

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202190155 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.05.04

(51) Int. Cl. *C12N 15/864* (2006.01)  
*C12N 9/64* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.06.28

---

(54) ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ  
ВИРУСОВ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТАЗОВО-ПЛЕЧЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ  
ДИСТРОФИИ ТИПА 2А

---

(31) 62/691,934; 62/865,081

(72) Изобретатель:

(32) 2018.06.29; 2019.06.21

Саенк Зариф (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2019/039893

Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2020/006458 2020.01.02

(71) Заявитель:

РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ ЭТ  
НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕН'С  
ХОСПИТАЛ (US)

---

(57) Изобретение относится к продуктам и способам для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2А. В этих способах рекомбинантные аденоассоциированные вирусы доставляют ДНК, кодирующую белок, имеющий активность кальпаина-3.

A1

202190155

202190155

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566511EA/032

### **ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТАЗОВО-ПЛЕЧЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ТИПА 2А**

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/691934, поданной 29 июня 2018 года, и предварительной заявке на патент США № 62/865081, поданной 21 июня 2019 года, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### **Область техники**

[0002] В данном документе предусмотрены продукты и способы для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2А. В данных способах рекомбинантные аденоассоциированные вирусы доставляют ДНК, кодирующую белок, обладающий активностью кальпаина-3 (CAPN3).

#### **Включение перечня последовательностей посредством ссылки**

[0003] Настоящая заявка содержит в качестве отдельной части настоящего раскрытия перечень последовательностей в машиночитаемой форме (название файла: 52684P2\_SeqListing.txt; 23755 байтов - текстовый файл в формате ASCII, созданный 26 июня 2019 года), который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### **Предпосылки изобретения**

[0004] Формы мышечной дистрофии (MD) представляют собой группу генетических заболеваний. Данная группа характеризуется прогрессирующей слабостью и дегенерацией скелетных мышц, контролирующих движения. Некоторые формы MD развиваются в младенчестве или детстве, тогда как другие могут не проявляться до достижения зрелого или более позднего возраста. Данные нарушения различаются по распределению и степени мышечной слабости (некоторые формы MD также поражают сердечную мышцу), возрасту начала проявления заболевания, скорости прогрессирования и типу наследования.

[0005] Одна группа MD представляет собой группу тазово-плечевых MD (LGMD). LGMD являются редкими состояниями и проявляются по-разному у разных людей в том, что касается возраста начала проявления заболевания, областей мышечной слабости, вовлечения сердца и дыхательной системы, скорости прогрессирования и степени тяжести. LGMD могут начинаться в детском возрасте, подростковом возрасте, в раннем зрелом возрасте или даже позже. Представители обоих полов поражаются в равной степени. LGMD обуславливают слабость мышц плечевого и тазового пояса, при этом близлежащие мышцы бедер и плеч также иногда со временем слабеют. Слабость мышц ног часто появляется раньше слабости мышц рук. Лицевые мышцы обычно не поражаются. С прогрессированием состояния у людей могут появляться проблемы с ходьбой, и со временем для них может стать необходимым использование инвалидной коляски. Вовлечение мышц плечевого пояса и рук может приводить к трудностям при поднимании рук над головой и поднятии

предметов. При некоторых типах LGMD могут вовлекаться сердечная и дыхательные мышцы.

[0006] Существует по меньшей мере девятнадцать форм LGMD, и эти формы классифицируют по генетическим дефектам, ассоциированным с ними.

Тип Тип наследования Ген или хромосома

LGMD1A Аутосомно-доминантный Ген миотилина

LGMD1B Аутосомно-доминантный Ген ламина A/C

LGMD1C Аутосомно-доминантный Ген кавеолина

LGMD1D Аутосомно-доминантный Хромосома 7

LGMD1E Аутосомно-доминантный Ген десмина

LGMD1F Аутосомно-доминантный Хромосома 7

LGMD1G Аутосомно-доминантный Хромосома 4

LGMD2A Аутосомно-рецессивный Ген кальпаина-3

LGMD2B Аутосомно-рецессивный Ген дисферлина

LGMD2C Аутосомно-рецессивный Ген гамма-саркогликана

LGMD2D Аутосомно-рецессивный Ген альфа-саркогликана

LGMD2E Аутосомно-рецессивный Ген бета-саркогликана

LGMD2F Аутосомно-рецессивный Ген дельта-саркогликана

LGMD2G Аутосомно-рецессивный Ген телетонина

LGMD2H Аутосомно-рецессивный TRIM32

LGMD2I Аутосомно-рецессивный Ген FKRP

LGMD2J Аутосомно-рецессивный Ген титина

LGMD2K Аутосомно-рецессивный Ген POMT1

LGMD2L Аутосомно-рецессивный Ген фукутина

[0007] Специализированные тесты для выявления LGMD в настоящее время являются доступными в рамках национальной программы диагностики Национальной группы, отвечающей за внедрение медицинских услуг (NCG).

[0008] Мутации в гене кальпаина-3 (*CAPN3*) приводят к развитию LGMD2A - одной из наиболее распространенных форм тазово-плечевой мышечной дистрофии во всем мире. В настоящее время лечения этого наследственного заболевания не существует. Предыдущие исследования продемонстрировали возможную перспективу переноса гена *CAPN3* для коррекции патологических признаков у мышей с дефицитом *CAPN3*. Однако экспрессия *CAPN3*, управляемая промотором гена десмина, приводила к кардиотоксичности [Bartoli *et al.*, *Mol. Ther.*, 13: 250-259 (2006)]. В ходе проспективных исследований изучали экспрессию данного гена в скелетных мышцах [Roudaut *et al.*, *Circulation*, 128: 1094-1104 (2013)].

[0009] Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой парвовирус, дефектный по репликации, однонитевой ДНК-геном которого имеет длину приблизительно 4,7 т. п. о., включая два инвертированных концевых повтора (ITR) длиной 145 нуклеотидов. Существует несколько серотипов AAV. Известны нуклеотидные последовательности

геномов серотипов AAV. Например, полный геном AAV-1 представлен под номером доступа в GenBank NC\_002077; полный геном AAV-2 представлен под номером доступа в GenBank NC\_001401 и в Srivastava et al., *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983); полный геном AAV-3 представлен под номером доступа в GenBank NC\_1829; полный геном AAV-4 представлен под номером доступа в GenBank NC\_001829; геном AAV-5 представлен под номером доступа в GenBank AF085716; полный геном AAV-6 представлен под номером доступа в GenBank NC\_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 представлены под номерами доступа в GenBank AX753246 и AX753249 соответственно; геном AAV-9 представлен в Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 представлен в *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 представлен в *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). Последовательность генома AAV-rh.74 представлена в патенте США № 9434928, включенном в данный документ посредством ссылки. Цис-действующие последовательности, управляющие репликацией вирусной ДНК (rep), капсидированием/упаковкой и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR AAV. Три промотора AAV (называемые p5, p19 и p40 по их относительным местоположениям на карте) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены гер и сар. Два промотора гер (p5 и p19) в сочетании с дифференциальным сплайсингом одного интрона AAV (в нуклеотидах 2107 и 2227) приводят к продуцированию четырех белков гер (гер 78, гер 68, гер 52 и гер 40) из гена гер. Белки гер обладают несколькими ферментативными свойствами, которые в конечном счете отвечают за репликацию вирусного генома. Ген сар экспрессируется под управлением промотора p40, и он кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты начала трансляции отвечают за продуцирование трех родственных капсидных белков. Один консенсусный сайт полиаденилирования расположен в положении 95 на карте генома AAV. Обзор жизненного цикла и генетических особенностей AAV представлен в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

[0010] AAV обладает уникальными признаками, которые делают его привлекательным в качестве вектора для доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование клеток в культуре с помощью AAV является нецитопатическим, а естественное инфицирование людей и других животных является скрытым и бессимптомным. Более того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что обеспечивает возможность нацеливания на многие различные ткани *in vivo*. Более того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и неделящиеся клетки и может персистировать по сути на протяжении всей жизни этих клеток в качестве транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Провирусный геном AAV вставляют в виде клонированной ДНК в плазмиды, что делает осуществимым конструирование рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV и капсидированием генома, содержатся в ITR генома AAV, внутренняя часть генома, составляющая примерно 4,3 т. п. о. (кодирующая белки репликации и структурные

капсидные белки гер-сар), может быть частично или полностью заменена чужеродной ДНК. Для получения векторов на основе AAV белки гер и сар могут предоставляться в транс-положении. Еще одним важным признаком AAV является то, что он является чрезвычайно стабильным и стойким вирусом. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56° до 65°C в течение нескольких часов), что делает холодильное хранение AAV менее критически важным. AAV можно даже лиофилизировать. Наконец, клетки, инфицированные AAV, не являются устойчивыми к суперинфекции.

[0011] В данной области техники остается необходимость в методах лечения LGMD2A.

#### **Краткое описание изобретения**

[0012] В данном документе предусмотрены способы и продукты для доставки ДНК, кодирующей белок, обладающий активностью кальпаина-3 (CAPN3). Такие способы и продукты можно применять для лечения различных заболеваний, например, LGMD2A.

[0013] Предусмотрены рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV), кодирующие белок, обладающий активностью кальпаина-3 (CAPN3). Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы содержат полинуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, обладающий активностью CAPN3. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, обладающий активностью CAPN3, например, является на по меньшей мере 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или содержит последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0014] Например, предусмотренный rAAV содержит полинуклеотид, который содержит первый инвертированный концевой повтор (ITR) AAV, промотор, нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, обладающий активностью кальпаина-3 (CAPN3), и второй ITR AAV. Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, обладающий активностью CAPN3, например, является на по меньшей мере 90% идентичной SEQ ID NO: 2 или на по меньшей мере 91% идентичной SEQ ID NO: 2, на по меньшей мере 92% идентичной SEQ ID NO: 2, на по меньшей мере 93% идентичной SEQ ID NO: 2, на по меньшей мере 94% идентичной SEQ ID NO: 2, на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO: 2, на по меньшей мере 96% идентичной SEQ ID NO: 2, на по меньшей мере 97% идентичной SEQ ID NO: 2, на по меньшей мере 98% идентичной SEQ ID NO: 2 или на по меньшей мере 99% идентичной SEQ ID NO: 2. rAAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, обладающий активностью CAPN3, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0015] Кроме того, предусмотренный rAAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, обладающий активностью CAPN3, который содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 90% идентичной SEQ ID NO: 7, на по меньшей мере 91% идентичной SEQ ID NO: 7, на по меньшей мере 92% идентичной SEQ ID NO: 7, на по меньшей мере 93% идентичной SEQ ID NO: 7, на по меньшей мере 94% идентичной SEQ ID NO: 7, на по меньшей мере 95%

идентичной SEQ ID NO: 7, на по меньшей мере 96% идентичной SEQ ID NO: 7, на по меньшей мере 97% идентичной SEQ ID NO: 7, на по меньшей мере 98% идентичной SEQ ID NO: 7 или на по меньшей мере 99% идентичной SEQ ID NO: 7. rAAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, обладающий активностью CAPN3, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7.

[0016] Предусмотренные rAAV содержат полинуклеотидную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 90% идентичной SEQ ID NO: 1, на по меньшей мере 91% идентичной SEQ ID NO: 1, на по меньшей мере 92% идентичной SEQ ID NO: 1, на по меньшей мере 93% идентичной SEQ ID NO: 1, на по меньшей мере 94% идентичной SEQ ID NO: 1, на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO: 1, на по меньшей мере 96% идентичной SEQ ID NO: 1, на по меньшей мере 97% идентичной SEQ ID NO: 1, на по меньшей мере 98% идентичной SEQ ID NO: 1 или на по меньшей мере 99% идентичной SEQ ID NO: 1. rAAV содержит полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1.

[0017] В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность находится под транскрипционным контролем промотора, специфичного для мышц. Например, промотор, специфичный для мышц, содержит один или более из элемента гена скелетномышечного актина человека, элемента гена сердечного актина, промотора гена десмина, промотора гена скелетномышечного альфа-актина (ASKA), промотора гена тропонина I (TNNI2), связывающего элемента для миоцит-специфического энхансерного связывающего фактора *mef*, промотора гена мышечной креатинкиназы (MCK), усеченного промотора гена MCK (tMCK), промотора гена тяжелой цепи миозина (MHC), гибридного промотора, представляющего собой энхансер гена тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина/тандем энхансер-промотор гена MCK (MHCK7), промотора C5-12, энхансерного элемента гена креатинкиназы мышцы, элемента гена тропонина C быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемента гена тропонина C медленно сокращающихся волокон сердечной мышцы, элемента гена тропонина I медленно сокращающихся волокон, элемента, отвечающего на ядерный фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) (HRE), стероид-индуцируемого элемента и глюкокортикоид-отвечающего элемента (*gre*). В одном варианте осуществления промотор, специфичный для мышц, представляет собой промотор tMCK, который содержит последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0018] Например, rAAV содержит полинуклеотид, который в одном варианте осуществления содержит первый инвертированный концевой повтор AAV (ITR), промотор tMCK, нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, обладающий активностью кальпаина-3, и второй инвертированный концевой повтор AAV (ITR). ITR AAV (например, первый и/или второй ITR AAV) представляет собой, например, инвертированный концевой повтор AAV2. Капсидные белки rAAV включают в себя, например, капсидный белок AAV-rh.74 или капсидный белок AAV9.

[0019] Предусмотренный rAAV содержит один или более из капсидных белков AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-rh.74 и AAV-rh.10.

[0020] В другом варианте осуществления предусмотрены композиции, содержащие любой из раскрытых rAAV. Например, композиции составлены для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

[0021] Также предусмотрены способы лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2А у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из раскрытых rAAV или любой композиции, содержащей раскрытый rAAV. В любом из предусмотренных способов rAAV вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

[0022] Например, в этих способах лечение приводит к одному или более из (a) увеличения диаметра мышечных волокон, (b) уменьшения количества мелких дольчатых мышечных волокон, (c) уменьшения количества волокон с внутренними ядрами, (d) уменьшения содержания эндомизиальной соединительной ткани, (e) коррекции мышечной атрофии и (f) увеличения формирования мышечной силы. Мышечное волокно, на которое воздействует лечение, включает в себя одно или более из медленно сокращающегося окислительного (STO) мышечного волокна, быстро сокращающегося окислительного (FTO) мышечного волокна и быстро сокращающегося гликолитического (FTG) волокна.

[0023] Кроме того, в любом из предусмотренных способов лечение приводит к одному или более из (a) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, или 35%, или 40% уменьшения общего количества мышечных волокон на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; (b) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон через 4 недели после введения; (c) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 42% уменьшения количества мышечных волокон STO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; (d) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон STO через 4 недели после введения; (e) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% уменьшения количества мышечных волокон FTO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; (f) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% увеличения диаметра мышечных волокон FTO через 4 недели после введения; (g) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% уменьшения количества мышечных волокон FTG на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения и (h) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон FTG через 4 недели после введения.

[0024] В любом из предусмотренных способов сердечная мышца субъекта демонстрирует минимальный или низкий уровень белка кальпаина-3, экспрессирующегося из любого из предусмотренных rAAV или композиции, содержащей любой из предусмотренных rAAV. Мышечное волокно, на которое воздействует лечение с помощью композиции, включает в себя одно или более из медленно сокращающегося окислительного (STO) мышечного волокна, быстро сокращающегося окислительного (FTO) мышечного волокна и быстро сокращающегося гликолитического (FTG) волокна.

[0025] Предусмотрены композиции для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2А, содержащие терапевтически эффективное количество любого из раскрытых rAAV или композиции, содержащей любой из раскрытых rAAV. Данные

композиции для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2А составлены для введения путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, лечение с помощью любой из раскрытых композиций для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2А приводит к одному или более из (а) увеличения диаметра мышечных волокон, (b) уменьшения количества мелких дольчатых мышечных волокон, (с) уменьшения количества волокон с внутренними ядрами, (d) уменьшения содержания эндомизиальной соединительной ткани, (е) коррекции мышечной атрофии и (f) увеличения формирования мышечной силы. Мышечное волокно, на которое воздействует лечение с помощью композиции, включает в себя одно или более из медленно сокращающегося окислительного (STO) мышечного волокна, быстро сокращающегося окислительного (FTO) мышечного волокна и быстро сокращающегося гликолитического (FTG) волокна.

[0026] Кроме того, лечение с помощью любой из раскрытых композиций для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2А приводит к одному или более из (а) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, или 35%, или 40% уменьшения общего количества мышечных волокон на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; (b) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон через 4 недели после введения; (с) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 42% уменьшения количества мышечных волокон STO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; (d) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон STO через 4 недели после введения; (е) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% уменьшения количества мышечных волокон FTO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; (f) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% увеличения диаметра мышечных волокон FTO через 4 недели после введения; (g) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% уменьшения количества мышечных волокон FTG на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения и (h) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон FTG через 4 недели после введения.

