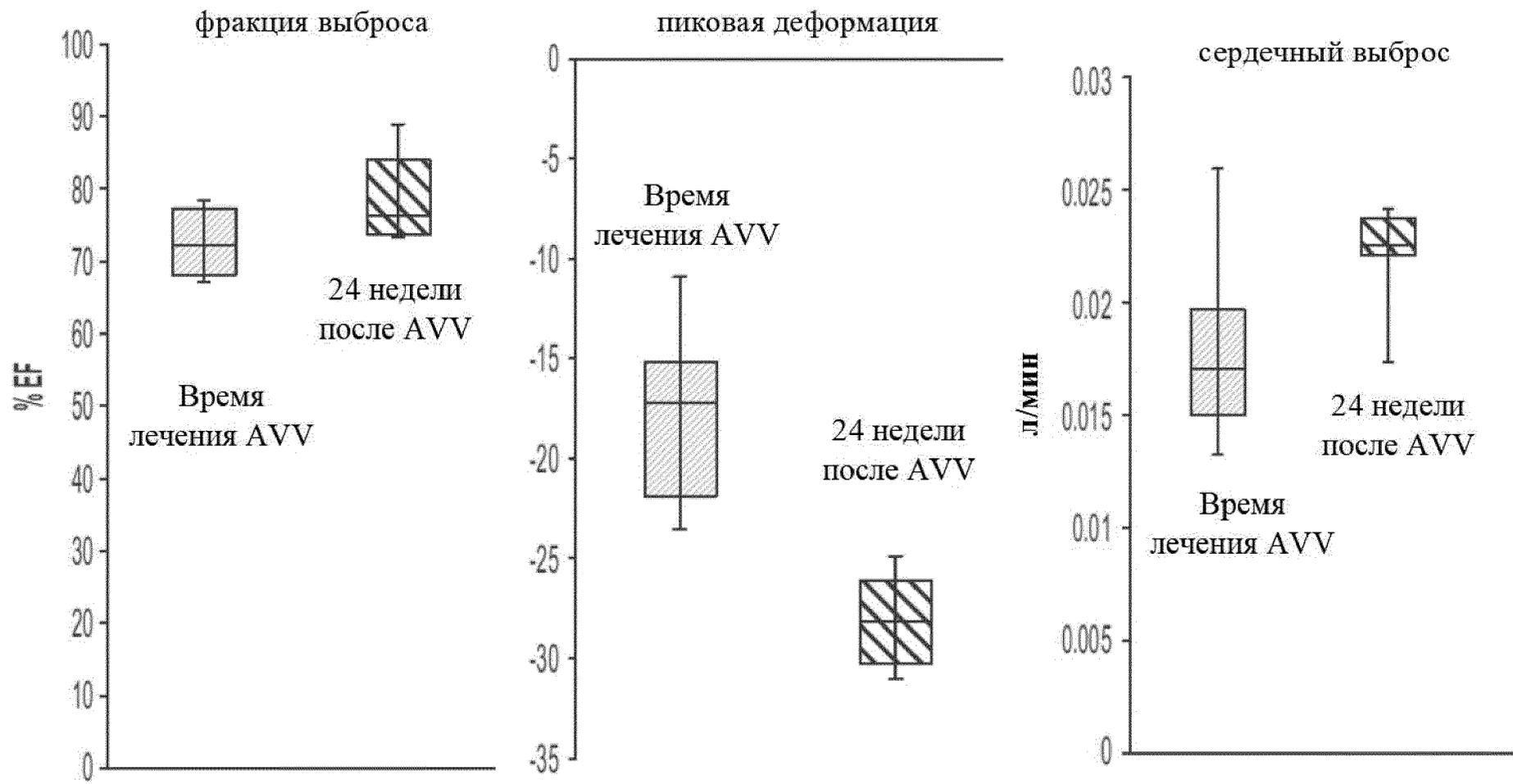
WnM3 Кэлвина

Систола

