

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192346 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.07

(51) Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.02.26

(54) ДОСТАВКА β -САРКОГЛИКАНА С ПОМОЩЬЮ ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ
АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА И ЛЕЧЕНИЕ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

(31) 62/810,917; 62/834,012; 62/858,644;
62/881,901; 62/909,564; 62/910,779

(32) 2019.02.26; 2019.04.15; 2019.06.07;
2019.08.01; 2019.10.02; 2019.10.04

(33) US

(86) PCT/US2020/019892

(87) WO 2020/176614 2020.09.03

(71) Заявитель:
РИСЕРЧ ИНСТИТУТ ЭТ
НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕН'С
ХОСПИТАЛ (US)

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

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение вектора рекомбинантного AAV (rAAV) scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, способы экспрессии гена бета-саркогликана у пациента, фармацевтические композиции, содержащие rAAV, и способы получения rAAV.

A1

202192346

202192346

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570463EA/022

ДОСТАВКА В-САРКОГЛИКАНА С ПОМОЩЬЮ ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА И ЛЕЧЕНИЕ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/810 917, поданной 26 февраля 2019 г., предварительной заявке США № 62/834 012, поданной 15 апреля 2019 г., предварительной заявке США № 62/858 644, поданной 7 июня 2019 г., предварительной заявке США № 62/881 901, поданной 1 августа 2019 г., предварительной заявке США № 62/909 564, поданной 2 октября 2019 г., и предварительной заявке США № 62/910 779, поданной 4 октября 2019 г., все из которых в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ МАТЕРИАЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ, ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0002] Данная заявка содержит, в качестве отдельной части данного изобретения, Перечень последовательностей в машиночитаемой форме, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме и идентифицируется следующим образом: Название файла: 54016_Seqlisting.txt; Размер: 33 466 байт, создан: 12 февраля 2020 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] В данном документе описаны терапевтические векторы, такие как векторы AAV, экспрессирующие β -саркогликан, и способ применения этих векторов для уменьшения и предотвращения фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Тазово-плечевая мышечная дистрофия (LGMD) типа 2E (LGMD2E) представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, возникающее в результате мутаций в гене, кодирующем β -саркогликан (SGCB) и вызывающем потерю функционального белка. LGMD2E является относительно распространенной и тяжелой формой LGMD в Соединенных Штатах Америки, во всем мире сообщается о заболеваемости 1/200 000-1/350 000. (2) Отсутствие β -саркогликана обуславливает прогрессирующую дистрофию с хронической потерей мышечных волокон, воспалением, замещением жира и фиброзом, что приводит к ослаблению силы и функции мышц. (3,4) В комплексе, саркогликаны (α -, β -, γ -, δ -) размером от 35 до 50 кДа, (5) все являются трансмембранными белками, которые обеспечивают стабильность сарколеммы, обеспечивая защиту от механического стресса во время мышечной активности. (3) Потеря β -саркогликана в LGMD2E обычно приводит к различной степени сопутствующей потери других саркогликановых белков, что способствует хрупкости мышечной мембраны, обуславливая потерю миофибрилл. 1 Несмотря на то, что диапазон клинического фенотипа LGMD2E варьируется, диагноз обычно ставится в возрасте до 10 лет, а потеря способности передвигаться наступает к среднему или позднему подростковому возрасту. Пациенты имеют повышенный уровень креатинкиназы (СК) в сыворотке крови,

проксимальную мышечную слабость, затруднения при поднятии с пола, и прогрессирующую потерю способности передвигаться. Поражение сердца встречается в пятидесяти процентах случаев.

[0005] Аденоассоциированный вирус (AAV) является дефективным по репликации парвовирусом, одноцепочечный ДНК-геном которого имеет длину около 4,7 т.п.н., включая два 145-нуклеотидных инвертированных концевых повтора (ITR). Существует множество серотипов AAV. Известны нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV. Например, полный геном AAV-1 представлен в GenBank под номером доступа NC_002077; полный геном AAV-2 представлен в GenBank под номером доступа NC_001401 и в статье Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983); полный геном AAV-3 представлен в GenBank под номером доступа NC_1829; геном AAV-4 представлен в GenBank под номером доступа NC_001829; геном AAV-5 представлен в GenBank под номером доступа AF085716; геном AAV-6 представлен в GenBank под номером доступа NC_001862; по меньшей мере фрагменты геномов AAV-7 и AAV-8 представлены в GenBank под номерами доступа AX753246 и AX753249, соответственно; геном AAV-9 представлен в статье Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 представлен в Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); а также геном AAV-11 представлен в Virology, 330(2): 375-383 (2004). Последовательность генома AAV rh.74 представлена в патенте США № 9 434 928, включенном в данный документ посредством ссылки. Цис-действующие последовательности, управляющие репликацией вирусной ДНК (rep), капсидированием/упаковкой и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в AAV ITR. Три промотора AAV (под названиями p5, p19 и p40 по их относительным положениям на карте) контролируют экспрессию двух открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены rep и cap. Два промотора rep (p5 и p19) в комбинации с дифференциальным сплайсингом одиночного интрона AAV (по нуклеотидам 2107 и 2227) приводят к получению четырех белков rep (rep 78, rep 68, rep 52 и rep 40) из гена rep. Белки rep обладают несколькими ферментативными свойствами, которые в конечном счете отвечают за репликацию вирусного генома. Ген cap экспрессируется из промотора p40 и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативные сайты сплайсинга и неконсенсусные сайты инициации транскрипции отвечают за продукцию трех родственных белков капсида. Одиночный консенсусный сайт полиаденилирования находится в положении 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в публикации Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

[0006] AAV обладает уникальными особенностями, которые делают его привлекательным вектором доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование клеток вирусом AAV в культуре является нецитопатическим, а природная инфекция у людей и других животных является латентной и бессимптомной. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что обеспечивает адресное воздействие на различные типы тканей in vivo. Кроме того, AAV трансформирует

медленно делящиеся и неделящиеся клетки и может присутствовать практически в течение всей жизни этих клеток в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Геном провируса AAV остается инфекционным при клонировании ДНК в плазмиды, что делает возможным конструирование рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV и капсидированием генома, содержатся в ITR генома AAV, приблизительно 4,3 т.п.н. внутренних фрагментов генома (кодирующих белки репликации и структурные белки капсида, гер-сар) можно частично или полностью заменить чужеродной ДНК. Для генерирования векторов AAV, гер и сар белки могут быть предоставлены транс-активными (*in trans*). Еще одна важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно устойчивым вирусом. Этот вирус легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56° С до 65° С в течение нескольких часов), что снижает критичность хранения AAV при низких температурах. AAV можно даже лиофилизировать. Наконец, AAV-инфицированные клетки не являются устойчивыми к суперинфекции.