[0027] Более того, лечение с помощью любой из предусмотренных композиций для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2А приводит к тому, что сердечная мышца субъекта демонстрирует минимальный или низкий уровень белка кальпаина-3, экспрессирующегося из любого из предусмотренных гAAV или композиции, содержащей любой из предусмотренных гAAV. После введения гAAV сердечная мышца демонстрирует отсутствие токсического эффекта, например, воспаления, некроза и/или регенерации, или небольшой таковой эффект.

[0028] В настоящем изобретении также предусмотрено применение терапевтически эффективного количества любого из раскрытых гAAV или композиции, содержащей любой из раскрытых гAAV, для получения лекарственного препарата для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2А. Например, лекарственный препарат составляют для введения путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

[0029] В любом из путей применения лечение с помощью лекарственного препарата приводит к одному или более из (а) увеличения диаметра мышечных волокон, (b)



уменьшения количества мелких дольчатых мышечных волокон, (с) уменьшения количества волокон с внутренними ядрами, (d) уменьшения содержания эндомизиальной соединительной ткани, (е) коррекции мышечной атрофии и (f) увеличения формирования мышечной силы. Мышечное волокно, на которое воздействует лечение с помощью лекарственного препарата, представляет собой одно или более из медленно сокращающегося окислительного (STO) мышечного волокна, быстро сокращающегося окислительного (FTO) мышечного волокна и быстро сокращающегося гликолитического (FTG) волокна.

[0030] Кроме того, в любом из путей применения терапевтически эффективного количества любого из раскрытых гAAV или предусмотренной композиции лечение с помощью лекарственного препарата приводит к одному или более из (a) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, или 35%, или 40% уменьшения общего количества мышечных волокон на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; (b) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон через 4 недели после введения; (с) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 42% уменьшения количества мышечных волокон STO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; (d) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон STO через 4 недели после введения; (е) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% уменьшения количества мышечных волокон FTO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; (f) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% увеличения диаметра мышечных волокон FTO через 4 недели после введения; (g) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% уменьшения количества мышечных волокон FTG на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения и (h) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон FTG через 4 недели после введения.

[0031] В любом из путей применения терапевтически эффективного количества любого из раскрытых гAAV или предусмотренной композиции после лечения с помощью лекарственного препарата сердечная мышца субъекта демонстрирует отсутствие или минимальный или низкий уровень белка кальпаина-3, экспрессирующегося из раскрытых продуктов или раскрытой композиции.

#### **Краткое описание графических материалов**

[0032] На фигурах 1A-1F показано, что генная терапия приводила к восстановлению нарушенной регенерации в мышце CAPN3-КО. На фигуре 1A показано схематическое изображение однонитевого гAAV AAV9.CAPN3. Между однонитевыми 5'- и 3'-ITR (инвертированными концевыми повторами) находится промотор гена мышечной креатинкиназы (МСК) (563 п. о.), который управляет экспрессией открытой рамки считывания CAPN3 (2466 п. о.). Также обозначен сайт полиаденилирования (поли(А), 53 п. о.). В передние большеберцовые (ТА) мышцы мышей CAPN3-КО вначале инъецировали СТХ, а через 2 недели -  $1 \times 10^{11}$  в. г. AAV.CAPN3 в левую ТА (фигура 1B) или PBS в правую ТА (фигура 1C). Через четыре недели после инъекции гAAV диаметр мышцы увеличивался, и дольчатые волокна встречались менее часто по сравнению с мышцей CAPN3-КО, не

подвергнутой обработке. На фигуре 1D, где представлены дольчатые волокна с паттерном субсарколеммальных органелл, распределение митохондрий (показано стрелками) позволяет предположить частичное слияние мышечных трубочек в не подвергнутой обработке мышце CAPN3-КО при более сильном увеличении. Масштабная метка=20 мкм для B-D. На фигуре 1E гистограммы распределения мышечных волокон по размеру (среднее значение  $\pm$  SEM/мм<sup>2</sup> площади; данные получены от 3 мышей в каждой группе) в подвергнутых обработке и не подвергнутых обработке мышцах TA мышей CAPN3-КО демонстрируют сдвиг в сторону волокон большего диаметра при обработке и увеличение субпопуляции с малым диаметром, имеющейся в группе, не подвергнутой обработке. На фигуре 1F гистограммы распределения медленно сокращающихся окислительных (STO) волокон по размеру демонстрируют большее количество тонких волокон (например, волокон с диаметром, равным 30 мкм или меньше) в не подвергнутой обработке мышце CAPN3-КО по сравнению с подвергнутой обработке мышцей CAPN3-КО.

[0033] На фигуре 2 показано схематическое изображение rAAV по настоящему изобретению, называемого «AAVrh.74.tMCK.CAPN3».

[0034] На фигурах 3A-3B представлены данные вестерн-блоттинга (панель A) и RT-PCR (панель B) после введения AAVrh.74.tMCK.CAPN3 посредством внутримышечной инъекции (1E11 в. г.) и системной инъекции (3E12 в. г. и 6E12 в. г.). Эти данные сравнивали с лизатом нормальных мышц человека (загрузка в гель 60% общего белка по сравнению с лизатами от мышей) и не подвергнутых обработке мышцей CAPN3-КО.

[0035] На фигуре 4 представлены иллюстративные изображения срезов ткани мышц CAPN3-КО (подвергнутых инъекции гена AAV.hCAPN3 и не подвергнутых обработке) и мышц TA дикого типа (WT), окрашенных SDH. Средний размер волокна для медленно сокращающихся окислительных (STO, темные), быстро сокращающихся окислительных (FTO, промежуточные) и быстро сокращающихся гликолитических (FTG, светлые) волокон в мышце TA мышей, подвергнутых обработке с помощью AAVrh.74.tMCK.CAPN3, выглядел нормализованным до значений для WT. Размеры волокон в зависимости от типа при наличии и в отсутствие обработки проиллюстрированы в таблице 4.

[0036] На фигуре 5 представлены относительные уровни экспрессии белка CAPN3, показанные в мышцах WT (Z18-14) и TA для когорты, получавшей низкую дозу (3E12 в. г., Z18-13, Z18-15, Z18-16, Z18-17, Z18-18), и икроножной мышце (икроножная), сердечной мышце, четырехглавой мышце, передней большеберцовой мышце (TA) и трехглавой мышце для когорты, получавшей высокую дозу (6E12 в. г., Z18-20, Z18-21, Z18-23, Z18-24, Z18-22) (UT: не подвергнутые обработке).

[0037] На фигуре 6 представлено число копий вектора AAVrh74.tMCK.hCAPN3/мкг геномной ДНК в когорте, получавшей высокую дозу 6E12 векторных геномов посредством системного введения, в следующих мышцах: четырехглавой (четырёхглавая), сердечной, передней большеберцовой (TA), икроножной (икроножная), трехглавой, а также в печени.

[0038] На фигуре 7 представлены средние значения диаметра волокна для медленно сокращающихся окислительных (STO, темные), быстро сокращающихся окислительных

(FTO, промежуточные) и быстро сокращающихся гликолитических (FTG, светлые) волокон левой мышцы ТА после системного введения 3E12 и 6E12 в. г. AAVrh.74.tMCK.CAPN3. Были включены данные от не подвергнутых обработке мышцей CAPN3-КО и WT.

[0039] На фигуре 8 представлены данные теста бега до изнеможения. На фигуре 8А представлены данные для когорты, получавшей низкую дозу, которая получала 3E12 в. г. AAVrh.74.tMCK.CAPN3, и когорты, получавшей высокую дозу, которая получала 6E12 в. г. AAVrh.74.tMCK.CAPN3, через 4 недели после системного введения. Мыши CAPN3-КО, подвергнутые обработке, показали лучшие результаты в тесте бега до изнеможения по сравнению с соответствующими животными, не подвергнутыми обработке. На фигуре 8В представлены данные для когорты, получавшей высокую дозу, в которой мышью тестировали через 20-24 недели после системного введения 6E12 в. г. AAVrh.74.tMCK.CAPN3 (n=5), и соответствующих животных, не подвергнутых обработке (n=16).

[0040] На фигуре 9 представлены свежемороженые срезы левых желудочков, окрашенные гематоксилином и эозином (H&E), из иллюстративных образцов сердца от мышцей CAPN3-КО через 4 недели после системной инъекции вектора AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3 в дозах 3E12 в. г. и 6E12 в. г. и соответствующих контрольных животных, не подвергнутых обработке.

[0041] На фигуре 10 представлены результаты вестерн-блот-анализа образцов ткани сердца из когорты, получавшей высокую дозу (которая получала 6E12 в. г. AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3). Данный анализ показал отсутствие или минимальное выявляемое количество белка кальпаина-3 в сердце животного, подвергнутого обработке. Под идентификационными номерами животных Z18-19 и 22 представлены лизаты от мышцей CAPN3-КО, не подвергнутых обработке.

#### **Подробное описание**

[0042] Рекомбинантные AAV (rAAV), предусмотренные в данном документе, содержат полинуклеотид, который содержит первый инвертированный концевой повтор (ITR) AAV, промотор, нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, обладающий активностью кальпаина-3 (CAPN3), и второй ITR AAV. В одном варианте осуществления нуклеотид кодирует CAPN3. Варианты осуществления включают без ограничения rAAV, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую CAPN3 или белок, обладающий активностью CAPN3, где нуклеотидная последовательность является на по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89% идентичной нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 2. Дополнительные варианты осуществления включают, также без ограничения, rAAV, содержащий нуклеотидную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичной нуклеотидной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2, и кодирующую полипептид, обладающий протеолитической активностью CAPN3. Протеолитическая активность CAPN3 понимается в данной области техники как

активность протеолиза потенциальных субстратов, таких как фодрин и HSP60, и/или активность аутолитического саморасщепления. Таким образом, используемый в данном документе термин «белок, обладающий активностью кальпаина-3 (CAPN3)», относится к белку, обладающему протеолитической активностью CAPN3, которая включает без ограничения активность протеолиза потенциальных субстратов, таких как фодрин и HSP60, и/или активность аутолитического саморасщепления. Белок, обладающий активностью CAPN3, может обладать полной или частичной активностью полноразмерного белка кальпаина-3. В одном варианте осуществления белок, обладающий активностью CAPN3, обладает по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% активности полноразмерного белка CAPN3. В другом варианте осуществления белок, обладающий активностью CAPN3, содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 7.

[0043] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, обладающий активностью CAPN3, содержит последовательность под SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления белок, обладающий активностью CAPN3, содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления белок, обладающий активностью CAPN3, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления полинуклеотид rAAV содержит последовательность, являющуюся на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит последовательность, являющуюся на по меньшей мере 95% идентичной SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит последовательность под SEQ ID NO: 1.

[0044] В другом аспекте в данном документе описан рекомбинантный AAV, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, обладающий активностью CAPN3, и/или которая содержит нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся в жестких условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 2 или комплементарной ей последовательностью. Термин «жесткие» используется по отношению к условиям, которые часто понимаются в данной области техники как жесткие. Жесткость условий гибридизации определяется преимущественно температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих средств, таких как формамид. Примерами жестких условий гибридизации и отмывки являются 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия при 65-68°C или 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия и 50% формамид при 42°C. См. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989).

[0045] В рекомбинантных геномах, описанных в данном документе, полинуклеотид CAPN3 функционально связан с элементами, контролирующими транскрипцию (включающими без ограничения промоторы, энхансеры и/или интроны), в частности, элементами, контролирующими транскрипцию, являющимися функциональными в

клетках-мишенях, представляющих интерес. Например, в различных вариантах осуществления предусмотрены способы трансдукции мышечных клеток с использованием элементов, контролирующих транскрипцию, специфичных для мышц, включающих без ограничения элементы, полученные из семейств генов актина и миозина, как, например, из семейства генов *myoD* [см. Weintraub *et al.*, *Science*, 251: 761-766 (1991)], миоцит-специфический энхансерный связывающий фактор MEF-2 [Cserjesi и Olson, *Mol Cell Biol*, 11: 4854-4862 (1991)], контролирующие элементы, полученные из гена скелетномышечного актина человека [Muscat *et al.*, *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], элементы последовательности гена мышечной креатинкиназы [см. Johnson *et al.*, *Mol Cell Biol*, 9:3393-3399 (1989)] и энхансерный элемент гена креатинкиназы мышцы (mCK), контролирующие элементы, полученные из гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленно сокращающихся волокон сердечной мышцы и гена тропонина I медленно сокращающихся волокон; ядерные факторы, индуцируемые гипоксией [Semenza *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5680-5684 (1991)], стероид-индуцируемые элементы, а также промоторы, содержащие глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) [см. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5603-5607 (1993)], промотор tMCK [см. Wang *et al.*, *Gene Therapy*, 15: 1489-1499 (2008)], промотор СК6 [см. Wang *et al.*, *выше*] и другие контролирующие элементы. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, обладающий активностью кальпаина-3 (CAPN3), функционально связана с промотором, специфичным для мышц. В одном варианте осуществления промотор, специфичный для мышц, содержит один или более из элемента гена скелетномышечного актина человека, элемента гена сердечного актина, промотора гена десмина, промотора гена скелетномышечного альфа-актина (ASKA), промотора гена тропонина I (TNNI2), связывающего элемента для миоцит-специфического энхансерного связывающего фактора *myf*, промотора гена мышечной креатинкиназы (MCK), усеченного промотора гена MCK (tMCK), промотора гена тяжелой цепи миозина (MHC), гибридного промотора, представляющего собой энхансер гена тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина/тандем энхансер-промотор гена MCK (MHCK7), промотора C5-12, энхансерного элемента гена креатинкиназы мышцы, элемента гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемента гена тропонина С медленно сокращающихся волокон сердечной мышцы, элемента гена тропонина I медленно сокращающихся волокон, элемента, отвечающего на ядерный фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) (HRE), стероид-индуцируемого элемента, глюкокортикоид-отвечающего элемента (*gre*). В другом варианте осуществления промотор, специфичный для мышц, представляет собой промотор MCK, промотор tMCK или промотор MHCK7. В некоторых вариантах осуществления промотор, специфичный для мышц, представляет собой tMCK, который содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0046] Предыдущие исследования продемонстрировали, что экспрессия CAPN3, управляемая промотором гена десмина, приводила к кардиотоксичности. В ходе проспективных исследований было показано, что избирательная экспрессия гена в

скелетных мышцах приводила к устранению пороков сердца. Геномы AAV, раскрытые в данном документе, содержат промотор tMCK, специфичный для мышц, для ограничения экспрессии CAPN3 скелетными мышцами и продемонстрировали отсутствие кардиотоксичности после системной доставки вируса в дозе 6Е12 в. г. (в два раза превышающей предлагаемую исходную высокую дозу) через 4 недели после инъекции гена.

[0047] В геномах гAAV, описанных в данном документе, отсутствует ДНК гер и сар AAV. Предусмотренные геномы гAAV содержат полинуклеотид CAPN3, описанный выше, и один или более ITR AAV, фланкирующих полинуклеотид. ДНК AAV в геномах гAAV может быть получена из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, в том числе без ограничения из серотипов AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-rh.74 и AAV-rh.10. Также рассматриваются другие типы вариантов гAAV, например, гAAV с мутациями капсидных белков. См., например, Marsic *et al.*, *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Как отмечено в разделе «Предпосылки изобретения» выше, нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны из уровня техники. Для содействия экспрессии, специфичной для скелетных мышц, можно использовать AAV1, AAV5, AAV6, AAV8 или AAV9.

[0048] Предусмотренные ДНК-плазмиды содержат геномы гAAV. ДНК-плазмиды переносят в клетки, допускающие инфицирование вирусом-помощником AAV (в том числе без ограничения аденовирусом, аденовирусом с делецией E1 или вирусом герпеса), для сборки генома гAAV в виде инфекционных вирусных частиц. Методики получения частиц гAAV, в рамках которых геном AAV, подлежащий упаковке, гены гер и сар и функциональные элементы вируса-помощника предоставляются клетке, являются стандартными в данной области техники. Для получения гAAV требуется, чтобы в одной клетке (называемой в данном документе пакующей клеткой) присутствовали следующие компоненты: геном гAAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV (*m. e.* не находящиеся в нем), и функциональные элементы вируса-помощника. ITR и гены гер и сар AAV могут быть получены из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут быть получены из серотипа AAV, отличного от серотипа для ITR генома гAAV, в том числе без ограничения из серотипов AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-rh.10 и AAV-rh.74. Получение псевдотипированного гAAV раскрыто, например, в WO 01/83692, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Таким образом, в одном варианте осуществления гAAV содержит один или более из капсидных белков AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-rh.74 или AAV-rh.10. В другом варианте осуществления гAAV содержит капсидный белок AAV-rh.74 или капсидный белок AAV9.