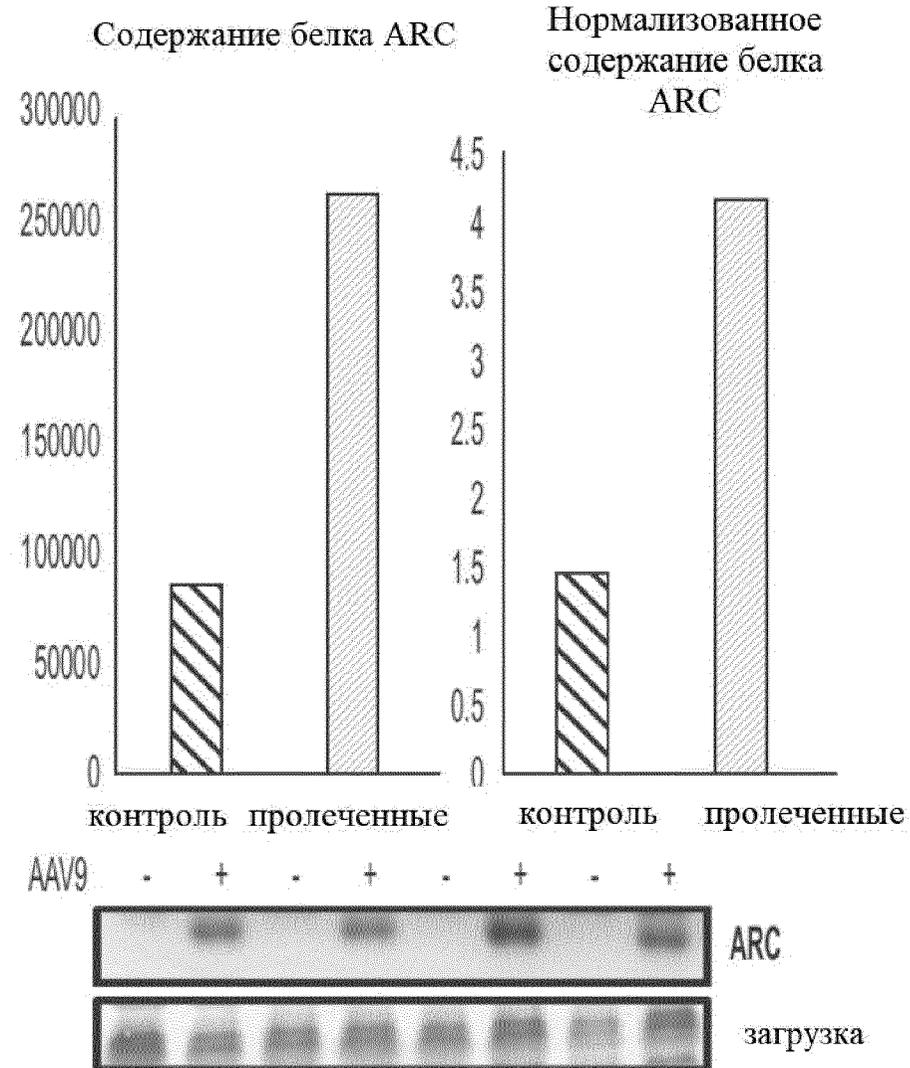
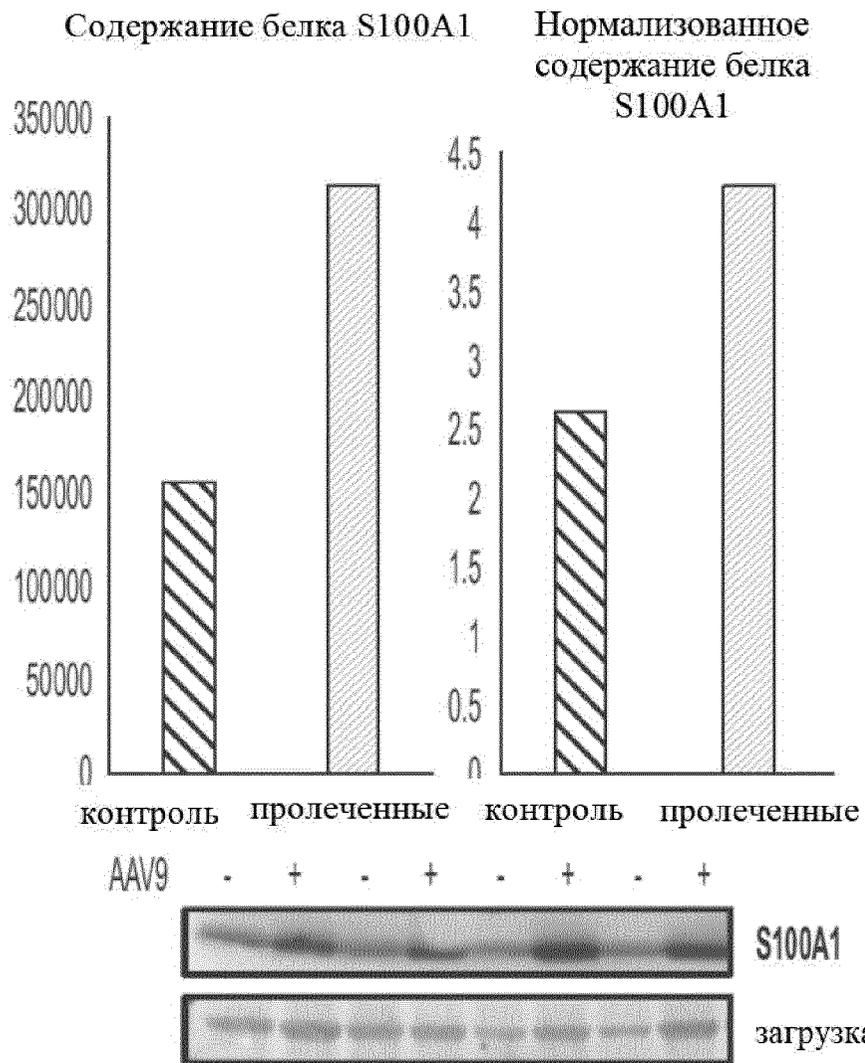
Время 1