[0007] Многочисленные исследования продемонстрировали длительную (> 1,5 года) рекомбинантную AAV-опосредованную экспрессию белка в мышцах. См. публикации Clark et al., *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14082-14087 (1996); и Xiao et al., *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996). См. также публикации Chao et al., *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) и Chao et al., *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Кроме того, поскольку мышцы сильно васкуляризованы, рекомбинантная трансдукция AAV приводит к появлению трансгенных продуктов в системном кровообращении после внутримышечной инъекции, как описано в публикации Herzog et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5804-5809 (1997) и Murphy et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13921-13926 (1997). Более того, Lewis et al., *J. Virol*, 76: 8769-8775 (2002) продемонстрировали, что скелетные миофибрилы обладают необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, фолдинга и секреции антител, что указывает на то, что мышцы способны стабильно экспрессировать секретируемые белковые терапевтические средства.

[0008] Подающей надежды формой терапии LGMD2E является доставка генов, опосредованная вирусами, для восстановления белка дикого типа в пораженных мышцах, что способствует восстановлению мышечной функции. Учитывая, что у части пациентов может развиваться кардиомиопатия (8, 9, 10, 13), это необходимо учитывать при длительном лечении этих пациентов. В предыдущих сообщениях мышь *Sgcb-null* была хорошо охарактеризована. Araishi et al. (3) вывели мышей с дефицитом β -саркогликана и сопутствующей недостаточностью всех саркогликанов, а также саркоспана, с минимальным сохранением мерозина, дистрогликанов и дистрофина, воспроизводя при этом клиническую картину, наблюдаемую при LGMD2E. Гистологические изменения в этой животной модели также послужили прототипом для клинического аналога, включая выраженность фиброза скелетных мышц. (14) Dressman et al. (25) инъекционно вводили rAAV2.CMV.SGCB в поперечную мышцу живота. Экспрессия сохранялась в течение 21

месяца, а мышечные волокна оставались защищенными от рецидивирующего некроза. Также было описано применение самокомплементарного AAV для усиления экспрессии трансгена 16, мышечно-специфического промотора для лучшего воздействия на скелетные мышцы (20, 26) и оптимизации гена β -саркогликана человека (hSGCB).

[0009] Функциональное улучшение у пациентов, страдающих LGMD и другими мышечными дистрофиями, требует как восстановления генов, так и уменьшения фиброза. Существует потребность в способах уменьшения фиброза, которые можно сочетать со способами восстановления генов для более эффективного лечения LGMD и других мышечных дистрофий.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] В данном документе описаны векторы для генной терапии, например, AAV, экспрессирующие ген β -саркогликана, и способы доставки β -саркогликана в мышцу для уменьшения и/или предотвращения фиброза; и/или для увеличения мышечной силы, и/или для лечения млекопитающего, страдающего мышечной дистрофией.

[0011] В одном аспекте, в данном документе описан способ лечения мышечной дистрофии у нуждающегося в этом субъекта, включающий этап введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAVrh74.MHCK7.hSGCB нуждающемуся в этом субъекту, при этом rAAV вводят посредством системного пути введения и в дозе от около $1,0 \times 10^{12}$ гв/кг до около $5,0 \times 10^{14}$ гв/кг на основе суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения или от $1,0 \times 10^{13}$ гв/кг до около $1,0 \times 10^{14}$ гв/кг на основе линейаризованной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения; при этом уровень сывороточной креатинкиназы (СК) у субъекта снижается после введения rAAV по сравнению с уровнем сывороточной креатинкиназы до введения rAAV.

[0012] В другом аспекте предлагается способ лечения мышечной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий этап введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, при этом уровень экспрессии гена бета-саркогликана в клетке у указанного субъекта увеличивается после введения rAAV по сравнению с уровнем экспрессии гена бета-саркогликана до введения rAAV; при этом количество положительных по бета-саркогликану волокон в мышечной ткани субъекта увеличивается после введения rAAV по сравнению с количеством положительных по бета-саркогликану волокон до введения rAAV; или при этом двигательная функция улучшается у указанного субъекта по сравнению с двигательной функцией указанного субъекта до введения rAAV, и при этом двигательная функция определяется с помощью теста с ходьбой на дистанцию 100 метров на время.

[0013] В другом аспекте, в этом изобретении предлагается способ лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту внутривенной инфузии rAAV в течение приблизительно 1-2 часов в дозе около $5,0 \times 10^{13}$ гв/кг или около $2,0 \times 10^{14}$ гв/кг на основе суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, или около $1,85 \times 10^{13}$ гв/кг

или $7,41 \times 10^{13}$ гв/кг на основе линейризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, и при этом rAAV содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19. В другом аспекте, в данном изобретении описан способ экспрессии гена бета-саркогликана в клетке субъекта, включающий введение указанному субъекту конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, содержащей нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 19. В одном аспекте, в данном изобретении предлагается способ увеличения положительных по бета-саркогликану волокон и/или снижения уровня СК в мышечной ткани субъекта, включающий введение субъекту нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 19.