[0049] Способ получения пакующей клетки заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для

продуцирования частиц AAV. Например, плазмиду (или несколько плазмид), содержащую геном гAAV, в котором отсутствуют гены гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV, и селективируемый маркер, такой как ген устойчивости к неомицину, интегрируют в геном клетки. Геномы AAV вводили в бактериальные плазмиды с помощью процедур, таких как образование GC-хвостов [Samulski *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:2077-2081 (1982)], добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой [Laughlin *et al.*, *Gene*, 23:65-73 (1983)], или путем прямого лигирования тупых концов [Senapathy & Carter, *J. Biol. Chem.*, 259:4661-4666 (1984)]. Затем пакующую клеточную линию инфицируют вирусом-помощником, таким как аденовирус. Преимущества этого способа заключаются в том, что клетки могут быть подвергнуты отбору и подходят для крупномасштабного получения гAAV. В других примерах подходящих способов используют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в пакующие клетки.

[0050] Обзор общих принципов получения гAAV представлен, например, в Carter, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-1539 (1992) и Muzyczka, *Curr. Topics in Microbial. and Immunol.*, 158:97-129 (1992). Различные подходы описаны в Ratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072 (1984); Hermonat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984); Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3251 (1985); McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62:1963 (1988); Lebkowski *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988); Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 63:3822-3828 (1989); патенте США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте США № 5658776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin *et al.*, *Vaccine*, 13:1244-1250 (1995); Paul *et al.*, *Human Gene Therapy*, 4:609-615 (1993); Clark *et al.*, *Gene Therapy* 3:1124-1132 (1996); патенте США № 5786211; патенте США № 5871982; патенте США № 6258595 и McCarty, *Mol. Ther.*, 16(10): 1648-1656 (2008). Вышеупомянутые документы настоящим включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте с особым акцентом на тех разделах документов, которые относятся к получению гAAV.

[0051] Таким образом, предусмотрены пакующие клетки, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном варианте осуществления пакующие клетки могут представлять собой стабильно трансформированные раковые клетки, такие как клетки HeLa и клетки PerC.6 (линия, когнатная 293). В другом варианте осуществления пакующие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такие как клетки 293 низкого пассажа (клетки почки человеческого плода, трансформированные с помощью E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты человеческого плода), клетки WI-38 (фибробласты человеческого плода), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода макака-резуса).

[0052] Рекомбинантные AAV, предусмотренные в данном документе, являются, таким образом, дефектными по репликации, инфекционными, инкапсидированными вирусными частицами, которые содержат рекомбинантный геном. Примеры включают без

ограничения гAAV, содержащий геном, содержащий последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, кодирующую CAPN3, гAAV, содержащий геном, по сути состоящий из последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, кодирующей CAPN3, и гAAV (называемый «AAVrh.74.tMCK.CAPN3»), содержащий геном, состоящий из последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, кодирующей CAPN3. В геномах гAAV отсутствует ДНК гер и сар AAV, что означает, что в геноме гAAV между ITR отсутствует ДНК гер или сар AAV.

[0053] Последовательность AAVrh.74.tMCK.CAPN3 представлена под SEQ ID NO: 1, в которой ITR AAV2 охватывает нуклеотиды 1-128, промотор tMCK охватывает нуклеотиды 165-884, химерный интрон охватывает нуклеотиды 937-1069, последовательность Козак охватывает нуклеотиды 1101-1106, полинуклеотид CAPN3 охватывает нуклеотиды 1107-3572, сигнал поли(А) охватывает нуклеотиды 3581-3780, и второй ITR AAV2 охватывает нуклеотиды 3850-3977.

[0054] гAAV может быть очищен с помощью способов, известных из уровня техники, как, например, с помощью колоночной хроматографии или градиентов хлорида цезия. Способы очистки векторов гAAV от вируса-помощника известны из уровня техники и включают в себя способы, раскрытые, например, в Clark *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999); Schnepf and Clark, *Methods Mol. Med.*, 69: 427-443 (2002); патенте США № 6566118 и WO 98/09657.

[0055] В другом варианте осуществления предусмотрены композиции, содержащие гAAV, описанный в данном документе. Предусмотренные композиции содержат гAAV в фармацевтически приемлемом носителе. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и вспомогательные средства. Приемлемые носители, разбавители и вспомогательные средства являются нетоксичными для получающих их пациентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозировках и концентрациях, и они включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат или другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, плуроники или полиэтиленгликоль (PEG).

[0056] Титры гAAV, подлежащего введению в способах, описанных в данном документе, могут варьироваться в зависимости, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивидуума и типа(типов) клеток, на которые производится нацеливание, и могут быть определены с помощью способов, стандартных в данной области техники. Титры гAAV могут находиться в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1 \times 10^{13}$  до приблизительно



$1 \times 10^{14}$  или больше частиц, устойчивых к ДНКазам (DRP), на мл. Дозировки также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (в. г.). Иллюстративные раскрытые дозы включают  $1E11$  в. г.,  $3E12$  в. г. и  $6E12$  в. г.

[0057] В данном документе рассматриваются способы трансдукции клетки-мишени, такой как мышечная клетка, с помощью гAAV *in vivo* или *in vitro*. Способы *in vivo* включают стадию введения эффективной дозы или нескольких эффективных доз композиции, содержащей гAAV, предусмотренный в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом (например, животному, в том числе без ограничения пациенту-человеку). Если дозу вводят до развития нарушения/заболевания, то введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития нарушения/заболевания, то введение является терапевтическим. Эффективная доза представляет собой дозу, которая приводит к уменьшению интенсивности (устранению или ослаблению) по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с нарушением/болезненным состоянием, лечение которого осуществляется, которая приводит к замедлению или предупреждению прогрессирования до нарушения/болезненного состояния, которая приводит к замедлению или предупреждению прогрессирования нарушения/болезненного состояния, которая приводит к уменьшению степени заболевания, которая приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или которая приводит к продлению выживаемости. По сравнению с субъектом до лечения способы, описанные в данном документе, приводят к одному или более из увеличения диаметра мышечных волокон, уменьшения количества мелких дольчатых мышечных волокон, уменьшения количества волокон с внутренними ядрами, уменьшения содержания эндомизимальной соединительной ткани, коррекции мышечной атрофии и увеличения формирования мышечной силы. В одном варианте осуществления мышечное волокно включает в себя одно или более из медленно сокращающегося окислительного (STO) мышечного волокна, быстро сокращающегося окислительного (FTO) мышечного волокна и быстро сокращающегося гликолитического (FTG) волокна. В одном варианте осуществления лечение приводит к одному или более из (a) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, или 35%, или 40% уменьшения общего количества мышечных волокон на  $\text{мм}^2$  через 4 недели после введения; (b) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон через 4 недели после введения; (c) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 42% уменьшения количества мышечных волокон STO на  $\text{мм}^2$  через 4 недели после введения; (d) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон STO через 4 недели после введения; (e) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% уменьшения количества мышечных волокон FTO на  $\text{мм}^2$  через 4 недели после введения; (f) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% увеличения диаметра мышечных волокон FTO через 4 недели после введения; (g) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% уменьшения количества мышечных волокон FTG на  $\text{мм}^2$  через 4 недели после введения и (h) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон FTG через 4 недели после введения. В одном варианте осуществления способ по настоящему

изобретению приводит к отсутствию или минимальному или низкому уровню белка кальпаина-3, экспрессирующегося из гAAV, в сердечной мышце субъекта, которому вводили гAAV.

[0058] Анализы для изучения этих результатов понятны в данной области техники и/или описаны в примерах в данном документе. В данном документе рассматривается применение способов, описанных в данном документе, для предупреждения или лечения нарушений/заболеваний (например, форм мышечной дистрофии), обусловленных дефектами активности CAPN3 или дефектами экспрессии CAPN3. LGMD2A является примером заболевания, для которого рассматривается предупреждение или лечение согласно способам.

[0059] Также рассматриваются виды комбинированной терапии. Комбинация, применяемая в данном документе, включает в себя как одновременное лечение, так и последовательное лечение. В частности, рассматриваются комбинации способов, описанных в данном документе, со стандартными видами медицинского лечения (например, применением кортикостероидов), равно как и комбинации с новыми видами терапии.

[0060] Введение эффективной дозы композиций можно осуществлять с помощью путей, стандартных в данной области техники, включающих без ограничения внутримышечный, парентеральный, внутривенный, интратекальный, пероральный, трансбуккальный, интраназальный, легочный, внутричерепной, внутрикостный, внутриглазной, ректальный или вагинальный пути. Путь(пути) введения и серотип(серотипы) компонентов AAV в гAAV (в частности, ITR и капсидного белка AAV) могут быть выбраны и/или подобраны специалистом в данной области с учетом инфекции и/или болезненного состояния, лечение которого осуществляется, и клеток/ткани(тканей)-мишеней, которые должны будут экспрессировать CAPN3. В одном варианте осуществления гAAV вводят путем внутримышечной инъекции, внутривенной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, подкожной инъекции, накожного введения, интравагинальной инъекции, внутрикожного введения или интраназального введения. В другом варианте осуществления гAAV вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

[0061] В частности, фактическое введение гAAV, описанного в данном документе, можно осуществлять с помощью любого физического способа, который будет обеспечивать транспортировку рекомбинантного вектора гAAV в ткань-мишень животного. Введение включает без ограничения инъекцию мышцу, кровотоку и/или непосредственно в печень. Было продемонстрировано, что простое ресуспендирование гAAV в фосфатно-солевом буферном растворе является достаточным для получения среды-носителя, применимой для экспрессии в мышечной ткани, и не существует каких-либо известных ограничений в отношении носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с гAAV. Капсидные белки гAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы гAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См.,

например, WO 02/053703, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных составов или в виде составов для местного применения, которые подлежат доставке в мышцы путем чрескожного транспорта. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для чрескожного транспорта были разработаны ранее и могут применяться при практическом осуществлении способов. rAAV можно применять совместно с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обращения.

[0062] Для целей внутримышечной инъекции можно использовать растворы во вспомогательном средстве, таком как кунжутное или арахисовое масло, или в водном пропиленгликоле, а также стерильные водные растворы. Такие водные растворы могут быть при необходимости забуферены, а жидкий разбавитель сначала делают изотоническим с помощью физиологического раствора или глюкозы. Растворы rAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли можно получать в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсию rAAV также можно получать в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В связи с этим все используемые стерильные водные среды можно легко получить посредством стандартных методик, хорошо известных специалистам в данной области.

[0063] Фармацевтические формы, подходящие для системного (*например*, внутривенного) инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного применения. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить через шприц. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (*например*, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может обеспечиваться различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и т. п. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может обеспечиваться благодаря использованию средств, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0064] Стерильные инъекционные растворы получают путем включения гAAV в требуемом количестве в соответствующий растворитель, при необходимости с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, с последующей стерилизующей фильтрацией. Обычно дисперсии получают путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов в некоторых вариантах осуществления способы получения включают методику вакуумной сушки и/или сублимационной сушки, каждая из которых может обеспечивать получение порошка на основе активного ингредиента и любого дополнительного необходимого ингредиента из их раствора, предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации.

[0065] Трансдукцию посредством гAAV также можно выполнять *in vitro*. В одном варианте осуществления необходимые мышечные клетки-мишени извлекают из организма субъекта, трансдуцируют посредством гAAV и вводят обратно субъекту. В качестве альтернативы, можно использовать сингенные или ксеногенные мышечные клетки, если эти клетки не будут вызывать неприемлемый иммунный ответ у субъекта.

[0066] Подходящие способы выполнения трансдукции и введения трансдуцированных клеток обратно субъекту известны из уровня техники. В одном варианте осуществления клетки могут быть подвергнуты трансдукции *in vitro* посредством объединения гAAV с мышечными клетками, *например*, в подходящей среде, и скрининга в отношении тех клеток, которые содержат ДНК, представляющую интерес, с помощью традиционных методик, таких как Саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с помощью селективируемых маркеров. Трансдуцированные клетки можно затем составлять в виде фармацевтических композиций, и композицию можно вводить субъекту с помощью различных методик, как, например, путем внутримышечной, внутривенной, подкожной и внутрибрюшинной инъекции или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу с помощью, *например*, катетера.

[0067] Трансдукция клеток посредством гAAV с помощью способов, описанных в данном документе, приводит к устойчивой экспрессии CAPN3 или белка, обладающего активностью CAPN3. Таким образом, предусмотрены способы введения гAAV, который экспрессирует CAPN3 или белок, обладающий активностью CAPN3, субъекту, предпочтительно человеку. Субъект по настоящему изобретению включает без ограничения человека, собаку, кошку, лошадь, корову, свинью, овцу, козу, курицу, грызуна (например, крыс и мышей) и примата. Эти способы включают трансдукцию тканей (в том числе без ограничения тканей, таких как мышечная ткань, органов, таких как печень и головной мозг, и желез, таких как слюнные железы) посредством одного или более гAAV, описанных в данном документе.

[0068] Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. Способы, описанные в данном документе, обеспечивают устойчивую экспрессию CAPN3 в

трансдуцированных мышечных клетках.

[0069] Под «мышечной клеткой», «мышечным волокном» или «мышечной тканью» подразумевается клетка или группа клеток, полученные из мышцы любого типа [например, скелетной мышцы и гладкой мышцы (*например*, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или ткани сердца)]. Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, такими как миобласты, миоциты, мышечные трубочки, кардиомиоциты и кардиомиобласты.

[0070] Термин «трансдукция» используется по отношению к введению/доставке CAPN3 в клетку-реципиента *in vivo* либо *in vitro* посредством описанного rAAV, что приводит к экспрессии CAPN3 клеткой-реципиентом.

[0071] Таким образом, предусмотрены способы введения эффективной дозы (или доз, вводимых по сути одновременно, или доз, вводимых с интервалами) rAAV, который кодирует CAPN3, субъекту, нуждающемуся в этом.

[0072] Как отмечалось выше, способы, описанные в данном документе, приводят к развитию у субъекта по сравнению с субъектом до лечения одного или более из увеличения диаметра мышечных волокон, уменьшения количества мелких дольчатых медленно сокращающихся окислительных (STO) мышечных волокон, уменьшения количества волокон с внутренними ядрами, уменьшения содержания эндомизиальной соединительной ткани, коррекции мышечной атрофии и увеличения формирования мышечной силы.

#### Примеры

[0073] Аспекты и варианты осуществления проиллюстрированы с помощью следующих примеров. В примере 1 описано получение AAV9.MCK.CAPN3. В примере 2 описано внутримышечное введение AAV9.MCK.CAPN3. В примере 3 описано получение AAVrh.74.tMCK.CAPN3. В примере 4 описано внутримышечное введение AAVrh.74.tMCK.CAPN3. В примере 5 описано внутривенное введение AAVrh.74.tMCK.CAPN3. В примере 6 описаны исследования конечных точек. В примере 7 описаны токсикологические исследования и исследования биораспределения. В примере 8 описано тестирование биологической активности *in vivo* после внутримышечного введения. В примере 9 описано тестирование биологической активности *in vivo* после системной инъекции. В примере 10 описана оценка системной доставки гена AAVrh.74.tMCK.CAPN3. В примере 11 описана оценка кардиотоксичности после системной инъекции вектора AAVrh.74.tMCK.CAPN3. В примере 12 описан физиологический анализ *in vivo*.

#### Пример 1

##### Получение AAV9.MCK.CAPN3

[0074] Получали вектор AAV (называемый AAV.CAPN3), несущий ген CAPN3 под контролем промотора MCK, специфичного для мышц (фигура 1A). ДНК, содержащую открытую рамку считывания CAPN3 мыши (NM\_007601.3) между двумя сайтами рестрикции для Not1, синтезировали в Eurofins Genomics, США, и затем субклонировали в односторонний вектор AAV.MCK (мышечная креатинкиназа), ранее описанный в Rodino-

Кларас *et al.*, *Journal of Translational Medicine*, 5:45-55 (2007). Векторы гAAV получали с применением модифицированного подхода перекрестной упаковки, посредством которого векторный геном AAV типа 2 может быть упакован в капсиды AAV нескольких серотипов. [Rabinowitz *et al.*, *J Virol.* 76 (2):791-801 (2002)]. Получение осуществлялось с помощью стандартного трехплазмидного способа с осаждением ДНК с помощью CaPO<sub>4</sub> и использованием клеток HEK293. Клетки 293 выдерживали в DMEM, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), а также пенициллином и стрептомицином. Продуцирующими плазмидами являлись: (i) pAAV.MCK.microdys, (ii) rep2/capX-модифицированные плазмиды-помощники AAV, кодирующие cap серотипов 1, 6 или изолята, подобного серотипу 8, и (iii) плазмида-помощник на основе аденовируса типа 5 (pAdhelper), экспрессирующая гены аденовируса E2A, ORF6 E4 и PНК VA I/II. Для обеспечения возможности проведения сравнений между серотипами применяли способ титрования на основе количественной ПЦР для определения титра инкапсидированных векторных геномов (в. г.) с использованием системы выявления в режиме реального времени Prism 7500 TaqMan (PE Applied Biosystems). [Clark *et al.*, *Hum Gene Ther.* 10 (6): 1031-1039 (1999)]. Праймер и флуоресцентный зонд для нацеливания на промотор MCK были следующими: прямой праймер для MCK - 5-CCCGAGATGCCTGGTTATAATT-3 (SEQ ID NO: 4); обратный праймер для MCK - 5-GCTCAGGCAGCAGGTGTTG-3 (SEQ ID NO: 5) и зонд для MCK - 5-FAM-CCAGACATGTGGCTGCTCCCCC-TAMRA-3 (SEQ ID NO: 6). Конечный титр (в. г.·мл<sup>-1</sup>) определяли с помощью количественной ПЦР с обратной транскриптазой с применением праймеров и зондов, специфичных для промотора MCK, с использованием системы выявления в режиме реального времени Prism 7500 (PE Applied Biosystems, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США). Разделенные на аликвоты вирусы выдерживали при -80°C до применения.