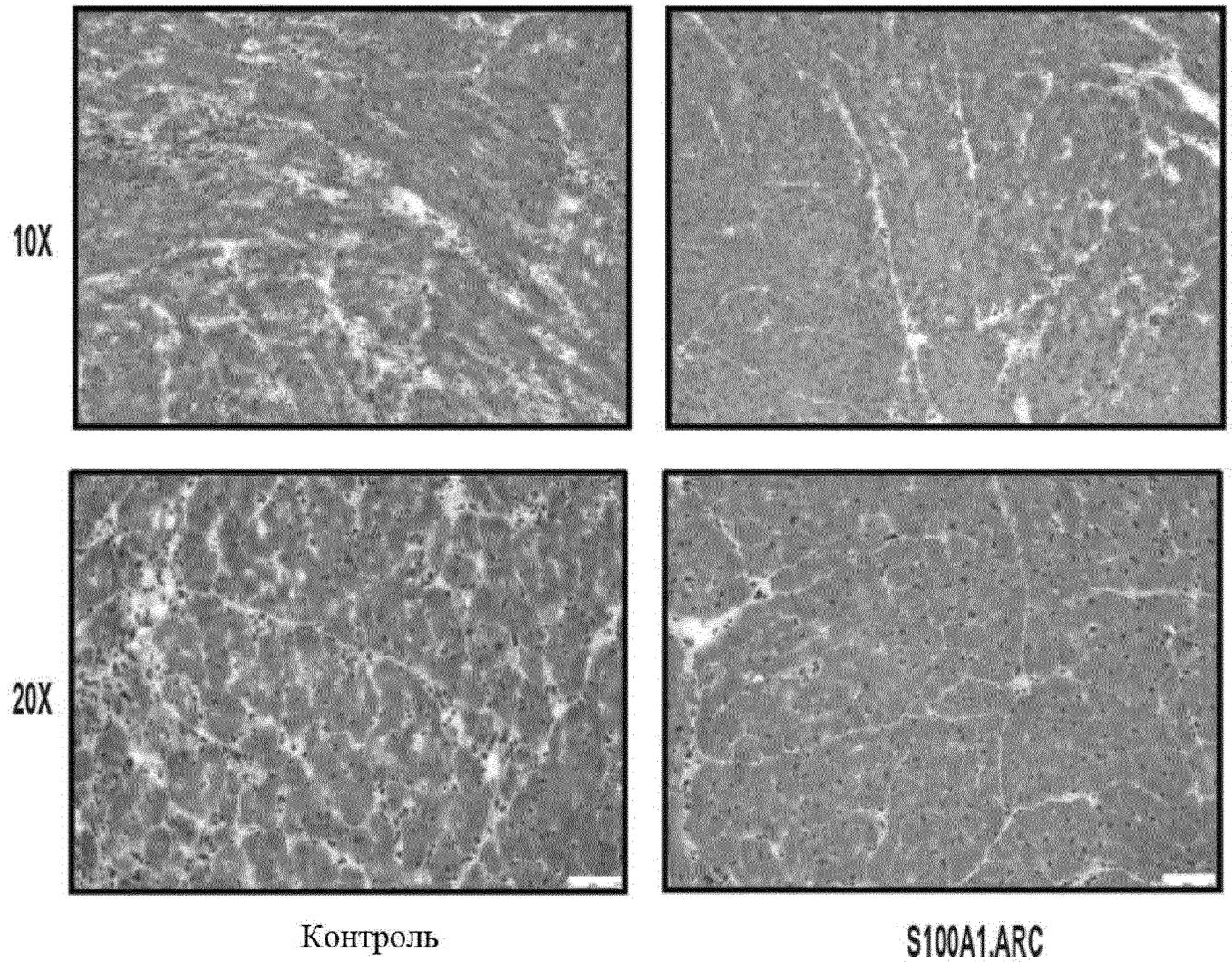
ФИГУРА 3



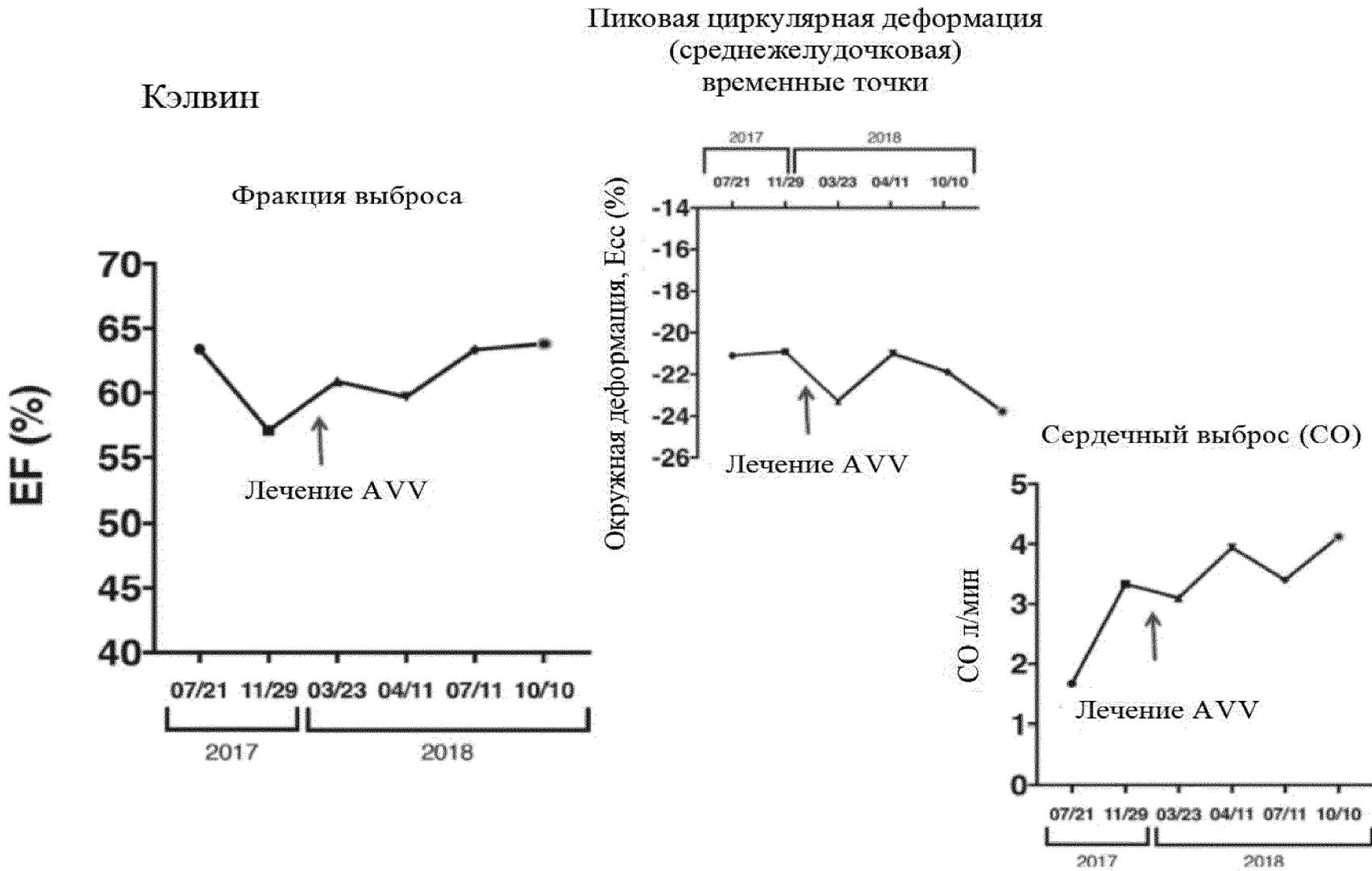