[0014] В одном аспекте, в данном изобретении описан способ повышения экспрессии альфа-саркогликана у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту rAAV, содержащего конструкцию scAAVrh74.MHCK7.hSGCB с нуклеотидной последовательностью, являющейся по меньшей мере на 90%, 95% или на 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19. В другом аспекте, в данном изобретении предлагается способ увеличения локализации альфа-саркогликана на клеточной мембране у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19. В другом аспекте предлагается способ повышения экспрессии саркогликана в мышечной ткани или улучшения мышечной функции субъекта, включающий введение указанному субъекту rAAV, содержащего нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 19. В другом аспекте, в данном изобретении предлагается способ повышения экспрессии саркогликана в мышечной ткани субъекта, включающий введение указанному субъекту конструкции, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую первый саркогликан, и обнаружение повышенной экспрессии по меньшей мере второго саркогликана в клеточной мембране клетки, экспрессирующей указанный первый саркогликан.

[0015] В другом аспекте описана композиция, содержащая вектор rAAV scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, буферный агент, агент ионной силы и поверхностно-активное вещество. В другом аспекте, в данном изобретении описана фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный AAV (rAAV) scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, при этом scAAVrh74.MHCK7.hSGCB содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 19.

[0016] В другом аспекте предлагается способ генерирования рекомбинантного AAV scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, включающий перенос плазмиды в клетку, при этом указанная плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 24. В частности, указанная

плазмида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24. В другом варианте осуществления данного изобретения указанная плазмида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0017] В другом аспекте, в данном изобретении описан рекомбинантный вектор AAV, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую β -саркогликан. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотидная последовательность, кодирующая β -саркогликан, содержит последовательность, которая является, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, чаще на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или в большей мере идентичной нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, и кодирует белок, который сохраняет активность β -саркогликана. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотидная последовательность, кодирующая β -саркогликан, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотидная последовательность, кодирующая β -саркогликан, состоит из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1.

[0018] В другом аспекте рекомбинантный вектор AAV, описанный в данном документе, содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую β -саркогликан, которая является по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, чаще по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93% или 94% и еще чаще по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и при этом белок сохраняет активность β -саркогликана.

[0019] В другом аспекте, в данном документе описан рекомбинантный вектор AAV, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный β -саркогликан, который содержит нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в строгих условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или ее комплементом.

[0020] Термин «жесткий» применяется для обозначения условий, которые обычно подразумеваются в данной области техники как жесткие. Жесткость гибридизации в основном определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих агентов, например, формамида. Примеры жестких условий гибридизации и промывок представляют собой 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при температуре 65-68 °C, или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия, и 50% формамида при температуре 42 °C. См. публикацию Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Также могут быть использованы более жесткие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокое содержание формамида или другого

денатурирующего агента), однако это будет влиять на скорость гибридизации. В случаях, когда речь идет о гибридизации дезоксиолигонуклеотидов, дополнительные иллюстративные жесткие условия гибридизации включают промывание в 6х SSC 0,05% пиродифосфате натрия при 37 °C (для олигонуклеотидов с 14 основаниями), 48 °C (для олигонуклеотидов с 17 основаниями), 55 °C (для олигонуклеотидов с 20 основаниями) и 60 °C (для олигонуклеотидов с 23 основаниями).

[0021] Когда в данном документе используются диапазоны для физических свойств, таких как молекулярная масса, концентрация или дозировка, предполагается, что все комбинации и субкомбинации диапазонов и конкретных вариантов осуществления данного изобретения в них включены. Термин «около», когда речь идет о числе или числовом диапазоне, означает, что указанное число или числовой диапазон является приблизительным в пределах экспериментальной изменчивости (или в пределах статистической экспериментальной ошибки), и, таким образом, число или числовой диапазон может варьироваться, например, от 1% до 15% от указанного числа или числового диапазона.

[0022] С целью снижения неспецифической и/или фоновой гибридизации в гибридизационные и промывочные буферы могут быть включены другие агенты. Примерами являются 0,1% бычий сывороточный альбумин, 0,1% поливинилпирролидон, 0,1% пиродифосфат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, NaDodSO₄, (SDS), фиколл, раствор Денхардта, обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося (или другая некомплементарная ДНК) и сульфат декстрана, хотя другие подходящие агенты также могут быть использованы. Концентрация и типы этих добавок могут быть изменены без существенного влияния на жесткость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8-7,4, однако в типовых условиях ионной силы скорость гибридизации практически не зависит от pH. См. публикацию Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Специалист в данной области техники может отрегулировать условия гибридизации, чтобы приспособить эти переменные и дать возможность ДНК с различным родством последовательностей образовывать гибриды.

[0023] В другом аспекте рекомбинантные векторы AAV, описанные в данном документе, могут быть функционально связаны с мышечно-специфическим контрольным элементом. Например, в качестве мышечно-специфического регуляторного элемента применяют элемент гена скелетного актина человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфический энхансер-связывающий фактор (MEF), мышечную креатинкиназу (МСК), tМСК (усеченная МСК), тяжелую цепь миозина (МНС), МНСК7 (гибридная версия МНС и МСК), C5-12 (синтетический промотор), элемент энхансера креатинкиназы мышцы, элемент гена скелетного быстро сокращающегося тропонина С, элемент гена медленно сокращающегося сердечного тропонина С, медленно изменяющийся элемент гена тропонина I, ядерные факторы, индуцируемые гипоксией, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

[0024] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мышечно-специфический промотор представляет собой МНСК7 (SEQ ID NO: 4). Типовым гAAV, описанным в данном документе, является рAAV.МНСК7.hSCGB, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3. В нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 промотор МНСК7 охватывает нуклеотиды 130-921, химерный интрон SV40 (SEQ ID NO: 20) охватывает нуклеотиды 931-1078, последовательность β -саркогликана (SEQ ID NO: 1) охватывает нуклеотиды 1091-2047 и поли А (SEQ ID NO: 21) охватывает нуклеотиды 2054-2106. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гAAV рAAV.МНСК7.hSCGB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19. В нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19 промотор МНСК7 охватывает нуклеотиды 128-919, химерный интрон SV40 охватывает нуклеотиды 929-1076, последовательность β -саркогликана охватывает нуклеотиды 1086-2042, а поли А охватывает нуклеотиды 2049-2101.