## **Пример 2**

### **Внутримышечное введение AAV9.MCK.CAPN3**

[0075] Для демонстрации того, может ли CAPN3 WT восстанавливать нарушенный процесс регенерации у мышечной ткани с нокаутом CAPN3 (CAPN3-KO), в мышцы ТА мышечной ткани CAPN3-KO (n=4) [Kramerova *et al.*, *Hum Mol Genet* 13(13):1373-1388 (2004)] под анестезией вначале инъекцировали 30 мкл СТХ, а через 2 недели их трансдуцировали для экспрессии CAPN3 дикого типа с помощью AAV9.MCK.CAPN3 в количестве  $1 \times 10^{11}$  в. г. в объеме 20 мкл посредством внутримышечной инъекции. В мышечную ткань ТА из другой когорты CAPN3-KO (n=4), служившие в качестве контроля, вводили такой же объем PBS через 2 недели после инъекции СТХ.

[0076] Мышей умерщвляли через 6 недель после инъекции СТХ, и мышечную ткань ТА удаляли и подвергали обработке для изготовления срезов в криостате. Поперечные срезы толщиной двенадцать мкм вначале окрашивали с помощью H&E для проведения стандартной патогистологической оценки; измерения диаметра конкретных типов мышечных волокон получали с использованием поперечных срезов ТА, окрашенных SDH, от 3 мышечных тканей из каждой группы. Производили по три произвольных фотографических снимка

ТА (на каждый срез от каждого животного) при увеличении 20X и проводили измерения диаметра волокон и построение гистограмм для конкретных типов волокон.

[0077] Для оценки метаболической дифференцировки типов волокон [медленно сокращающиеся окислительные (STO), быстро сокращающиеся окислительные (FTO) и быстро сокращающиеся гликолитические (FTG)] применяли гистохимический анализ с использованием фермента сукцинатдегидрогеназы (SDH). Измерения диаметра конкретных типов мышечных волокон получали с использованием поперечных срезов толщиной 12 мкм, окрашенных с помощью SDH, через 4 и 12 недель после заключительной инъекции кардиотоксина. Производили по три фотографических снимка, на каждом из которых представлены три отдельные зоны икроножной мышцы (глубокую зону, состоящую преимущественно из STO, промежуточную зону, демонстрирующую STO и FTO или FTG, представленные в шахматном порядке, и поверхностную зону, преимущественно состоящую из волокон FTG) вдоль оси срединной линии (на каждый срез от каждого животного) при увеличении 20X с использованием микроскопа Olympus BX41 и камеры SPOT (Olympus BX61, Япония). Этот подход был выбран, чтобы зафиксировать изменения в окислительном состоянии волокон в каждой зоне в ответ на метаболические изменения во время регенерации. Диаметры темных (STO), промежуточных (FTO) и светлых (FTG) волокон определяли путем измерения кратчайшего расстояния в пределах мышечного волокна с использованием программного обеспечения Zeiss AxioVision LE4 (версия 4.8). Гистограммы диаметра волокон строили отдельно для STO; а для FTG и FTO объединяли с целью представления общей популяции быстро сокращающихся волокон (FTG/O), полученных от 3 животных и выраженных в виде количества на мм<sup>2</sup> площади эндомизия (среднее значение  $\pm$  SEM). Средний диаметр волокна получали путем объединения показателей для всех 3 типов волокон. В среднем измеряли по 900-1700 волокон на группу. Мышцы ТА использовали для оценки фиброза (см. ниже).

[0078] Через четыре недели после инъекции AAV9.MCK.CAPN3 наблюдалось значительное увеличение диаметра мышцы, а также выраженное уменьшение количества внутренних ядер и намного меньшее количество тонких волокон с дольчатым паттерном (фигура 1B). В не подвергнутой обработке мышце CAPN3-КО наблюдалось на 31,6% больше волокон на мм<sup>2</sup> площади, и они в основном состояли из тонких и дольчатых волокон STO, что указывало на то, что обработка приводила к улучшению слияния мышечных трубочек и, следовательно, уменьшению количества отдельных тонких волокон на единицу площади (фигура 1C и D; таблица 1).

**Таблица 1 - Размер волокон передней большеберцовой мышцы**

	Не подвергнутые обработке, количество на мм <sup>2</sup>	Не подвергнутые обработке, диаметр	Подвергнутые обработке с помощью AAV.CAPN3, количество на мм <sup>2</sup>	Подвергнутые обработке с помощью AAV.CAPN3, диаметр
<b>STO</b>	355	32,72 $\pm$ 0,4	233	39,81 $\pm$ 0,6*
<b>FTG/O</b>	116	44,26 $\pm$ 0,9	99	50,40 $\pm$ 1,2*

<b>Все типы волокон</b>	471	35,55 ± 0,4	322	43,08 ± 0,6*
---------------------------------	-----	-------------	-----	--------------

\* $p < 0,0001$  по сравнению с аналогичным параметром для дикого типа

[0079] На гистограммах распределения волокон по размеру в мышце TA, подвергнутой обработке, демонстрировался сдвиг в сторону волокон большего диаметра при обработке, и избыточное количество тонких волокон в контрольной мышце CAPN3-КО, не подвергнутой обработке, относились к гистохимическому типу волокон STO (фигуры 1E и 1F). В совокупности эти полученные данные демонстрируют, что замещение CAPN3 посредством генной терапии в мышце CAPN3-КО помогало при дефектной регенерации, о чем свидетельствовали тенденция к нормализации размера волокон и уменьшение количества волокон в популяции STO.

### Пример 3

#### Получение AAVrh.74.tMCK.CAPN3

[0080] Получали вектор AAV (называемый AAVrh74.tMCK.CAPN3), несущий ген CAPN3 под контролем усеченного промотора MCK, специфичного для мышц (промотора tMCK). ДНК, содержащую открытую рамку считывания CAPN3 мыши (NM\_007601.3) между двумя сайтами рестрикции для Not1, синтезировали в Eurofin Genomics, США, и затем вставляли в продуцирующую плазмиду на основе AAV. Карта плазмиды показана на фигуре 2.

[0081] Затем получали векторы gAAV с применением подхода, описанного в примере 1.

### Пример 4

#### Внутривенное введение AAVrh.74.tMCK.CAPN3

[0082] Мыши CAPN3-КО в возрасте 6 месяцев получали AAVrh.74.tMCK.CAPN3 в низкой ( $3 \times 10^{12}$  в. г.) и высокой дозах ( $6 \times 10^{12}$  в. г.) посредством инъекции в хвостовую вену. Мышей умерщвляли через 20 недель после инъекции гена для проведения исследований конечных точек. Соответствующие по возрасту мыши CAPN3-КО, подвергнутые обработке с помощью среды-носителя, служили в качестве контролей.

**Таблица 2 - Когорты обработки**

Когорты	Обработка	Общее количество мышей	Возраст на момент начала обработки	Доза, используемая при обработке (AAVrh.74.tMCK.CAPN3)	Продолжительность обработки	Возраст в конечной точке
CAPN3-КО		40				



Низкая доза	AAV. CAPN3	8	24 недели	3e12 в. г. в 300 мкл физиологи- ческого раствора, i.v.	20 недель	44 недели
	Обработк а с помощью физиоло- гического раствора	8	24 недели		20 недель	44 недели
Высокая доза	AAV. CAPN3	8	24 недели	6e12 в. г. в 300 мкл физиологи- ческого раствора, i.v.	20 недель	44 недели
	Обработк а с помощью физиолог и-ческого раствора	8	24 недели		20 недель	44 недели
<b>Конт- рольные животны е дикого типа</b>	Обработк а с помощью физиолог и-ческого раствора	8	24 недели		20 недель	44 недели

[0083] Исследования конечных точек, проводившиеся, как описано в примере 7 ниже, включали анализ физиологических показателей мышц (анализ формирования силы в ТА или сократимости мышц *in vivo*, а также анализ защиты от эксцентрических сокращений), патогистологический анализ мышц, выявление hCAPN3 с помощью qPCR и вестерн-блот-анализ.

#### **Пример 5**

#### **Внутримышечное введение AAVrh.74.tMCK.CAPN3**

[0084] В старых и молодых мышцах CAPN3-КО измеряли регенеративные ответы

на синхронный некроз, индуцированный кардиотоксином (СТХ), после введения CAPN3 в регенерирующую мышцу посредством обработки с помощью gAAV.

[0085] В когортах, состоящих из молодых (в возрасте 2 месяцев) и старых мышей (в возрасте 6 месяцев), СТХ инъецировали в обе мышцы ТА с целью индуцирования синхронного некроза за 2 недели до инъекции gAAV в левую мышцу ТА. AAVrh.74.tMCK.CAPN3 в количестве  $1 \times 10^{11}$  в. г. в объеме 20 мкл вводили посредством внутримышечной инъекции. Исследования конечных точек проводили через 8 недель после переноса гена (в дозе  $1 \times 10^{11}$  в. г. с эффективностью, установленной в предыдущих исследованиях авторов настоящего изобретения) для оценки коррекции дефекта регенерации путем сравнения количественных гистологических и физиологических исходов для левой ТА и не подвергнутой обработке правой ТА.

**Таблица 3 - Когорты обработки**

Когорты	Обра-ботка	Общее коли-чество мышей	Билатераль-ная инъекция СТХ в мышцу ТА; возраст/путь доставки/доза	Возраст на момент начала генной терапии	Доза, используе-мая при обработке (AAVrh.74.tMCK.CAPN3), левая ТА	Продолжи-тельность обработки	Возраст в конечной точке
<b>CAPN3-КО</b>	СТХ+ AAV. CAPN3	16					
Молодые		8	6 недель/i.m./30 мкл	8 недель	$1 \times 10^{11}$ в. г. в 30 мкл PBS, i.m.	8 недель	16 недель
Старые		8	22 недели/i.m./30 мкл	24 недели	$1 \times 10^{11}$ в. г. в 30 мкл PBS, i.m.	8 недель	32 недели
<b>Животные дикого типа</b>	Только СТХ	18					
Молодые		8	6	8	30 мкл	8 недель	16

			недель/i.m./ 30 мкл	недель	PBS		недель
Старые		8	22 недели/i.m./ 30 мкл	24 недели	30 мкл PBS	8 недель	32 недели

[0086] Через восемь недель после инъекции гAAV выполняли исследования конечных точек, описанные в примере 6 ниже, включающие анализ физиологических показателей мышц (формирования силы в ТА и защиты от эксцентрических сокращений), количественный патогистологический анализ мышц, выявление hCAPN3 с помощью qPCR и вестерн-блот-анализ.

### **Пример 6**

#### **Исследования конечных точек**

##### *Формирование силы в ТА и защита от эксцентрических сокращений*

[0087] Протокол оценки функциональных исходов для мышцы ТА осуществляли на мышцах, извлеченных из мышцей [Wein *et al.*, *Nature Medicine*, 20(9):992-1000 (2014)]. Мышцей подвергали анестезии с помощью смеси кетамин/ксилазин. С использованием препаровального микроскопа удаляли кожу задней конечности для обнажения мышцы ТА и надколенника. Дистальное сухожилие ТА иссекали, и с помощью хирургического шва 4-0 завязывали двойной прямой узел вокруг сухожилия как можно ближе к мышце, и сухожилие разрезали. Обнаженную мышцу постоянно смачивали с помощью физиологического раствора. Мышцей затем переносили на нагревательную платформу с контролем температуры и выдерживали при 37 градусах. Колено прикрепляли к платформе с помощью иглы, проведенной через сухожилие надколенника, шов дистального сухожилия ТА - к плечу рычага датчика силы (Auroga Scientific, Орора, Онтарио, Канада), и стопу закрепляли с помощью клейкой ленты. Сокращения мышцы ТА вызывали посредством стимуляции седалищного нерва с помощью биполярных платиновых электродов. После стабилизации мышцы определяли оптимальную длину путем постепенного растяжения мышцы до достижения максимальной силы сокращения. После 3-минутного периода отдыха производили стимуляцию ТА при 50, 100, 150 и 200 Гц, предоставляя 1-минутный период отдыха между стимуляциями, для определения максимальной силы тетанического сокращения. Измеряли длину мышцы. После 5-минутного отдыха проводили оценку восприимчивости мышцы ТА к повреждению, индуцированному сокращением. После 500 мс стимуляции мышца удлинялась на 10% от оптимальной длины. Это включало стимуляцию мышцы при 150 Гц в течение 700 мс. После стимуляции мышца возвращалась к оптимальной длине. Цикл повторяли каждую минуту в общей сложности в течение 10 циклов. Удельную силу рассчитывали посредством деления максимальной силы тетанического сокращения на площадь поперечного сечения мышцы ТА. После эксцентрических сокращений мышцей подвергали эвтаназии, и мышцу ТА иссекали, взвешивали и замораживали для проведения анализа. Анализ данных проводили слепым

методом, но не произвольным образом.

*Анализ сократимости мышц in vivo*

[0088] В ходе данного анализа измеряли совокупную величину крутящего момента, производимого подошвенными мышцами или тыльными мышцами-сгибателями стопы нижней конечности, и его выполняли с помощью прибора для изучения физиологических свойств мышц (Auroga Scientific, Онтарио, Канада). Животное подвергали анестезии с помощью изофлурана. После того, как животное было подвергнуто анестезии, шерсть в области спины и задней конечности удаляли в случае необходимости с помощью машинки для стрижки волос. Если удаление шерсти с помощью машинки для стрижки волос было недостаточным, наносили тонкий слой крема для удаления волос (Nair), и область нанесения тщательно очищали с помощью теплой воды с целью предотвращения неприятных ощущений. Заднюю конечность, предназначенную для проведения измерений, прикрепляли к педали с помощью клейкой ленты. Конечность удерживали в неподвижном состоянии с помощью закругленного зажима. Большеберцовый или малоберцовый компонент седалищного нерва стимулировали с помощью двух стерильных одноразовых монополярных электродов 28 калибра, введенных через кожу и установленных подкожно возле нерва. Температуру мышцы поддерживали с помощью кондуктивной терморегулируемой нагревательной подушки (установленной на 37°C) или источника теплового излучения и отслеживали с помощью датчика температуры.

*Патогистологическое исследование*

[0089] Для гистологического анализа все мышцы и органы заливали в 7% трагакантовую камедь и подвергали быстрому замораживанию в изопентане, охлажденном с помощью жидкого азота. Замороженные срезы (12 мкм) собирали для проведения иммуногистохимического исследования и вестерн-блот-анализа.

*Вестерн-блот-анализ для выявления CAPN3 человека*

[0090] Количественное оценивание белка CAPN3 в образцах мышечной ткани мыши проводили с помощью способа вестерн-блоттинга. Фермент CAPN3 отделялся в ходе электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и мигрировал в виде полосы размером 94 кДа вместе с продуктом аутолиза размером примерно 60 кДа, что выявляли с помощью антитела Novocastra NCL-CALP-12A2 для клинического применения, распознающего N-конец. Кроме того, антитело NCL-CALP-2C4 распознает CAPN3 с этой же молекулярной массой (94 кДа), а также дополнительный фрагмент (30 кДа) в скелетной мышце; и оба эти антитела подходят для выявления белка. Проводили полуколичественное измерение уровней экспрессии белка CAPN3 в образцах от мышей с нокаутом кальпаина после доставки терапевтического вектора rAAV и сравнивали их с показателями контрольных животных, не подвергнутых обработке.

*Количественный гистологический анализ мышц*

[0091] Поперечные срезы мышцы TA и четырехглавой мышцы от животных, обработанных с помощью AAVrh.74.tMCK.CAPN3, по сравнению с контрольными животными, не получавшими инъекции, окрашивали с помощью гематоксилина и эозина,

и производили их фотографические снимки с помощью программного обеспечения Zeiss AxioVision L4 (по 4 произвольных снимка при увеличении 20X на каждый срез от каждого животного). Диаметры, определяющие размер волокон, сравнивали для животных, подвергнутых обработке, и контрольных животных.

#### *Статистический анализ*

[0092] Проводили множественные сравнительные тесты с применением t-критерия Стьюдента или однофакторного ANOVA там, где это было применимо.