ФИГУРА 4



ФИГУРА 5

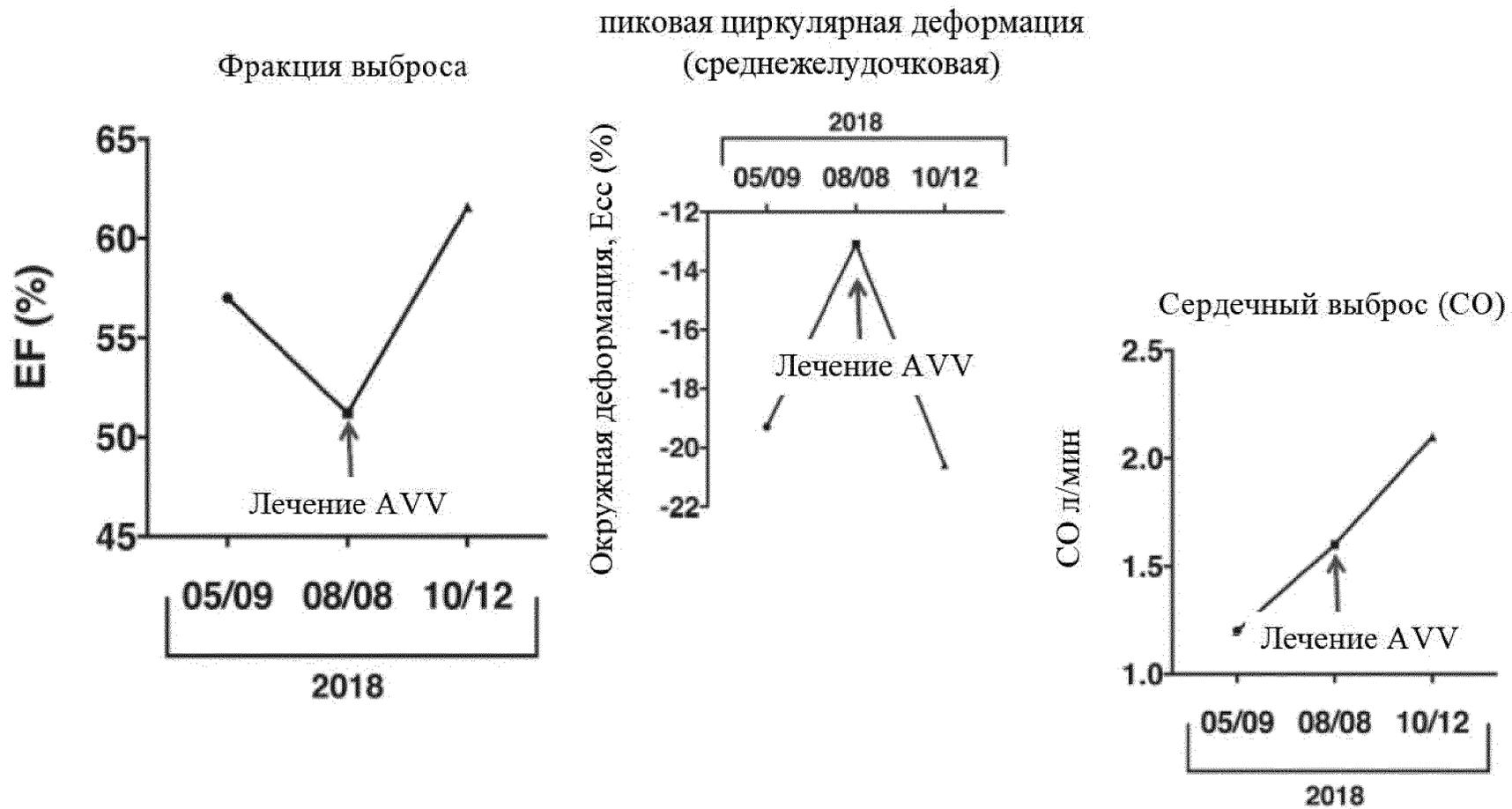