[0025] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гAAV рAAV.МНСК7.hSCGB содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, на около 81%, на около 82%, на около 83%, на около 84%, на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88% или на около 89%, чаще на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98% или на около 99% идентичной нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, которая является по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, на около 81%, на около 82%, на около 83%, на около 84%, на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88% или на около 89%, чаще на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98% или на около 99% идентичной последовательности SEQ ID NO: 2.

[0026] В одном варианте осуществления данного изобретения полинуклеотидная последовательность кодирует белок, который сохраняет активность саркогликана, включая активность бета- и/или альфа-саркогликана. В другом варианте осуществления данного изобретения полинуклеотидная последовательность кодирует белок, который сохраняет активность бета-саркогликана.

[0027] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мышечно-специфический промотор представляет собой tMCK (SEQ ID NO: 6). Типовым гAAV, описанным в данном документе, является рAAV.tMCK.hSCGB, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5. В нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 промотор tMCK охватывает нуклеотиды 141-854, химерный интрон SV40 охватывает нуклеотиды 886-1018, последовательность β -саркогликана охватывает нуклеотиды 1058-2014, а поли А охватывает нуклеотиды 2021-2073. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотидная последовательность,

кодирующая pAAV.tMCK.hSCGB, содержит последовательность, например, являющуюся по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, на около 81%, на около 82%, на около 83%, на около 84%, на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88% или на около 89%, чаще на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98% или на около 99% или в большей степени идентичной нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 5, при этом указанная полинуклеотидная последовательность кодирует белок, который сохраняет активность саркогликана, включая, но не ограничиваясь этим, активность бета- и/или альфа-саркогликана.

[0028] AAV может быть любым серотипом, например AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAVrh.74. Продуцирование псевдотипированного rAAV описано, например, в публикации WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с капсидными мутациями. См., например, публикацию Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014).

[0029] Также рассматриваются композиции, которые содержат любой из векторов rAAV, описанных в данном документе.

[0030] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается композиция или фармацевтическая композиция, которая содержит вектор rAAV scAAVrh74.MHCK7.hSCGB, содержащий нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, на около 81%, на около 82%, на около 83%, на около 84%, на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88% или на около 89%, чаще на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98% или на около 99% идентичной нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид и является по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, на около 81%, на около 82%, на около 83%, на около 84%, на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88% или на около 89%, чаще на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98% или на около 99% идентичной последовательности SEQ ID NO: 2. Кроме того, в данном изобретении предлагается композиция или фармацевтическая композиция, которая содержит вектор rAAV scAAVrh74.MHCK7.hSCGB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

[0031] Предлагаются способы лечения мышечной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие этап введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, при этом rAAV

вводят посредством системного пути введения и в дозе от около $1,0 \times 10^{12}$ гв/кг до около $5,0 \times 10^{14}$ гв/кг.

[0032] Также предлагается композиция для лечения мышечной дистрофии, содержащая рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) scAAVrh74.МНСК7.hSGC в дозе от около $1,0 \times 10^{12}$ гв/кг до около $5,0 \times 10^{14}$ гв/кг и при этом композиция составлена для системного введения.

[0033] Кроме того, предлагаются варианты применения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAVrh74.МНСК7.hSGC для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии, при этом лекарственное средство содержит scAAVrh74.МНСК7.hSGC в дозе от около $1,0 \times 10^{12}$ гв/кг до около $5,0 \times 10^{14}$ гв/кг, и лекарственное средство составлено для системного введения.

[0034] В любом из предложенных способов, композиций и применений, уровень экспрессии гена бета-саркогликана в клетке субъекта увеличивается после введения rAAV по сравнению с уровнем экспрессии гена бета-саркогликана до введения rAAV; при этом уровень сывороточной креатинкиназы (СК) у субъекта снижается после введения rAAV по сравнению с уровнем сывороточной креатинкиназы до введения rAAV; и/или при этом количество положительных по бета-саркогликану волокон в мышечной ткани субъекта увеличивается после введения rAAV по сравнению с количеством положительных по бета-саркогликану волокон до введения rAAV.

[0035] В другом варианте осуществления данного изобретения, в любом из предложенных способов, композиций и применений, двигательная функция улучшается у указанного субъекта по сравнению с двигательной функцией указанного субъекта до введения rAAV, и при этом двигательная функция определяется с помощью теста ходьбы на дистанцию 100 метров на время. Например, двигательная функция улучшается по меньшей мере на 5% через 1 месяц или тридцать дней после переноса гена, по меньшей мере на 10% через 2 месяца или шестьдесят дней после переноса гена, или по меньшей мере на 15% через 3 месяца или девяносто дней после переноса гена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения двигательная функция улучшается по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45% или 50%.

[0036] Например, в любом из предложенных способов, композиций и применений, системный путь введения представляет собой внутривенный путь. Например, rAAV вводят посредством внутривенного пути и при этом дозы вводимого rAAV составляют около $1,85 \times 10^{13}$ гв/кг или около $7,41 \times 10^{13}$ гв/кг, исходя из линейаризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, или доза вводимого rAAV составляет около 5×10^{13} гв/кг или около 2×10^{14} гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения.

[0037] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения дозу rAAV вводят посредством внутривенного пути и при этом доза составляет около $1,0 \times 10^{13}$ гв/кг до около 5×10^{14} , исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения или от около $1,0 \times 10^{13}$ гв/кг до около $1,0 \times 10^{14}$ гв/кг, исходя

из линеаризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения.

[0038] Кроме того, доза вводимого гAAV составляет от около $1,5 \times 10^{13}$ гв до около 2×10^{16} гв, или от $1,5 \times 10^{13}$ гв до 1×10^{16} гв, или от около $1,5 \times 10^{13}$ гв до около 2×10^{15} гв, или от около $1,5 \times 10^{13}$ гв до около 1×10^{15} гв. Кроме того, в любом из способов композиций и применений дозу гAAV вводят в концентрации около 10 мл/кг. В любом из предложенных способов, композиций или применений мышечная дистрофия представляет собой тазово-плечевую мышечную дистрофию.