#### **Пример 7**

##### **Токсикологические исследования/исследования биораспределения**

[0093] Токсикологические исследования/исследования биораспределения выполняли с использованием установленной эффективной дозы и дозы на один log выше. Токсикологические исследования выполнялись посредством системной (в хвостовую вену) доставки rAAV мышам CAPN3-KO в возрасте 6-8 недель и включали сравнение с нормальными показателями у нормальных мышей C57BL6. В исследование включали когорты по 6-10 мышей, и проводили процедуры полного вскрытия с применением способов, соответствующих GLP.

[0094] Сыворотку крови, собранную из образцов крови, использовали для проведения клинико-биохимического анализа с определением уровней аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, аспаратаминотрансферазы, билирубина (общего и прямого), азота мочевины крови, креатинина, креатинкиназы, глюкозы и общего белка.

[0095] Проводили полное вскрытие, включающее тщательный и систематический осмотр и препарирование внутренних органов и костно-мышечного каркаса животного. Ткани/органы, которые собирали, включали половые железы, головной мозг, селезенку, почки, тощую кишку, ободочную кишку, поджелудочную железу, сердце, легкое, желудок, печень, паховые лимфатические узлы, спинной мозг, икроножную мышцу и четырехглавую мышцу. Ткани/органы для патогистологических исследований собирали и фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (10% NBF), за исключением всех образцов скелетных мышц, которые монтировали в блоках с OCT и подвергали быстрому замораживанию в метилбутане, охлажденном с помощью жидкого азота, для изготовления криосрезов.

#### **Пример 8**

##### **Тестирование биологической активности in vivo после внутримышечной инъекции**

[0096] Тестирование биологической активности in vivo выполняли после внутримышечной (IM) инъекции AAVrh.74.tMCK.CAPN3 (1E11 в. г.) в переднюю большеберцовую мышцу (TA) мышей CAPN3-KO (n=3), как описано выше в примере 5.

[0097] Через 4 недели после введения доставку гена анализировали с помощью анализов методами количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) и вестерн-блоттинга. Для проведения вестерн-блот-анализа образцы, соответствующие 50 мкг

цельномышечных экстрактов белков, разделяли в 3-8% акриламидном геле с трис-ацетатным буфером и SDS и переносили на мембрану из PVDF. Иммунологический анализ проводили с использованием моноклонального антитела, вырабатываемого против синтетического пептида, содержащего аминокислоты 1-19 последовательности кальпаина-3 человека (Leica), и антитела к мышечноспецифическому актину (Leica) в качестве контроля нагрузки. На фиг. 3А продемонстрировано наличие белка кальпаина-3 размером 94 кДа в мышце ТА после внутримышечной инъекции. Анализ методом RT-qPCR демонстрировал возвращение относительных уровней экспрессии гена кальпаина-3 человека к нормализованным уровням по сравнению с мышами WT через 4 недели после переноса гена (см. фиг. 3В). GAPDH мыши использовали в качестве эталонного гена, и C57BL/6 WT использовали для калибровки данных RT-qPCR.

[0098] Кроме того, выполняли количественный патогистологический анализ после внутримышечного введения. Как показано, диаметр мышечного волокна ТА у мышей CAPN3-КО, подвергнутых обработке, сравнивали с таковым для контрольной мышцы, не подвергнутой обработке (ТА, в которую инъецировали раствор Рингера с лактатом). Средний размер волокна для медленно сокращающихся окислительных (STO, темные), быстро сокращающихся окислительных (FTO, промежуточные) и быстро сокращающихся гликолитических (FTG, светлые) волокон в мышце ТА, в которую инъецировали AAV.hCAPN3, выглядел нормализованным до значений для WT. Количественное оценивание размера волокон в зависимости от типа представлено в таблице 4 и демонстрирует увеличение при обработке.

**Таблица 4**

	WT (z18-14)		Подвергнутые обработке (z18-11)		Не подвергнутые обработке (z18-22 L)	
	Количество	Диаметр (мкм)	Количество	Диаметр (мкм)	Количество	Диаметр (мкм)
STO	246	28,06 ± 0,27	142	28,89 ± 0,32	240	25,57 ± 0,27
FTO	63	36,65 ± 0,53	86	36,71 ± 0,58	110	32,19 ± 0,48
FTG	82	42,55 ± 0,53	86	43,68 ± 0,66	128	35,49 ± 0,50
Все типы волокон	391	32,45 ± 0,38	314	35,08 ± 0,45	478	29,75 ± 0,30

[0099] Вкратце, тестирование биологической активности *in vivo* после IM-инъекции вектора (1E11 в. г.) в переднюю большеберцовую мышцу (ТА) у мышей CAPN3-КО (n=2) демонстрировало, что через 4 недели после доставки гена 1) анализы методами RT-qPCR и вестерн-блоттинга демонстрировали экспрессию транскриптов CAPN3 и полноразмерного белка кальпаина-3 размером 94 кДа и 2) гистологический анализ демонстрировал увеличение диаметра мышечных волокон ТА по сравнению с контрольной мышцей (ТА, в которую инъецировали раствор Рингера с лактатом).

### Пример 9

#### Тестирование биологической активности *in vivo* после системной инъекции

[00100] Тестирование биологической активности *in vivo* выполняли после системной инъекции AAVrh.74.tMCK.CAPN3 (3E12 в. г. или 6E12 в. г.) в хвостовую вену мышей CAPN3-КО. Когорта CAPN3-КО, получавшая низкую дозу (n=5; мышей обозначали как Z18-13, Z18-15, Z18-16, Z18-17, Z18-18), получала 3E12 в. г. в 300 мкл раствора Рингера с лактатом. Через 4 недели после инъекции гена мышей оценивали в отношении усталости при беге с помощью теста бега до изнеможения на тредбане и затем подвергали эвтаназии для сбора тканей. Мышцы верхних и нижних конечностей (ТА, икроножную (GAS), четырехглавую, трехглавую), сердце, печень, селезенку, легкое, яичники и семенники удаляли, и образцы тканей замораживали в изопентане и охлаждали в жидком азоте.

[00101] Оценивали экспрессию CAPN3 в мышцах ТА с помощью RT-qPCR. При низкой дозе 3E12 в. г. уровни экспрессии мРНК CAPN3 были низкими, как наблюдалось по высоким значениям  $CT > 27$ . Вестерн-блот-анализ не демонстрировал выявляемые полосы соответствующего белка. Несмотря на то, что при низкой дозе в данной ткани были получены данные о низкой экспрессии, при системном введении 3E12 в. г. демонстрировались как функциональные, так и гистологические благоприятные эффекты.

[00102] Следовательно, производили системное введение более высокой дозы (6E12 в. г.) с целью исследования возможности выявления экспрессии белка при более высокой дозе доставляемого вектора. Когорта мышей CAPN3-КО, получавшая высокую дозу (мышей обозначали как Z18-20, Z18-21, Z18-23 и Z18-24), получала 6E12 в. г. вектора AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3 (что в два раза превышает дозу, используемую для когорты, получавшей низкую дозу, посредством системной инъекции в хвостовую вену) и подвергалась эвтаназии через 4 недели после инъекции. RT-qPCR демонстрировала переменные уровни экспрессии CAPN3 в четырехглавой мышце, трехглавой мышце, GAS, ТА и сердечной мышце.

[00103] Для определения относительной экспрессии мРНК CAPN3 собирали образцы мышечной ткани от мышей CAPN3-КО, подвергнутых обработке с помощью вектора tMCK.hCAPN3 в дозе 3E12 в. г. (когорта 1, получавшая низкую дозу) и 6E12 в. г. (когорта 2, получавшая высокую дозу). Общую РНК выделяли из обеих когорт, и с помощью qPCR анализировали CAPN3 в сравнении с GAPDH мышцы наряду с полученными ранее образцами из когорты, получавшей вектор посредством ИМ-инъекции (1E11 в. г.; см. выше в примере 8).

[00104] Относительную экспрессию CAPN3 определяли с помощью способа, приведенного ниже:

$$CT = CT_{CAPN3} - CT_{mGAPDH}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta CT_{\text{калибратор}^*}$$

$$\text{Относительная экспрессия CAPN3} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Относительная экспрессия CAPN3 в каждой ткани и исходное значение CT показаны в таблице 5 ниже и на фигуре 5. В таблице 5 представлены данные для ИМ-доставки (мышцы

№№ Z18-11 и Z18-12) и системной доставки.

Таблица 5. RT-PCR для CAPN3

№ мыши	Ткань	Генотип	Доза для обработки и (DRAP на мышь)	Значение СТ				ΔСТ	ΔΔСТ	2 <sup>-ΔΔСТ</sup>
				CAPN3		mGAPDH				
Z18-14*	ТА	WT	0	22,437	22,456	15,234	15,274	7,193	0,000	1,0003
Z18-19	ТА	CAPN3-КО	0	35,259	32,705	15,159	15,176	18,814	11,621	0,0003
Z18-11	ТА		1E11	24,338	24,217	15,800	15,835	8,460	1,267	0,4155
Z18-12	ТА		21,030	21,104	14,906	15,058	6,085	-1,108	2,1548	
Z18-13	ТА		3E12	32,376	32,430	15,236	15,203	17,183	9,990	0,0010
Z18-15	ТА			27,407	27,443	14,510	14,520	12,910	5,717	0,0190
Z18-16	ТА			28,609	28,333	15,229	15,259	13,227	6,034	0,0153
Z18-17	ТА			28,675	28,670	14,997	15,005	13,671	6,478	0,0112
Z18-18	ТА			27,869	28,128	14,522	14,544	13,466	6,273	0,0129
Z18-20	Икроножная		6E12	22,271	22,439	15,939	15,974	6,398	-0,795	1,7347
	Сердечная			21,996	22,051	15,267	15,315	6,732	-0,461	1,3762
	Четырехглавая	21,008		21,202	15,203	15,407	5,800	-1,393	2,6262	
	ТА	23,806		24,173	16,169	16,385	7,713	0,520	0,6975	
	Трехглавая	24,083		24,361	15,978	16,097	8,185	0,992	0,5027	
Z18-21	Икроножная	25,330		25,221	15,461	15,462	9,814	2,621	0,1625	
	Сердечная	25,024		24,819	15,032	15,097	9,857	2,664	0,1577	
	Четырехглавая	26,278		26,108	15,285	15,370	10,866	3,673	0,0784	
	ТА	26,649		26,697	15,017	15,010	11,659	4,466	0,0452	
	Трехглавая	27,040		27,134	15,321	15,343	11,755	4,562	0,0423	



Z18-23	Икроножная			24,150	24,144	16,225	16,117	7,976	0,783	0,5812
	Сердечная			22,799	22,495	14,593	14,502	8,099	0,906	0,5335
	Четырехглавая			24,248	24,076	16,511	16,504	7,655	0,462	0,7262
	ГА			25,554	25,338	16,124	16,054	9,357	2,164	0,2231
	Трехглавая			24,396	24,383	15,363	15,277	9,070	1,877	0,2723
Z18-24	Икроножная			24,444	24,165	18,083	18,036	6,245	-0,948	1,9297
	Сердечная			22,769	22,425	15,100	15,077	7,508	0,315	0,8037
	Четырехглавая			22,754	22,521	15,637	15,672	6,983	-0,210	1,1568
	ГА			23,491	23,555	15,979	15,974	7,547	0,354	0,7826
	Трехглавая			24,554	24,403	16,370	16,329	8,128	0,935	0,5229
Z18-22	Икроножная		0	31,878	31,962	15,433	15,527	16,440	9,247	0,0016
	Сердечная			31,407	32,964	16,006	15,972	16,197	9,004	0,0019
	Четырехглавая			32,332	33,464	16,528	16,468	16,400	9,207	0,0017
	ГА			35,584	33,917	16,451	16,372	18,339	11,146	0,0004
	Трехглавая			33,615	32,786	15,742	15,628	17,516	10,323	0,0008
Человеческая ткань	Мышца			23,547	23,539	37,743	38,262			
рAAV.tM СК.hCAP N3	1 пг/мкл			16,328	16,413	н. о.	38,302			

---

\* Калибратор

---

[00105] В целом, экспрессия мРНК CAPN3 в мышце CAPN3-КО после системной доставки характеризовалась вариабельностью, специфичной для животного и типа ткани, и более низкой относительной экспрессией по сравнению с IM-доставкой в дозе 1E11 в. г. (< 1% от наблюдаемой при IM-доставке); что было в особенной степени справедливо для когорты, получавшей низкую дозу 3E12. Соответственно, уровень полноразмерного белка размером 94 кДа находился ниже порога выявления для вестерн-блоттинга. Однако после системной инъекции системной дозы 6E12 в. г. в когорте, получавшей высокую дозу, проявлялись устойчивая экспрессия гена и значительные количества полноразмерного белка кальпаина-3.

**Пример 10**
**Оценка системной доставки гена AAVrh74.tMCK.hCAPN3**

[00106] Эффективность переноса гена оценивали с помощью qPCR посредством подсчета числа копий векторных геномов в образцах тканей мышцей CAPN3-КО после системной доставки AAVrh74.tMCK.hCAPN3 в дозе 6E12 в. г. Определяли нагрузку векторными геномами в скелетных мышцах верхней и нижней конечностей (четырёхглавой, ТА, икроножной, трехглавой), сердце и печени. Геномную ДНК выделяли из замороженных образцов тканей. Анализ методом qPCR проводили на ABI 7500 (Applied Biosystems) с использованием следующего набора праймеров: 5'-CGGAGAGCAACTGCATAAG-3' (прямой; SEQ ID NO: 8); 5'-GGCTGATGATGGCTGAATAG-3' (обратный; SEQ ID NO: 9). Пара праймеров амплифицирует исключительно продукт из 5'-концевой области ORF hCAPN3 и нижерасположенной области, уникальной для вектора экспрессии, охватывающей части интронного элемента. Конечные результаты приведены в виде среднего числа копий вектора AAVrh74 на микрограмм геномной ДНК.

[00107] Как показано на фигуре 6, наиболее высокое число копий векторных геномов присутствовало в печени после системной доставки вектора. Распределение векторных геномов было вариабельным в зависимости от группы мышц. В целом более высокие значения наблюдались для четырёхглавой мышцы и сердечной ткани по сравнению с другими мышцами. Отмечалась также вариабельность между экспериментами; как в случае с мышью № Z18-21, которая демонстрировала относительно более низкое число копий во всех группах мышц по сравнению с другими 3 мышцами.

[00108] У мышцей CAPN3-КО, подвергнутых обработке путем системного введения 3E12 в. г., наблюдалось улучшение как функциональных, так и гистологических признаков, однако в изолятах общей РНК с помощью RT-qPCR выявлялись лишь низкие уровни экспрессии мышечного кальпаина-3, и полноразмерный белок размером 94 кДа для определенной мышечной ткани было невозможно выявить с помощью вестерн-блоттинга (см. фиг. 3А). Однако после введения системной дозы 6E12 в. г. проявлялись устойчивая экспрессия гена и значительные количества полноразмерного белка кальпаина-3 (см. фиг. 3В). Данные демонстрируют, что экспрессия гена кальпаина-3 возвращалась к

нормализованным уровням по сравнению с мышами WT через 4 недели после переноса гена в частицах AAVrh74.tMCK.hCAPN3. GAPDH мыши использовали в качестве эталонного гена, а C57BL/6 WT - для калибровки данных RT-qPCR.

*Патогистологическое исследование*

[00109] Как обсуждалось выше, наблюдалась тенденция к повышению эффективности через 4 недели после инъекции. Значимое увеличение размера волокон наблюдалось в мышце TA от мышей CAPN3-KO после системной доставки AAVrh.74.tMCK.hCAPN3 через 4 недели после инъекции в обеих когортах (3E12 и 6E12). Как показано на фигуре 7, общий диаметр волокна значительно увеличивался в обеих когортах, подвергнутых обработке, по сравнению с соответствующими КО-животными, не подвергнутыми обработке ( $p < 0,00001$ ). Обработка приводила к нормализации размера волокон, и дозозависимые различия между когортами обработки не наблюдались ( $p=0,78058$ ). В таблице 6 представлены размеры мышечных волокон для мышей дикого типа и мышей CAPN3-KO после системной генной терапии с помощью AAV.hCAPN3 в дозах 3E12 и 6E12 в. г.

**Таблица 6**

	WT (n=3)		6E12 CAPN3 (n=3)		3E12 CAPN3 (n=4)		KO (n=4)	
	Количество	Диаметр (мкм)	Количество	Диаметр (мкм)	Количество	Диаметр (мкм)	Количество	Диаметр (мкм)
STO	532	30,0 ± 0,6	441	31,7 ± 0,8	464	30,7 ± 1,2	858	27,2 ± 0,8
FTO	278	40,7 ± 1,1	345	38,8 ± 1,1	447	40,8 ± 1,4	364	35,4 ± 1,1
FTG	275	46,1 ± 1,3	226	45,8 ± 1,4	403	44,1 ± 1,6	455	39,7 ± 1,2
Все типы волокон	1085	38,9 ± 1,8	1012	38,8 ± 2,0	1314	38,5 ± 2,4	1677	34,1 ± 1,8

[00110] Патогистологические свидетельства кардиотоксичности после системной инъекции вектора AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3 через 4 недели не наблюдались ни в одной из когорт. В сердечной ткани обнаруживались переменные количества вируса, однако полосы белка в сердечной ткани не выявлялись с помощью вестерн-блоттинга ни в одной из когорт.