ФИГУРА 6



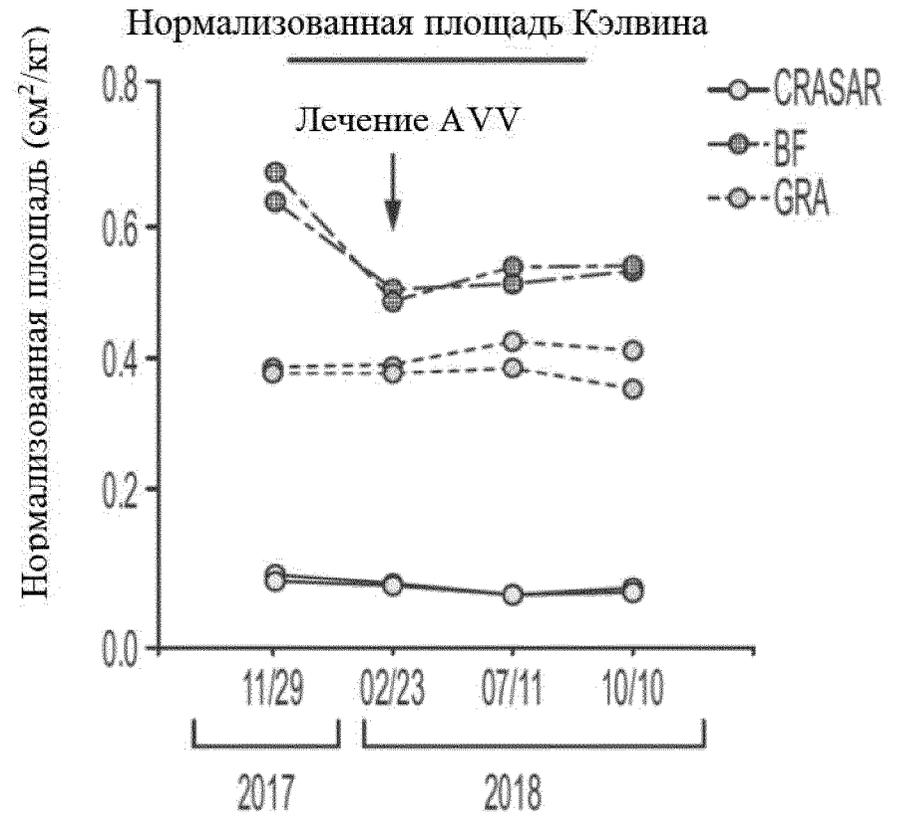
ФИГУРА 7

Себастьян