[0039] Кроме того, предлагаются способы лечения мышечной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие этап введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) scAAVrh74.МНСК7.hSGCB, при этом гAAV вводят посредством системного пути введения и в дозе от около $1,0 \times 10^{12}$ гв/кг до около $5,0 \times 10^{14}$ гв/кг; при этом уровень экспрессии гена бета-саркогликана в клетке субъекта увеличивается после введения гAAV по сравнению с уровнем экспрессии гена бета-саркогликана до введения гAAV; при этом уровень СК в сыворотке у субъекта снижается после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке до введения гAAV; или при этом количество положительных по бета-саркогликану волокон в мышечной ткани субъекта увеличивается после введения гAAV по сравнению с количеством положительных по бета-саркогликану волокон до введения гAAV. Например, в любом из предложенных способов системный путь введения представляет собой внутривенный путь, а доза вводимого гAAV составляет около $5,0 \times 10^{13}$ гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения. В другом варианте осуществления данного изобретения доза вводимого гAAV составляет около $2,0 \times 10^{14}$ гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения. В другом варианте осуществления данного изобретения доза вводимого гAAV составляет около $7,41 \times 10^{13}$ гв/кг, исходя из линеаризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения. В другом варианте осуществления данного изобретения доза вводимого гAAV составляет около $1,85 \times 10^{13}$ гв/кг, исходя из линеаризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения. Кроме того, доза вводимого гAAV составляет от около $1,5 \times 10^{13}$ гв до около 2×10^{16} гв, или от $1,5 \times 10^{13}$ гв до 1×10^{16} гв, или от около $1,5 \times 10^{13}$ гв до около 2×10^{15} гв, или от около $1,5 \times 10^{13}$ гв до около 1×10^{15} гв. Кроме того, в любом из способов дозу гAAV вводят в концентрации около 10 мл/кг. При любом из предложенных способов мышечная дистрофия представляет собой тазово-плечевую мышечную дистрофию.

[0040] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ лечения мышечной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий этап введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) scAAVrh74.МНСК7.hSGCB, при этом двигательная функция у указанного субъекта явно улучшается по сравнению с двигательной функцией указанного субъекта до введения гAAV, и при этом двигательную функцию определяют с помощью теста с ходьбой на дистанцию 100 метров на время. В некоторых аспектах двигательная функция улучшается

по меньшей мере на 5% через 1 месяц или тридцать дней после переноса гена, по меньшей мере на 10% через 2 месяца или шестьдесят дней после переноса гена, или по меньшей мере на 15% через 3 месяца или девяносто дней после переноса гена. В некоторых аспектах двигательная функция двигателя улучшается по меньшей мере около на 5%, на около 10%, на около 15%, на около 20%, на около 25%, на около 30%, на около 40%, на около 45% или на около 50%.

[0041] Предлагаются способы повышения уровня альфа-саркогликана у субъекта, который нуждается в этом, включающие введения субъекту конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19. Кроме того, предлагаются композиции для повышения уровня альфа-саркогликана у субъекта, который нуждается в этом, при этом указанная композиция содержит конструкцию scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19. Также предлагается применение конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, для приготовления лекарственного средства для повышения уровня альфа-саркогликана у субъекта, который в этом нуждается. В некоторых аспектах альфа-саркогликан совместно локализуется на мембране клетки, экспрессирующей бета-саркогликан, кодируемый scAAVrh74.MHCK7.hSGCB.

[0042] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения конструкция scAAVrh74.MHCK7.hSGCB содержит интронную последовательность. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная интронная последовательность содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20. В другом варианте осуществления данного изобретения конструкция scAAVrh74.MHCK7.hSGCB содержит последовательность поли А. В одном варианте осуществления данного изобретения последовательность поли А содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления данного изобретения конструкция scAAVrh74.MHCK7.hSGCB содержит последовательность 5' инвертированного концевого повтора (ITR). В одном варианте осуществления данного изобретения последовательность 5'ITR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22. В другом варианте осуществления данного изобретения конструкция scAAVrh74.MHCK7.hSGCB содержит последовательность 3' инвертированного концевого повтора (ITR). В одном варианте осуществления данного изобретения последовательность 3'ITR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

[0043] Также предлагаются способы повышения экспрессии саркогликана в мышечной ткани субъекта, включающий введение указанному субъекту конструкции, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую первый саркогликан, и обнаружение повышенной экспрессии по меньшей мере второго саркогликана в клеточной мембране клетки, экспрессирующей указанный первый саркогликан. В некоторых аспектах первый саркогликан представляет собой β -саркогликан (SGCB), а указанный второй саркогликан представляет собой α -саркогликан (SGCA), γ -саркогликан

(SGCG) или δ -саркогликан (SGCD).

[0044] В любом из предложенных способов, применений и композиций для лечения мышечной дистрофии, у субъекта в возрасте 4-15 лет подтверждалась мутация бета-саркогликана (SGCB) в обоих аллелях, указанный субъект был отрицательным по антителам AAVrh74 и/или имел $> 40\%$ или нормальный результат теста с ходьбой на дистанцию 100 метров. В любом из предложенных способов, применений и композиций для лечения мышечной дистрофии субъект является субъектом детского возраста. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект является субъектом детского возраста, например, субъектом в возрасте от 1 до 10 лет. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения возраст субъекта составляет от 4 до 15 лет. Субъект, в одном из вариантов осуществления данного изобретения, является субъектом-подростком, например, субъектом в возрасте от 10 до 19 лет. Кроме того, субъект, в одном варианте осуществления данного изобретения, является молодым взрослым субъектом, например, субъектом в возрасте от позднего подросткового возраста до двадцати лет с небольшим, например, субъект может иметь возраст от 15 до 29 лет. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект является взрослым среднего возраста или пожилым субъектом, так что возраст взрослого среднего возраста может варьироваться от 25 до 55 лет, а возраст пожилого субъекта может варьироваться от 50 лет.

[0045] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гAAV вводят путем инъекции, инфузии или имплантации. Например, гAAV вводят путем инфузии в течение примерно 1-2 часов. Кроме того, гAAV вводят внутривенно через периферическую вену конечности.