*Исследование функциональных свойств: тест бега до изнеможения*

[00111] Мышей приучали к тредбану (Columbus Instruments) посредством 15-минутного забега со скоростью 10 м/мин. один раз в день на протяжении 3 дней до получения данных для теста бега до изнеможения. Согласно используемому протоколу требовалось нахождение мышей на тредбане, установленном под наклоном в 15 градусов. Скорость движения тредбана при включении составляла 1 м/мин., и скорость увеличивали на 1 м каждую минуту до изнеможения мыши. Изнеможение определяли, если мышь сидела на площадке для отдыха в течение по меньшей мере 15 секунд. Регистрировали время, скорость и расстояние, преодолеваемое до наступления изнеможения.

[00112] На фигуре 8А представлены данные теста бега до изнеможения для когорты, получавшей низкую дозу, которая получала 3E12 в. г. AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3, и когорты 2, получавшей высокую дозу, которая получала 6E12 в. г. AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3, согласно оценке через 4 недели после системного введения. Мыши CAPN3-КО, подвергнутые обработке, в обеих когортах показали лучшие результаты в тесте бега до изнеможения по сравнению с соответствующими животными, не подвергнутыми обработке. Не наблюдались выраженные дозозависимые различия при выполнении теста бега до изнеможения или статистически значимые различия в диаметре мышечных волокон между когортами, получавшими низкую или высокую дозу.

[00113] Мышей из когорты 2, получавшей высокую дозу (n=16), подвергали дополнительному анализу через 20-24 недели после введения 6E12 в. г. AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3. Как показано на фигуре 8В, мыши CAPN3-КО, подвергнутые обработке, продолжали показывать лучшие результаты в тесте бега до изнеможения по сравнению с соответствующими животными, не подвергнутыми обработке (p < 0,00001).

**Пример 11**

**Оценка кардиотоксичности после системной инъекции вектора AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3**

[00114] После того, как мышей из когорт подвергали эвтаназии через 4 недели после инъекции, собирали образцы сыворотки крови и органов. Когорта 1 CAPN3-КО, получавшая низкую дозу (n=5), получала вектор AAVrh.74.tMCK.hCAPN3 в дозе 3E12 в. г. в 300 мкл раствора Рингера с лактатом посредством инъекции в хвостовую вену. Когорта 2 мышей CAPN3-КО, получавшая высокую дозу, получала вектор AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3 в дозе 6E12 в. г. через хвостовую вену, и обе когорты подвергали эвтаназии через 4 недели после инъекции. Исследовали два среза через верхушку сердца, поверхностные и глубокие области желудочков. В срезах тканей не обнаруживали признаков воспаления, некроза или регенерации, что указывало на отсутствие наблюдаемых токсических эффектов в отношении сердечной мышцы после системного введения вектора AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3 в двух различных дозах через 4 недели после инъекции. Мыши №№ Z18-19 и Z18-22 (получавшие инъекцию раствора Рингера с лактатом/не подвергнутые обработке) служили в качестве контрольных КО-животных. На фигуре 9 представлены свежзамороженные срезы сердца, окрашенные с помощью H&E. Признаки некроза,

регенерации или воспаления мышечных волокон не наблюдались. Несмотря на то, что в сердечной ткани присутствовали переменные количества вируса, полосы белка не выявлялись с помощью вестерн-блоттинга ни в одной из когорт. На фигуре 10 представлены результаты вестерн-блот-анализа, которые демонстрируют, что уровень полноразмерного белка кальпаина-3 находится ниже порога выявления в тканях сердца после трансдукции.

### **Пример 12**

#### **Анализ физиологических показателей *in vivo***

[00115] Оценку физиологических показателей выполняли после ИМ или системного введения вектора AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3. Во время проведения оценки физиологических показателей *in vivo* мышей подвергали анестезии путем ингаляции изофлурана. После того, как животное было подвергнуто анестезии, шерсть в области спины и задней конечности удаляли в случае необходимости с помощью машинки для стрижки волос. Если удаление шерсти с помощью машинки для стрижки волос было недостаточным, наносили тонкий слой крема для удаления волос. Во время проведения физиологических измерений силы *in vivo* крутящий момент для задней конечности измеряли с помощью педали для неинвазивного измерения силы, соединенной с двигателем детектора силы (Auroga Scientific, Канада), после сверхмаксимальных стимуляций седалищного нерва. Заднюю конечность, предназначенную для проведения измерений, прикрепляли к педали с помощью клейкой ленты. Конечность удерживали в неподвижном состоянии с помощью закругленного зажима. Большеберцовый или малоберцовый компонент седалищного нерва стимулировали с помощью двух стерильных одноразовых монополярных электродов 28 калибра, установленных подкожно возле нерва. Температуру мышцы поддерживали с помощью кондуктивной терморегулируемой нагревательной пластины (установленной на 37°C) или источника теплового излучения и отслеживали с помощью инфракрасного датчика температуры.

[00116] Хотя в настоящем изобретении предусмотрены конкретные варианты осуществления, следует понимать, что специалистам в данной области придут на ум их видоизменения и модификации. Соответственно, на изобретение должны быть наложены только те ограничения, которые указаны в формуле изобретения.

[00117] Все документы, ссылки на которые присутствуют в настоящей заявке, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий полинуклеотид, который содержит первый инвертированный концевой повтор (ITR) AAV, промотор, нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, имеющий активность кальпаина-3 (CAPN3), и второй ITR AAV.

2. rAAV по п.1, где нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, имеющий активность CAPN3, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 2.

3. rAAV по п.1 или п.2, где нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, имеющий активность CAPN3, на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 2.

4. rAAV по любому из пп. 1-3, где нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, имеющий активность CAPN3, содержит последовательность под SEQ ID NO: 2.

5. rAAV по любому из пп. 1-4, где белок, имеющий активность CAPN3, содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 7.

6. rAAV по любому из пп. 1-4, где белок, имеющий активность CAPN3, содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 7.

7. rAAV по любому из пп. 1-4, где белок, имеющий активность CAPN3, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

8. rAAV по любому из пп. 1-7, где полинуклеотид содержит последовательность, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 1.

9. rAAV по любому из пп. 1-7, где полинуклеотид содержит последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 1.

10. rAAV по любому из пп. 1-7, где полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

11. rAAV по любому из пп. 1-10, где промотор представляет собой промотор, специфичный для мышц.

12. rAAV по п.11, где промотор, специфичный для мышц, содержит один или более из элемента гена скелетномышечного актина человека, элемента гена сердечного актина, промотора гена десмина, промотора гена скелетномышечного альфа-актина (ASKA), промотора гена тропонина I (TNNI2), связывающего элемента для миоцит-специфического энхансерного связывающего фактора *mef*, промотора гена мышечной креатинкиназы (MCK), усеченного промотора гена MCK (tMCK), промотора гена тяжелой цепи миозина (MHC), гибридного промотора, представляющего собой энхансер гена тяжелой цепи а-миозина/тандем энхансер-промотор гена MCK (MHCK7), промотора C5-12, энхансерного элемента гена креатинкиназы мышцы, элемента гена тропонина C быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемента гена тропонина C медленно сокращающихся волокон сердечной мышцы, элемента гена тропонина I медленно сокращающихся волокон,

элемента, отвечающего на ядерный фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) (HRE), стероид-индуцируемого элемента и глюкокортикоид-отвечающего элемента (gre).

13. rAAV по п.11, где промотор, специфичный для мышц, представляет собой промотор MCK, промотор tMCK или промотор MNCK7.

14. rAAV по п.11, где промотор, специфичный для мышц, представляет собой усеченный промотор MCK, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3.

15. rAAV по любому из пп. 1-14, где первый и второй инвертированные концевые повторы AAV представляют собой инвертированные концевые повторы AAV2.

16. rAAV по любому из пп. 1-15, где rAAV содержит один или более из капсидных белков AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV-rh.74 и AAV-rh.10.

17. rAAV по п.16, где rAAV содержит капсидный белок rh.74 или капсидный белок AAV9.

18. Композиция, содержащая rAAV по любому из пп. 1-17.

19. Способ лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2A у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества rAAV по любому из пп. 1-17 или композиции по п.18.

20. Способ по п.19, где лечение приводит к одному или более из:

- (a) увеличения диаметра мышечных волокон,
- (b) уменьшения количества мелких дольчатых мышечных волокон,
- (c) уменьшения количества волокон с внутренними ядрами,
- (d) уменьшения содержания эндомизимальной соединительной ткани,
- (e) коррекции мышечной атрофии,
- и (f) увеличения формирования мышечной силы.

21. Способ по п.20, где мышечное волокно включает одно или более из медленно сокращающегося окислительного (STO) мышечного волокна, быстро сокращающегося окислительного (FTO) мышечного волокна и быстро сокращающегося гликолитического (FTG) волокна.

22. Способ по любому из пп. 19-21, где лечение приводит к одному или более из:

(a) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, или 35%, или 40% уменьшения общего количества мышечных волокон на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения;

(b) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон через 4 недели после введения;

(c) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 42% уменьшения количества мышечных волокон STO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения;

(d) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон STO через 4 недели после введения;

(e) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% уменьшения количества мышечных волокон FTO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения;

(f) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% увеличения диаметра мышечных волокон FTO через 4 недели после введения;

(g) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% уменьшения количества мышечных волокон FTG на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; и

(h) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон FTG через 4 недели после введения.

23. Способ по любому из пп. 19-22, где введение осуществляют путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

24. Способ по любому из пп. 19-23, где сердечная мышца субъекта демонстрирует минимальный или низкий уровень белка кальпаина-3, экспрессирующегося из гAAV по любому из пп. 1-17 или композиции по п.18.

25. Композиция для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2A, содержащая терапевтически эффективное количество гAAV по любому из пп. 1-17 или композиции по п.18.

26. Композиция по п.25, где лечение с использованием композиции приводит к одному или более из:

- (a) увеличения диаметра мышечных волокон,
- (b) уменьшения количества мелких дольчатых мышечных волокон,
- (c) уменьшения количества волокон с внутренними ядрами,
- (d) уменьшения содержания эндомиоциальной соединительной ткани,
- (e) коррекции мышечной атрофии, и
- (f) увеличения формирования мышечной силы.

27. Композиция по п.26, где мышечное волокно включает одно или более из медленно сокращающегося окислительного (STO) мышечного волокна, быстро сокращающегося окислительного (FTO) мышечного волокна и быстро сокращающегося гликолитического (FTG) волокна.

28. Композиция по любому из пп. 25-27, где лечение с использованием композиции приводит к одному или более из:

(a) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, или 35%, или 40% уменьшения общего количества мышечных волокон на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения;

(b) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон через 4 недели после введения;

(c) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 42% уменьшения количества мышечных волокон STO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения;

(d) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон STO через 4 недели после введения;

(e) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% уменьшения количества мышечных волокон FTO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения;

(f) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% увеличения диаметра мышечных волокон FTO через 4 недели после введения;



(g) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% уменьшения количества мышечных волокон FTG на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; и

(h) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон FTG через 4 недели после введения.

29. Композиция по любому из пп. 25-28, где композиция составлена для введения путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

30. Композиция по любому из пп. 25-28, где после лечения с использованием композиции сердечная мышца субъекта демонстрирует минимальный или низкий уровень белка кальпаина-3, экспрессирующегося из гAAV по любому из пп. 1-17 или композиции по п.18.

31. Применение терапевтически эффективного количества гAAV по любому из пп. 1-17 или композиции по п.18 для получения лекарственного средства для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2A.

32. Применение по п.31, где лечение с использованием лекарственного средства приводит к одному или более из:

- (a) увеличения диаметра мышечных волокон,
- (b) уменьшения количества мелких дольчатых мышечных волокон,
- (c) уменьшения количества волокон с внутренними ядрами,
- (d) уменьшения содержания эндомизимальной соединительной ткани,
- (e) коррекции мышечной атрофии, и
- (f) увеличения формирования мышечной силы.

33. Применение по п.32, где мышечное волокно включает одно или более из медленно сокращающегося окислительного (STO) мышечного волокна, быстро сокращающегося окислительного (FTO) мышечного волокна и быстро сокращающегося гликолитического (FTG) волокна.

34. Применение по любому из пп. 31-33, где лечение с использованием лекарственного средства приводит к одному или более из:

(a) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, или 35%, или 40% уменьшения общего количества мышечных волокон на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения;

(b) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон через 4 недели после введения;

(c) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 42% уменьшения количества мышечных волокон STO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения;

(d) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон STO через 4 недели после введения;

(e) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% уменьшения количества мышечных волокон FTO на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения;

(f) по меньшей мере 5%, 10%, 15% или 20% увеличения диаметра мышечных волокон FTO через 4 недели после введения;

(g) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% уменьшения количества

мышечных волокон FTG на мм<sup>2</sup> через 4 недели после введения; и

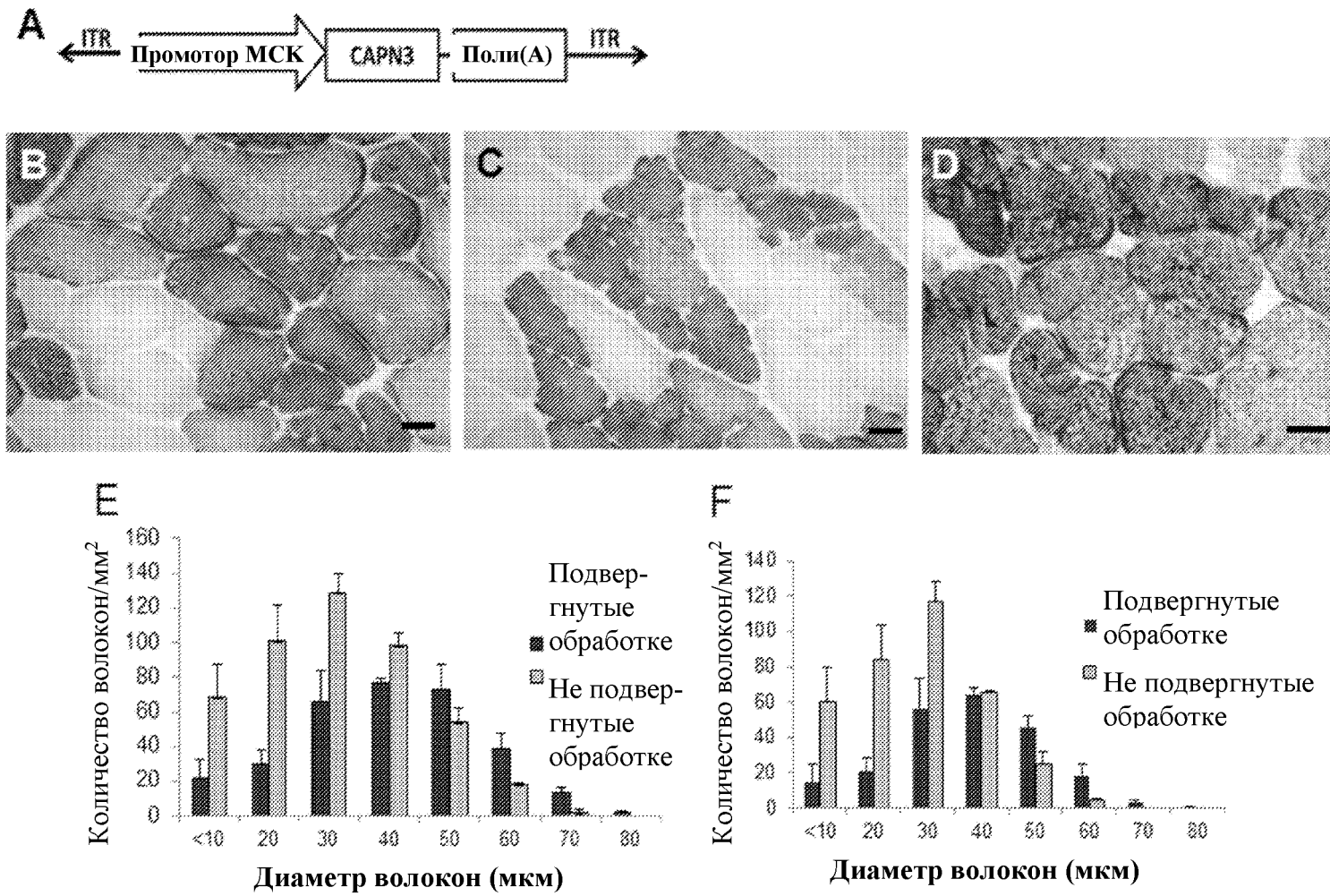
(h) по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или 25% увеличения диаметра мышечных волокон FTG через 4 недели после введения.