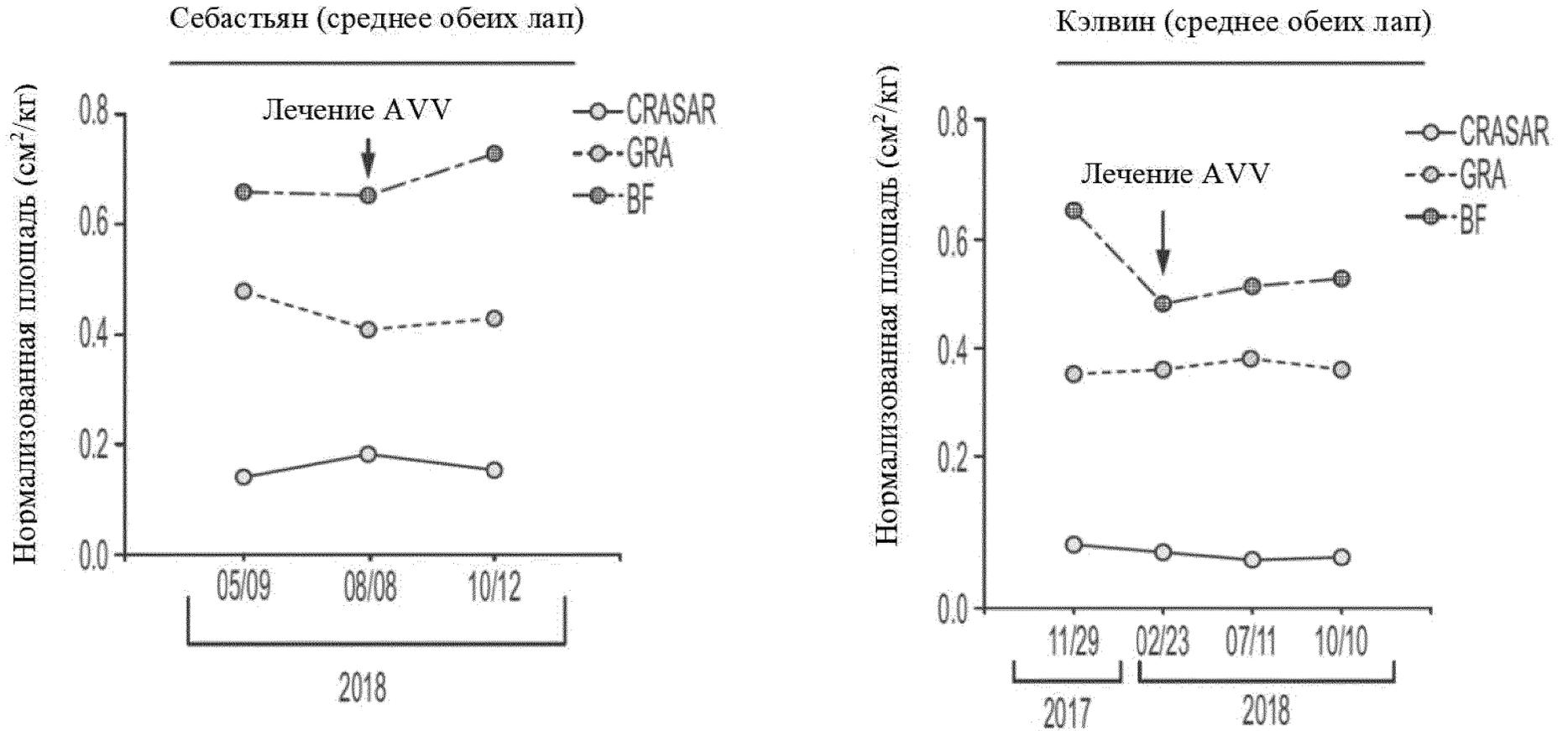
ФИГУРА 8

Площадь обеих лап