[0046] Предлагаются способы лечения мышечной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие этап введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, при этом гAAV вводят посредством системного пути введения и в дозе от около $1,0 \times 10^{12}$ гв/кг до около $5,0 \times 10^{14}$ гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, и при этом гAAV содержит нуклеотидную последовательность β -саркогликана человека SEQ ID NO: 1. Кроме того, гAAV содержит промоторную последовательность MHCK7 SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гAAV имеет серотип AAVrh.74. Кроме того, гAAV содержит нуклеотидную последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0047] В другом варианте осуществления данного изобретения конструкция scAAVrh74.MHCK7.hSGCB содержит интронную последовательность. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная интронная последовательность содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20. В другом варианте осуществления данного изобретения конструкция scAAVrh74.MHCK7.hSGCB содержит последовательность поли А. В одном варианте осуществления данного изобретения

последовательность поли А содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления данного изобретения конструкция scAAVrh74.МНСК7.hSGCB содержит последовательность 5' инвертированного концевой повтора (ITR). В одном варианте осуществления данного изобретения последовательность 5'ITR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22. В другом варианте осуществления данного изобретения конструкция scAAVrh74.МНСК7.hSGCB содержит последовательность 3' инвертированного концевой повтора (ITR). В одном варианте осуществления данного изобретения последовательность 3'ITR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

[0048] В типовом варианта осуществления данного изобретения предлагаются способы лечения мышечной дистрофии у субъекта, который нуждается в этом, включающие этап введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAVrh74.МНСК7.hSGCB, при этом rAAV вводят посредством системного пути введения и в дозе от около $1,0 \times 10^{12}$ гв/кг до около $5,0 \times 10^{14}$ гв/кг, при этом субъект страдает тазово-плечевой мышечной дистрофией, и rAAV вводят посредством внутривенной инфузии в течении 1-2 часов в дозе около $5,0 \times 10^{13}$ гв/кг или около $2,0 \times 10^{14}$ гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, или около $1,85 \times 10^{13}$ гв/кг, или $7,41 \times 10^{13}$ гв/кг, исходя из линеаризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, и при этом rAAV содержит нуклеотидную последовательность конструкции scAAVrh74.МНСК7.hSGCB с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0049] Кроме того, в данном изобретении предлагается композиция для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии, содержащая дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAVrh74.МНСК7.hSGCB, при этом rAAV содержит нуклеотидную последовательность конструкции scAAVrh74.МНСК7.hSGCB из SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, и указанная композиция составлена для доставки дозы около $5,0 \times 10^{13}$ гв/кг или около $2,0 \times 10^{14}$ гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, или около $1,85 \times 10^{13}$ гв/кг или около $7,41 \times 10^{13}$ гв/кг, исходя из линеаризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, путем внутривенной инфузии в течение приблизительно 1-2 часов.

[0050] В данном изобретении также предлагается применение дозы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAVrh74.МНСК7.hSGCB для приготовления лекарственного средства для лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии, при этом доза rAAV составляет около $5,0 \times 10^{13}$ гв/кг или около $2,0 \times 10^{14}$ гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения, или около $1,85 \times 10^{13}$ гв/кг или около $7,41 \times 10^{13}$ гв/кг, исходя излинеаризованной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения, и при этом лекарственное средство составлено для доставки дозы путем внутривенной инфузии в течении приблизительно 1-2 часов.

[0051] В данном изобретении дополнительно предлагается способ улучшения мышечной функции субъекта, включающий введение указанному субъекту конструкции, которая содержит нуклеотидную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью, по меньшей мере 99% идентичностью или 100% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 19. Кроме того, предлагаются композиции для улучшения мышечной функции субъекта, при этом указанная композиция содержит конструкцию, которая содержит нуклеотидную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью, по меньшей мере 99% идентичностью или 100% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 19. Также предлагаются варианты применения конструкции, которые содержат нуклеотидную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью, по меньшей мере 99% идентичностью или 100% идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 19 для приготовления лекарственного средства для улучшения мышечной функции у субъекта.

[0052] В любом из предложенных способов применения или в любой из предложенных композиций указанный субъект имеет генетическую мутацию в гене, кодирующем саркогликан, или страдает мышечной дистрофией. В некоторых аспектах саркогликан представляет собой β -саркогликан (SGCB), α -саркогликан (SGCA), γ -саркогликан (SGCG) или δ -саркогликан (SGCD). В некоторых аспектах саркогликан представляет собой β -саркогликан или α -саркогликан.

[0053] В любом из предложенных способов, применений или композиций уровень экспрессии гена бета-саркогликана в клетке субъекта увеличивается после введения гAAV по сравнению с уровнем экспрессии гена бета-саркогликана до введения гAAV.

[0054] Кроме того, в любом из предложенных способов, применений или композиций экспрессию гена бета-саркогликана в клетке определяют путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью вестерн-блоттинга или иммуногистохимии в мышечном биоптате, взятом до и после введения гAAV.

[0055] В любом из предложенных способов, применений или композиций уровень белка бета-саркогликана увеличивается по меньшей мере на 25%, или по меньшей мере на 26%, или по меньшей мере на 27%, или по меньшей мере на 28%, или по меньшей мере на 29%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 31%, или по меньшей мере на 32%, или по меньшей мере на 33%, или по меньшей мере на 34%, или по меньшей мере на 35%, или по меньшей мере на 36%, или по меньшей мере на 37%, или по меньшей мере на 38%, или по меньшей мере на 39%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 41%, или по меньшей мере на 42%, или по меньшей мере на 43%, или по меньшей мере на 44%, или по меньшей мере на 45%, или по меньшей мере на 46%, или по меньшей мере на 47%, или по меньшей мере на 48%, или по меньшей мере на 49%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 51%, или по меньшей мере на 52%, или по меньшей мере на 53%, или по меньшей мере на 54%, или по меньшей мере на 55% или по меньшей мере на

56%, или по меньшей мере на 57%, или по меньшей мере на 58%, или по меньшей мере на 59%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 63%, или по меньшей мере на 65%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98% после введения гAAV. Например, уровень белка бета-саркогликана увеличивается по меньшей мере на 33%, что определяется путем измерения уровня белка бета-саркогликана при Вестерн-блоттинге в мышечном биоптате до и после введения гAAV, или уровень белка бета-саркогликана увеличивается по меньшей мере на 38% или по меньшей мере на 39%, что определяется путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью иммуногистохимии в мышечном биоптате до и после введения гAAV