35. Применение по любому из пп. 31-34, где лекарственное средство составлено для введения путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

36. Применение по любому из пп. 31-35, где после лечения с использованием лекарственного средства сердечная мышца субъекта демонстрирует минимальный или низкий уровень белка кальпаина-3, экспрессирующегося из rAAV по любому из пп. 1-17 или композиции по п. 18.

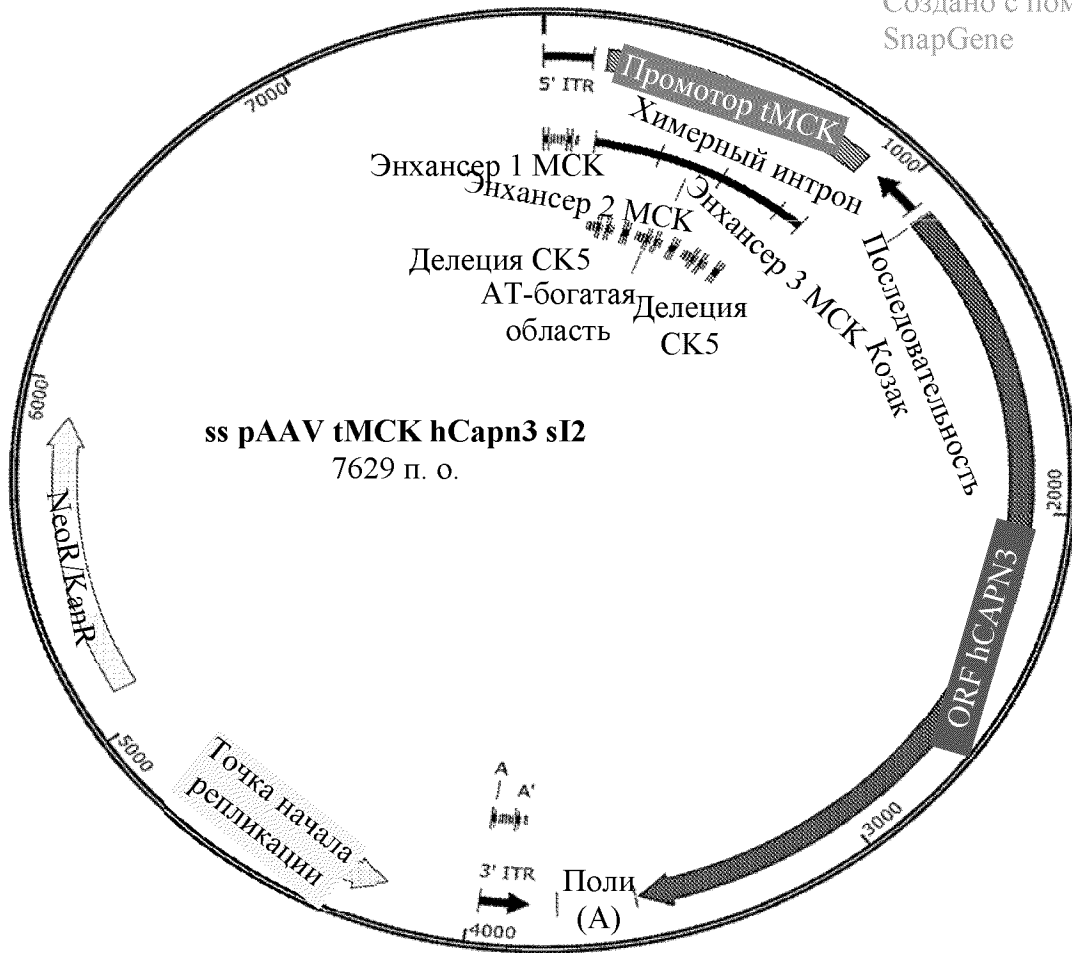
По доверенности

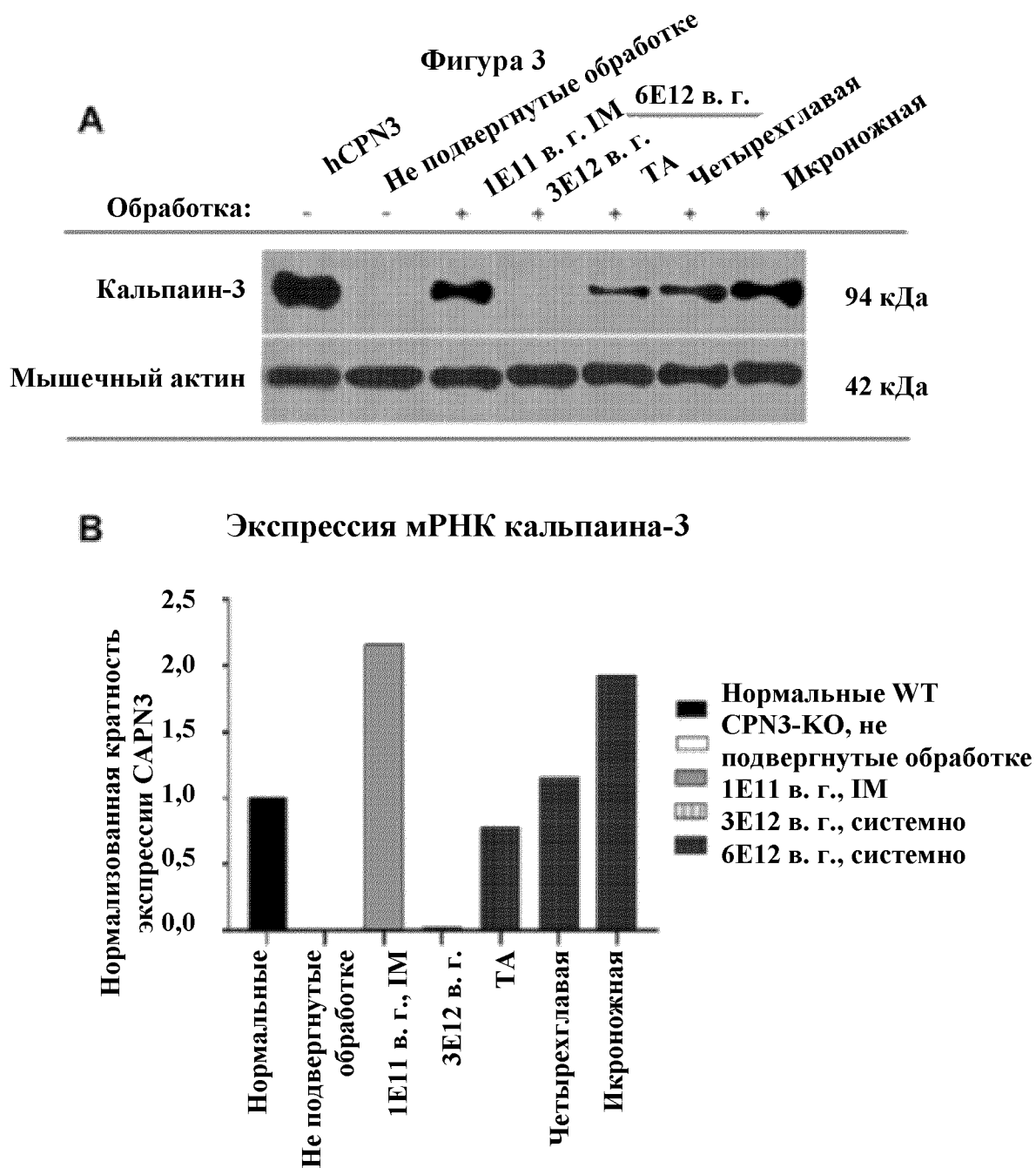
Фигура 1



Фигура 2

Создано с помощью SnapGene

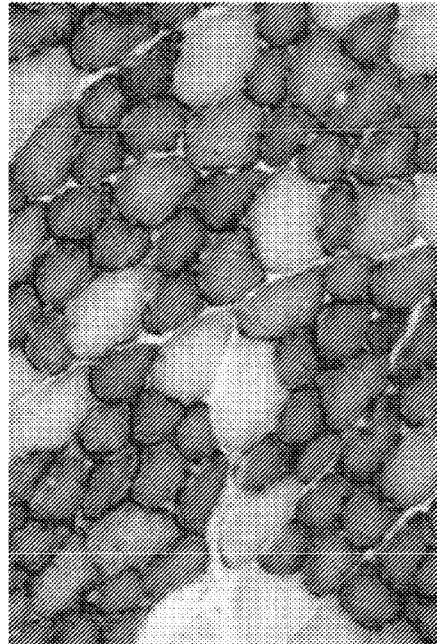




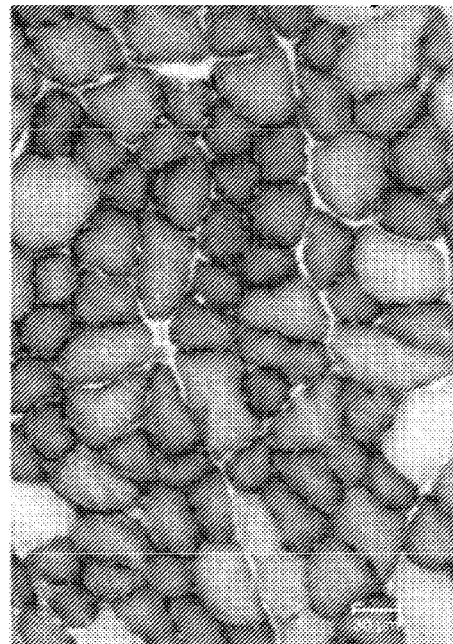
Фигура 4

Получившие инъекцию  
AAV.hCAP3

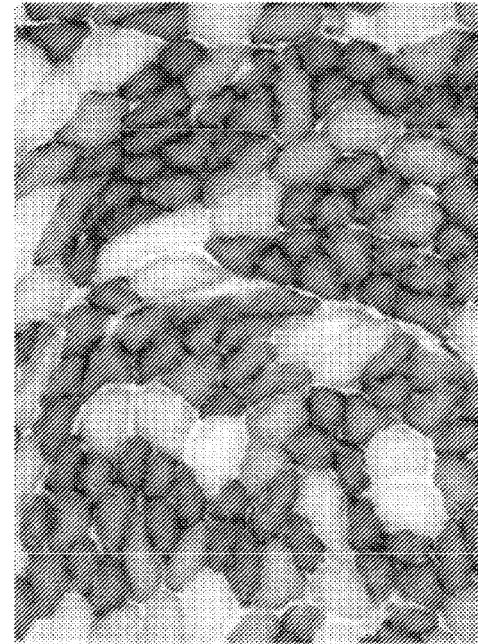
Не подвергнутые  
обработке



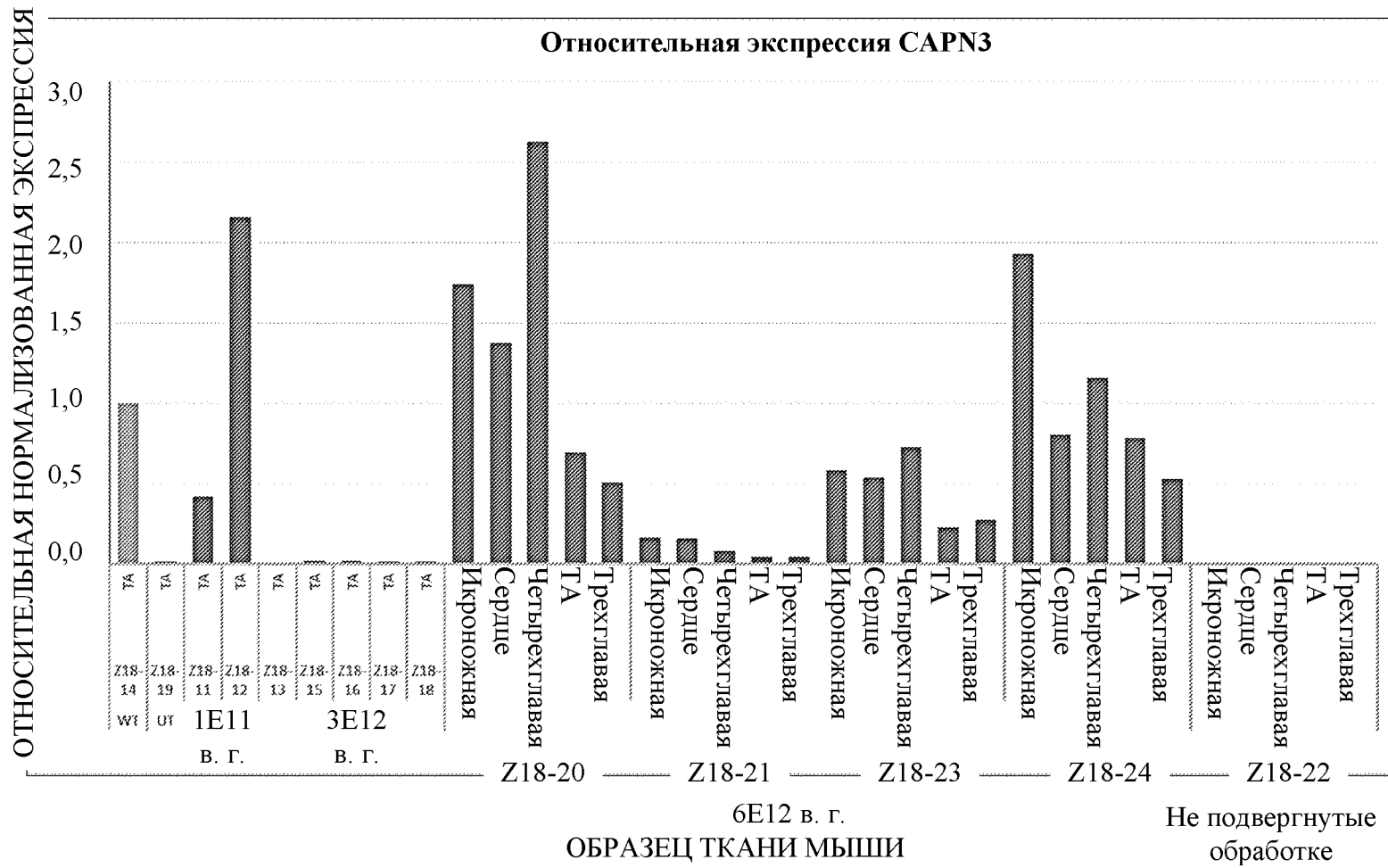
WT



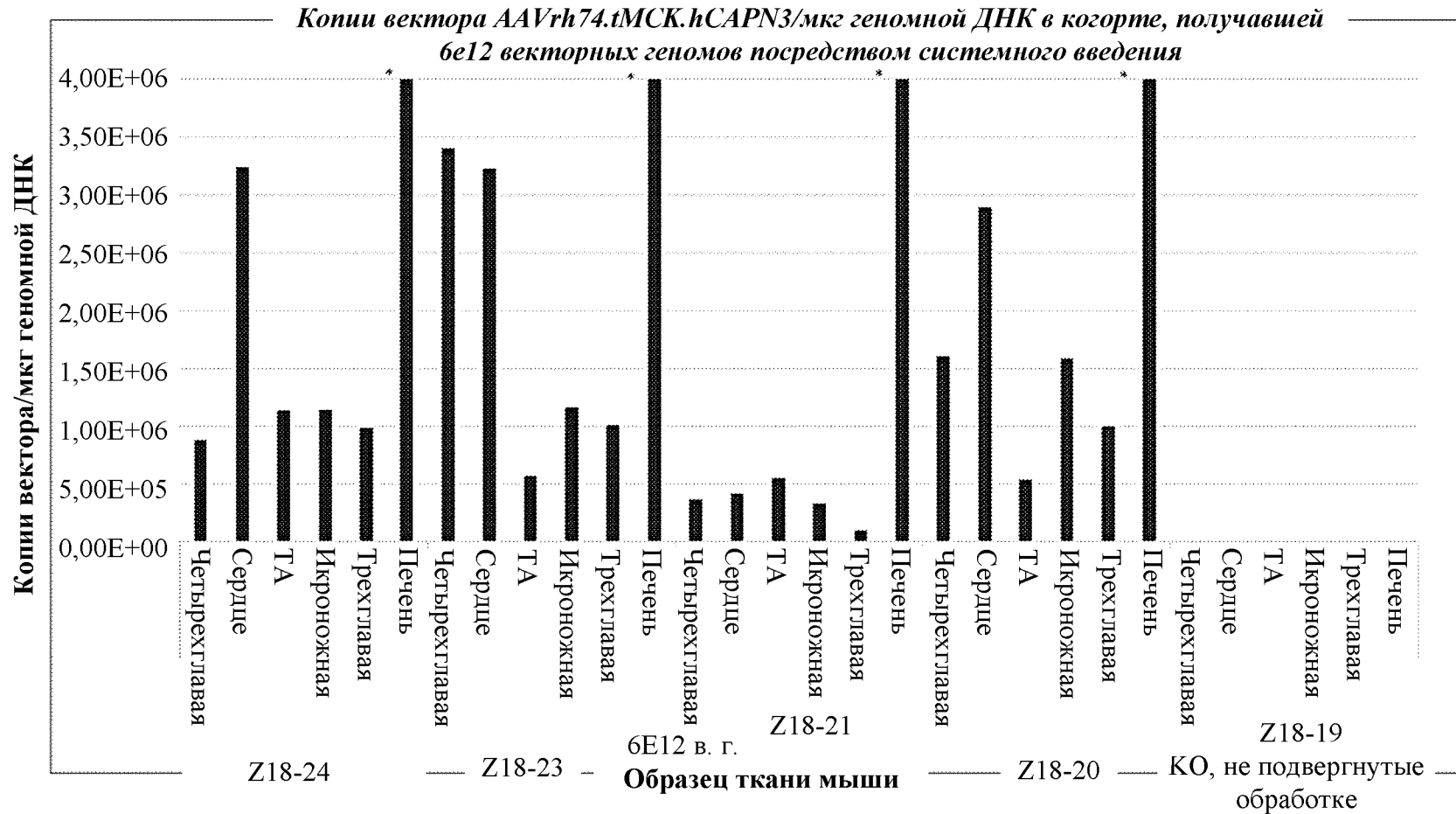
CAPN3-KO



Фигура 5



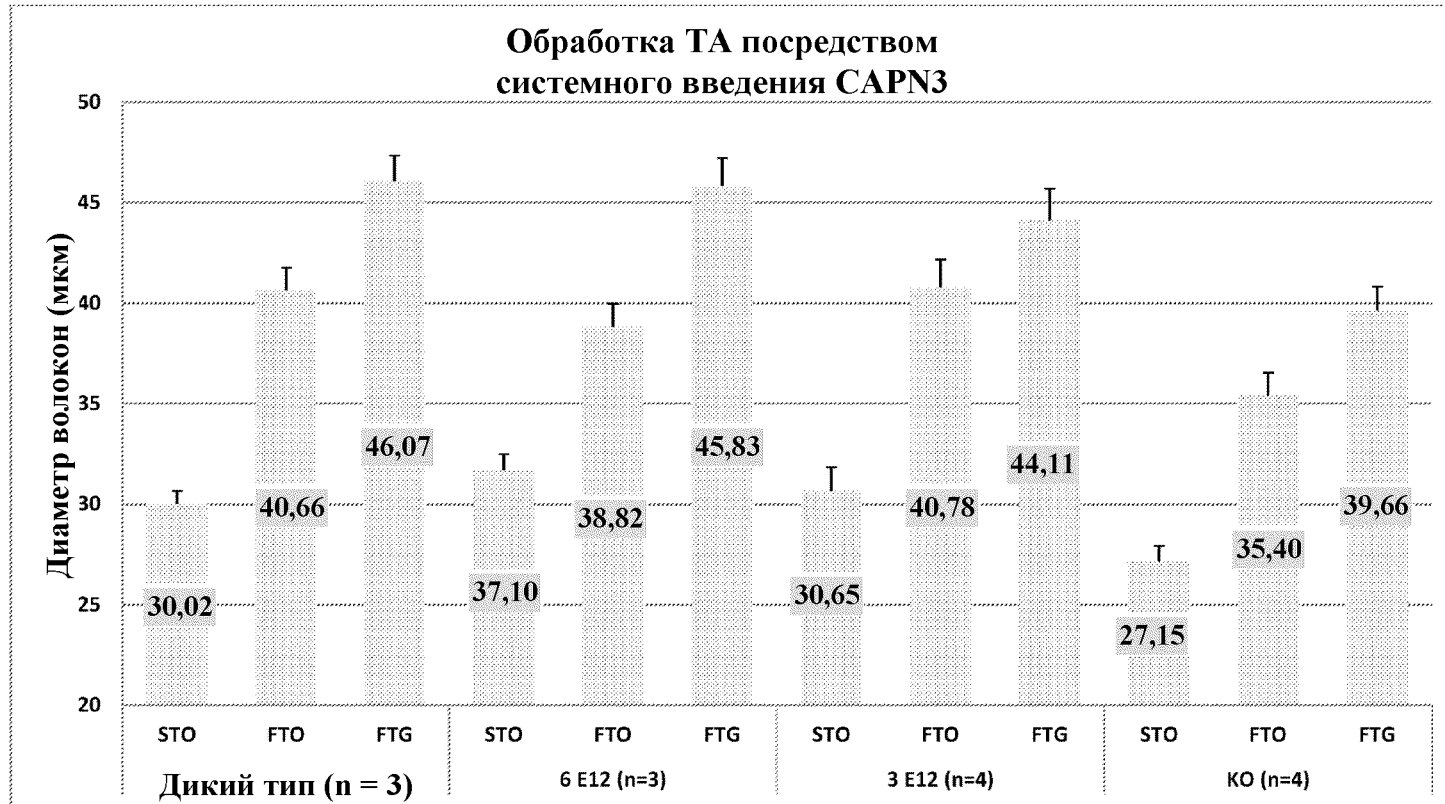
Фигура 6



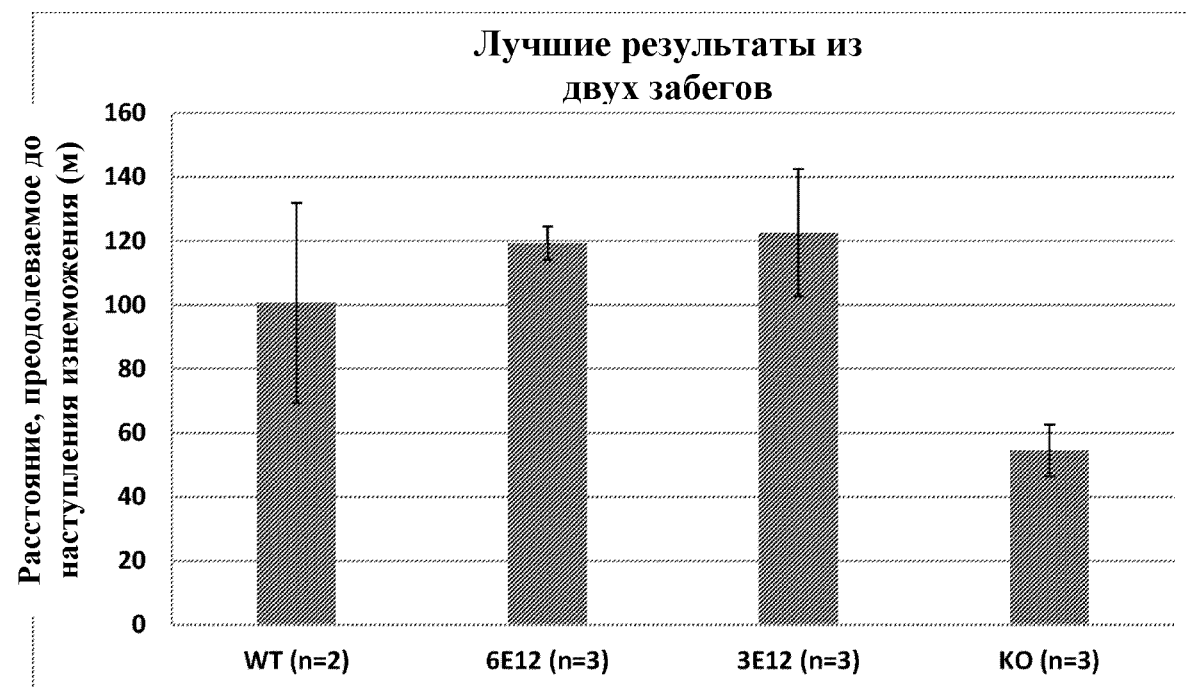