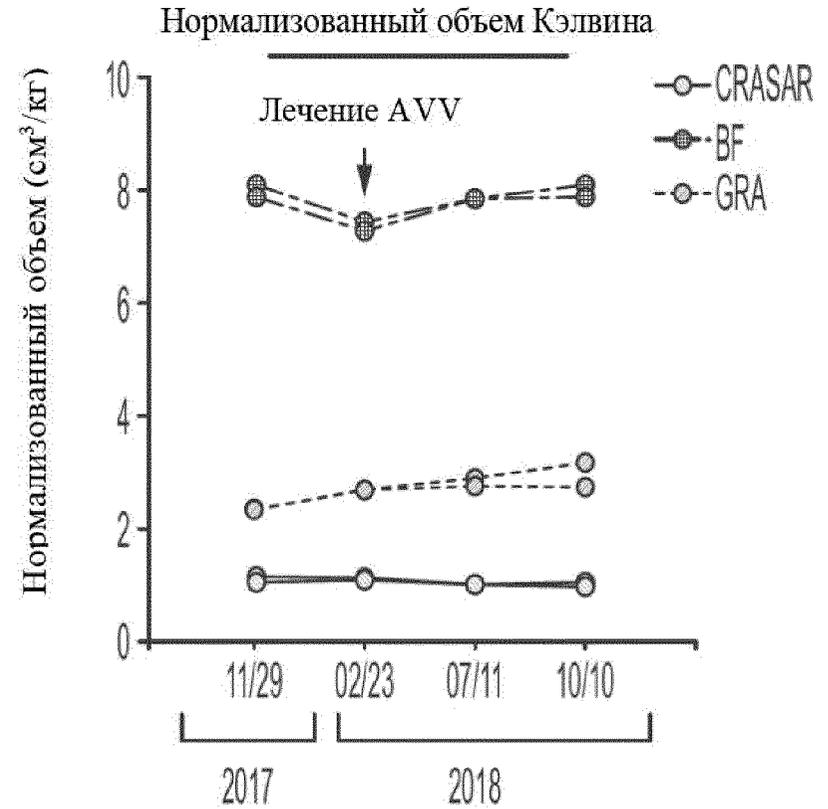
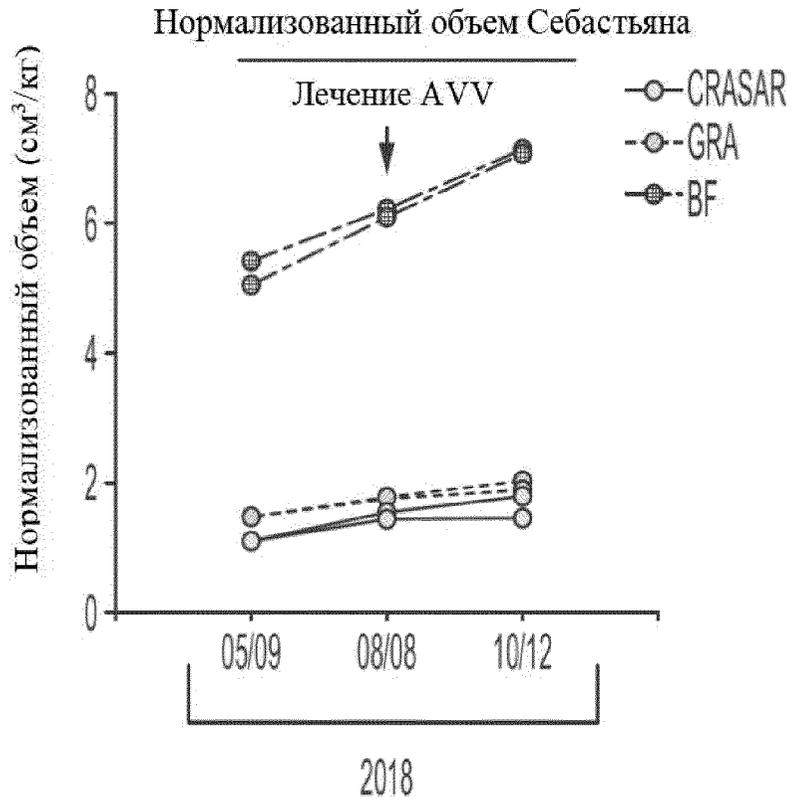
ФИГУРА 9А