[0056] В любом из способов, применений или композиций, предложенных в данном изобретении, уровень СК в сыворотке у субъекта снижается после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке до введения гAAV. Например, уровень СК в сыворотке у субъекта снижается по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 51%, или по меньшей мере на 52%, или по меньшей мере на 53%, или по меньшей мере на 54%, или по меньшей мере на 55%, или по меньшей мере на 56%, или по меньшей мере на 57%, или по меньшей мере на 58%, или по меньшей мере на 59%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 63%, или по меньшей мере на 65%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 81%, или по меньшей мере на 82%, или по меньшей мере на 83%, или по меньшей мере на 84%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 86%, или по меньшей мере на 87%, или по меньшей мере на 88%, или по меньшей мере на 89%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98% через 60-90 дней, или 60 дней, или 90 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке до введения гAAV.

[0057] В любом из способов, применений или композиций, предложенных в данном изобретении, количество положительных по бета-саркогликану волокон в мышечной ткани субъекта увеличивается после введения гAAV по сравнению с количеством положительных по бета-саркогликану волокон до введения гAAV. Например, количество положительных по бета-саркогликану волокон определяется путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью вестерн-блоттинга или иммуногистохимии в мышечном биоптате до и после введения гAAV. Например, количество положительных по бета-саркогликану волокон в мышечной ткани субъекта увеличивается по меньшей мере на 25%, или по меньшей мере на 26%, или по меньшей мере на 27%, или по меньшей мере на 28%, или по меньшей мере на 29%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 31%, или по меньшей мере на 32%, или по меньшей мере на 33%, или по меньшей мере на 34%, или по меньшей мере на 35%, или по меньшей мере на 36%, или по меньшей мере на 37%, или по меньшей мере на 38%, или по меньшей мере на 39%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 41%, или по меньшей мере на 42%, или по меньшей мере

на 43%, или по меньшей мере на 44%, или по меньшей мере на 45%, или по меньшей мере на 46%, или по меньшей мере на 47%, или по меньшей мере на 48%, или по меньшей мере на 49%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 51%, или по меньшей мере на 52%, или по меньшей мере на 53%, или по меньшей мере на 54%, или по меньшей мере на 55% или по меньшей мере на 56%, или по меньшей мере на 57%, или по меньшей мере на 58%, или по меньшей мере на 59%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 63%, или по меньшей мере на 65%, или по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98% после введения гAAV.

[0058] В любом из способов, композиций и применений, предложенных в данном изобретении, уровень альфа-саркогликана у субъекта повышается после введения гAAV по сравнению с уровнем альфа-саркогликана до введения гAAV. Уровень альфа-саркогликана определяется путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью иммуногистохимии или вестерн-блоттинга при биопсии мышц до и после введения гAAV.

[0059] В другом варианте осуществления данного изобретения предлагаются способы экспрессии гена бета-саркогликана в клетке, включающие введение субъектам нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19 или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0060] Также предлагаются композиции для экспрессии гена бета-саркогликана в клетке, при этом указанная композиция содержит нуклеотидную последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19 или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0061] В данном изобретении также предлагается применение нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB для приготовления лекарственного средства для экспрессии гена бета-саркогликана в клетке, при этом нуклеотидная последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19 или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0062] В любом из предложенных способов, применений или композиций для экспрессии гена бета-саркогликана в клетке экспрессия гена бета-саркогликана в клетке определяется путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью вестерн-блоттинга или иммуногистохимии в биопсиях мышц до и после введения конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB. Например, клетка имеет более одной вирусной копии AAV. Кроме того, ген бета-саркогликана измеряется у субъекта путем обнаружения более чем 1 копии генома вектора гAAV на ядро.

[0063] Также предлагаются композиции для снижения уровней СК в сыворотке у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанная композиция содержит нуклеотидную последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по

меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0064] В данном изобретении также предлагается применение нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB для приготовления лекарственного средства для снижения уровней СК в сыворотке у субъекта, нуждающегося в этом, при этом нуклеотидная последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0065] В любом из этих способов, применений и композиций уровень СК в сыворотке у субъекта снижается по меньшей мере на 82% по истечению 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке до введения гAAV.

[0066] Предлагаются способы увеличения количества волокон, положительных по бета-саркогликану, в мышечной ткани субъекта, при этом указанные способы включают введение субъекту нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0067] Также предлагаются композиции для увеличения количества волокон, положительных по бета-саркогликану, в мышечной ткани субъекта, при этом указанная композиция содержит нуклеотидную последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0068] В данном изобретении также предлагаются композиции для применения нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB для приготовления лекарственного средства для увеличения количества увеличения количества волокон, положительных по бета-саркогликану, в мышечной ткани субъекта, при этом нуклеотидная последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19 или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0069] В любом из этих способов, применений и композиций количество положительных по бета-саркогликану волокон определяется путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью вестерн-блоттинга или иммуногистохимии при биопсии мышц до и после введения гAAV. Кроме того, в любом из способов, применений и композиций количество волокон, положительных по бета-саркогликану, измеряется путем обнаружения более 1 копии генома вектора гAAV на ядро.

[0070] В другом варианте осуществления данного изобретения предлагаются способы повышения экспрессии альфа-саркогликана у субъекта, который в этом

нуждается, включающий введение указанному субъекту конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, содержащей нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0071] Также предлагаются композиции для повышения экспрессии альфа-саркогликана у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанная композиция содержит нуклеотидную последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0072] В данном изобретении также предлагается применение нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB для приготовления лекарственного средства для повышения экспрессии альфа-саркогликана у субъекта, при этом нуклеотидная последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0073] Также предлагаются способы повышения уровня локализации альфа-саркогликана на клеточной мембране у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение указанному субъекту конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, содержащей нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0074] Также предлагаются композиции для повышения уровня локализации альфа-саркогликана на клеточной мембране у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанная композиция содержит нуклеотидную последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0075] В данном изобретении также предлагается применение нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB для приготовления лекарственного средства для повышения уровня локализации альфа-саркогликана на клеточной мембране у субъекта, нуждающегося в этом, при этом нуклеотидная последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

[0076] В любом из этих способов, применений и композиций уровень альфа-саркогликана определяется путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью вестерн-блоттинга или иммуногистохимии при биопсии мышц до и после введения gAAV. Кроме того, в любом из предложенных способов, применений и композиций альфа-

саркогликан совместно локализуется на мембране клетки, экспрессирующей бета-саркогликан, кодируемый scAAVrh74.MHCK7.hSGCB.