\*Значение числа копий векторных геномов в печени намного выше максимального значения по оси Y. Не показано ввиду большого количества.



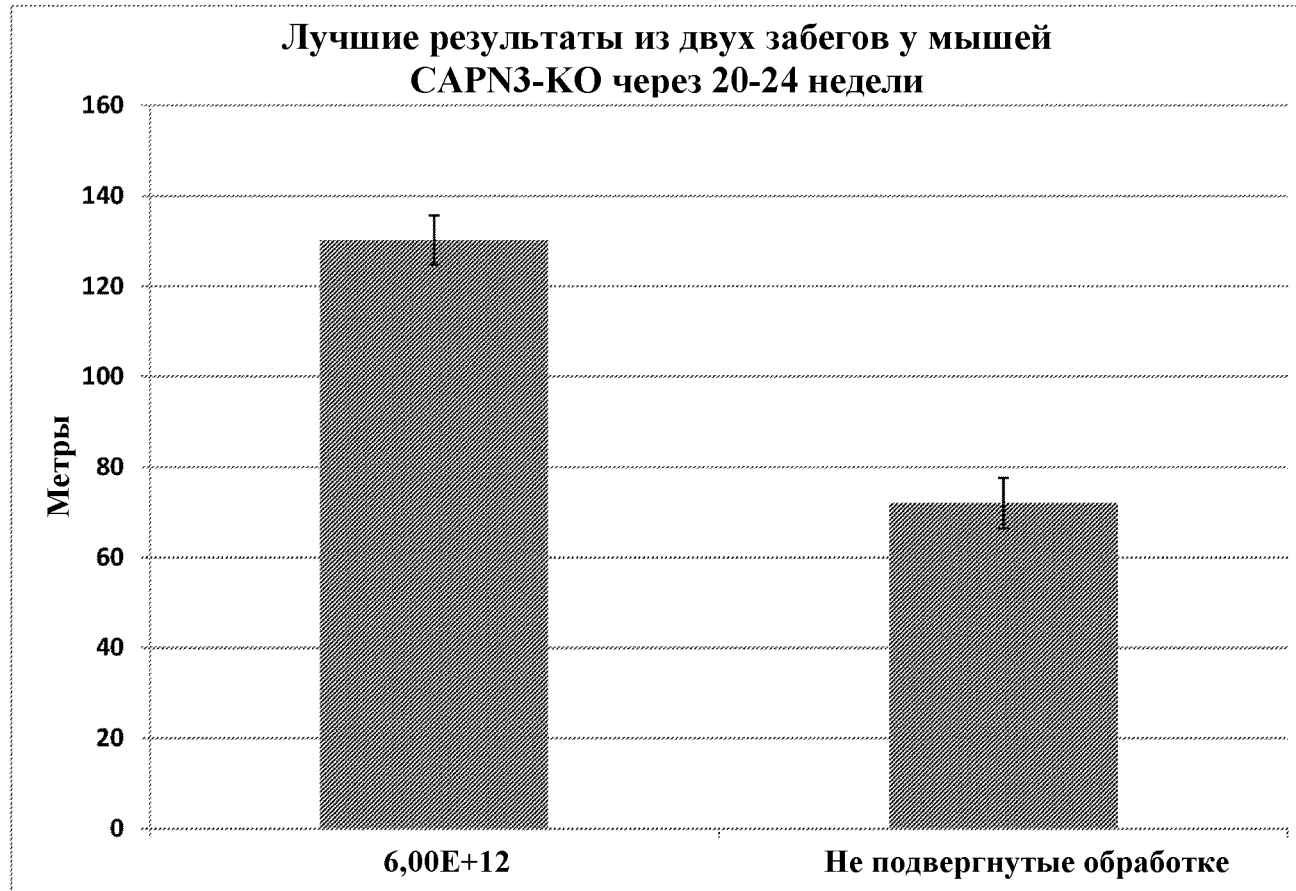
Фигура 7



Фигура 8А

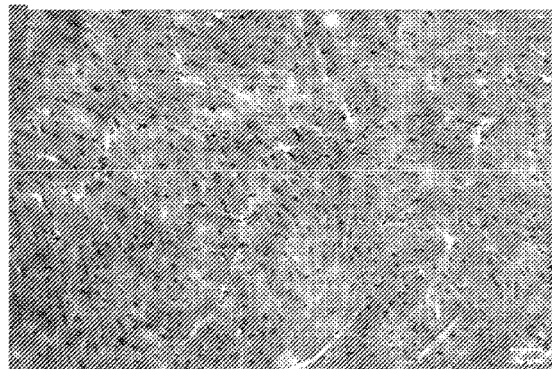


Фигура 8В

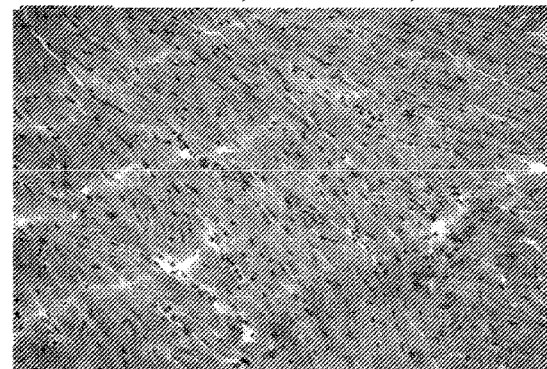


Фигура 9

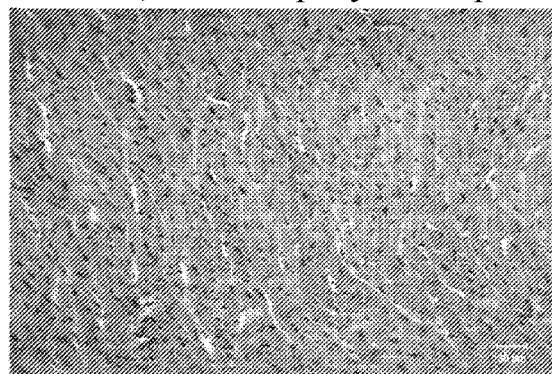
Z18-19, не подвергнутые обработке



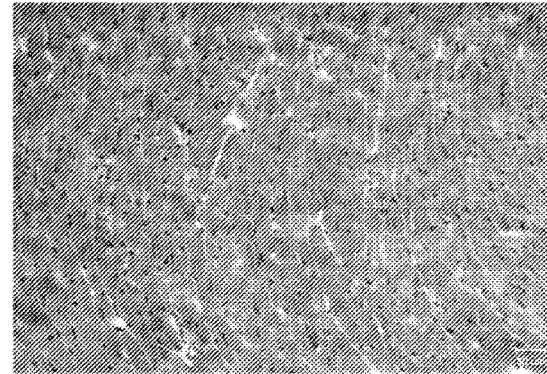
Z18-16, 3E12 в. г., КО



Z18-22, не подвергнутые обработке

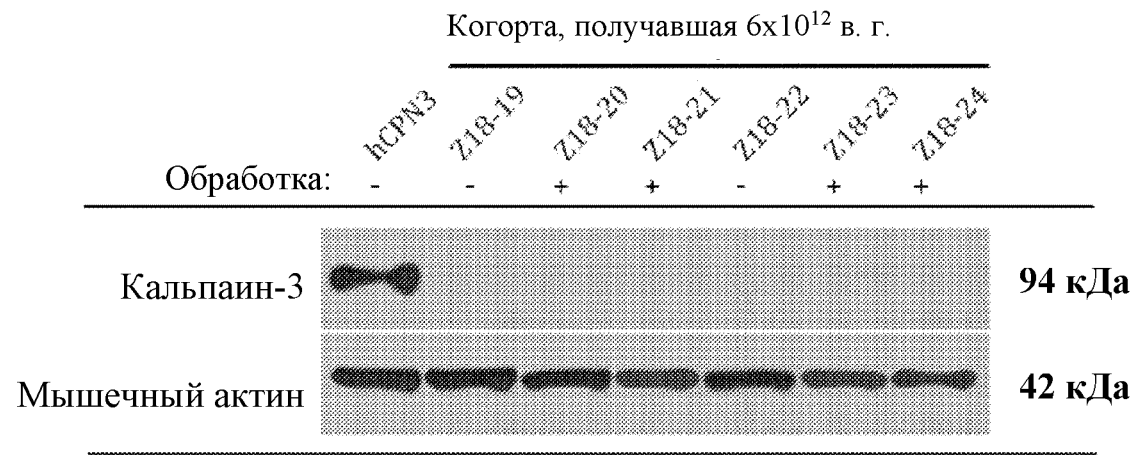


Z18-24, 6xE12 в. г.



Фигура 10

**Оценка экспрессии белка кальпаина-3 в сердце  
после системной доставки гена AAVrh.74tMCK.CAPN3**



11/11

Уровень полноразмерного белка кальпаина-3 находится ниже предела выявления. Мыши CPN3-КО, получавшие системные дозы  $6 \times 10^{12}$  в. г. AAVrh.74tMCK.CAPN3, не демонстрировали выявляемую экспрессию белка кальпаина-3 в сердечной мышце. Положительный контроль (hCPN3) в виде лизата четырехглавой мышцы человека.