Максимальная площадь поперечного сечения (CSA)

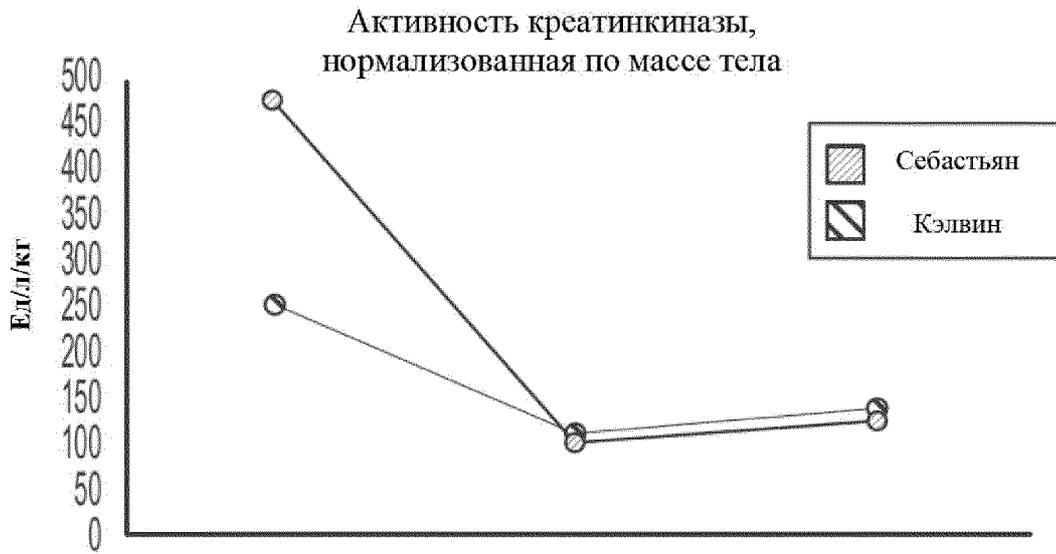
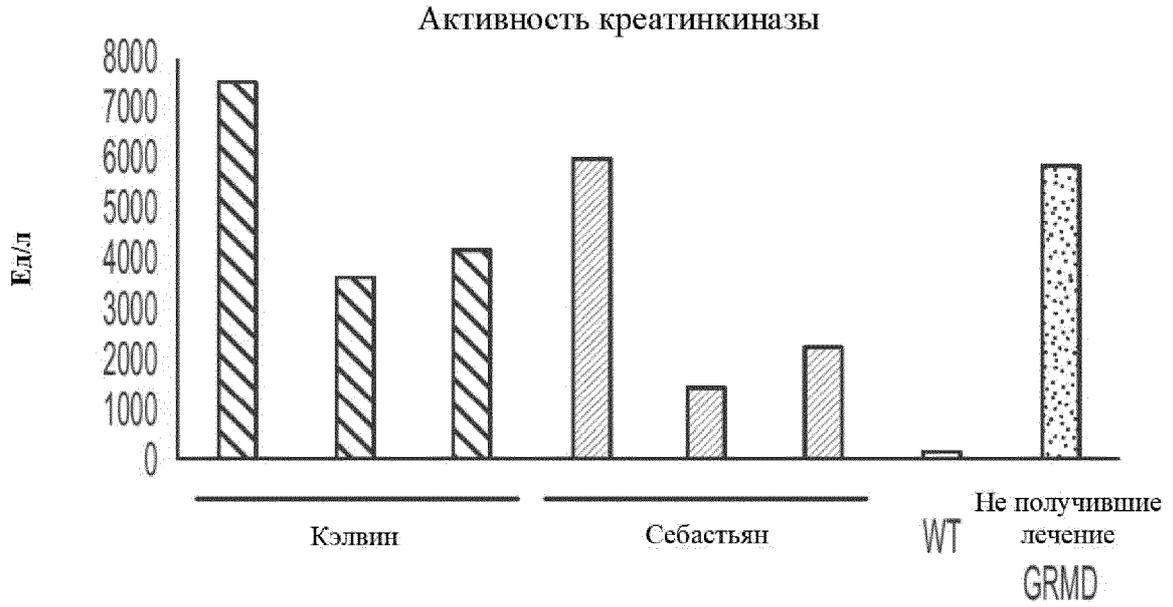


ФИГУРА 9В

Объем обеих лап



ФИГУРА 9С



ФИГУРА 10