[0077] В другом варианте осуществления данного изобретения предлагаются способы повышения экспрессии саркогликана в мышечной ткани субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение указанному субъекту конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, содержащей нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 19.

[0078] Также предлагаются композиции для повышения экспрессии саркогликана в мышечной ткани субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанная композиция содержит нуклеотидную последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 19.

[0079] В данном изобретении также предлагаются композиции для применения нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB для приготовления лекарственного средства для повышения экспрессии саркогликана в мышечной ткани субъекта, нуждающегося в этом, при этом нуклеотидная последовательность конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 19, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 19.

[0080] В любом из этих способов, применений и композиций для повышения экспрессии саркогликана в мышечной ткани субъект имеет генетическую мутацию в гене, кодирующем саркогликан, или указанный субъект страдает мышечной дистрофией. Например, в любом из этих способов, применений или композиций саркогликан представляет собой β -саркогликан (SGCB), α -саркогликан (SGCA), γ -саркогликан (SGCG) или δ -саркогликан (SGCD).

[0081] Также предлагаются способы получения частицы рекомбинантного вектора AAV, включающие культивирование клетки, которая переносится плазмидой, описанной в данном документе, и выделение рекомбинантных частиц AAV из супернатанта трансфицированных клеток. Также рассматриваются вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных векторов AAV, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения способ получения rAAV включает перенос плазмиды вектора AAV в клетку-хозяина. В другом варианте осуществления данного изобретения указанная плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 24. В другом аспекте данного изобретения предлагается клетка, содержащая плазмиду вектора AAV,

которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24. Описанная в данном документе клетка включает клетку насекомого, например, *клетку дрозофилы* (например, клетку S2 или клетку Kc), клетку шелкопряда (например, клетку Bme21) или клетку комара (например, клетку C6/36); или клетку млекопитающего (предпочтительно клетка человека, например, первичная клетка человека или стабильная клеточная линия). В одном варианте осуществления данного изобретения указанная клетка млекопитающего содержит клетку 293, клетку COS, клетки HeLa или клетку KB.

[0082] В другом варианте осуществления данного изобретения указанная плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 19. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная векторная плазмида содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 19. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная векторная плазмида AAV стабильно экспрессируется в клетке-хозяине. Клетка-хозяин, стабильно несущая векторную плазмиду AAV, может быть использована для генерации rAAV. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная векторная плазмида AAV представляет собой pAAV.MHCK7.hSGCB. Плазмида KAN.

[0083] Предлагаемый в данном изобретении способ продуцирования частиц рекомбинантного вектора AAV может дополнительно включать этап переноса упаковывающей плазмиды и/или вспомогательного вируса в клетку-хозяина. Например, способы дополнительно включают этап, на котором упаковывающая клетка содержит стабильно интегрированный ген cap AAV и/или при этом упаковывающая клетка содержит стабильно интегрированный ген гер AAV. В данном изобретении также предлагается клетка, содержащая плазмиду, которая содержит нуклеотидную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 24, или плазмиду, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24. Также предлагается клетка, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 19.

[0084] Также предлагаются способы уменьшения фиброза у млекопитающего, нуждающегося в этом. В этом отношении указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества вектора AAV, описанного в данном документе (или композиции, содержащей вектор AAV, описанный в данном документе), субъекту-млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект-млекопитающее имеет мышечную дистрофию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения введение вектора AAV, описанного в данном документе (или композиции, содержащей вектор AAV, описанный в данном документе), уменьшает фиброз в скелетных мышцах или сердечной мышце субъекта.

[0085] В данном контексте термин «мышечная дистрофия» относится к нарушению, при котором сила и мышечная масса постепенно снижаются. Неограничивающие примеры заболеваний, сопровождающихся мышечной дистрофией,

могут включать мышечную дистрофию Беккера, тиббиальную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию, саркогликанопатию, врожденную мышечную дистрофию, такую как врожденная мышечная дистрофия из-за частичного дефицита LAMA2, мерозин-дефицитная врожденная мышечная дистрофия, врожденная мышечная дистрофия типа 1D, врожденная мышечная дистрофия Фукуяма, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 1A, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2A, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2B, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2C, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2D, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2E, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2G, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2H, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2I, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2J, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа 2K, тазово-плечевая мышечная дистрофия типа IC, ригидная мышечная дистрофия позвоночника с простым буллезным эпидермолизом, окулофарингеальная мышечная дистрофия, врожденная мышечная дистрофия Ульриха и склероатоническая мышечная дистрофия Ульриха. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект страдает от тазово-плечевой мышечной дистрофии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект страдает от тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2E (LGMD2E).

[0086] В данном контексте термин «фиброз» относится к чрезмерному или нерегулируемому отложению компонентов внеклеточного матрикса (ECM) и аномальным процессам восстановления в тканях при повреждении, включая скелетные мышцы, сердечную мышцу, печень, легкое, почку и поджелудочную железу. Компоненты ECM, которые откладываются, включают коллаген, например, коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3 и фибронектин.

[0087] В другом аспекте, в данном документе описан способ увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у млекопитающего субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества вектора AAV, описанного в данном документе (или композиции, содержащей вектор AAV, описанный в данном документе), млекопитающему субъекту. В одном варианте осуществления данного изобретения указанным субъектом является человек.

[0088] В любом из способов по данному изобретению субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как тазово-плечевая мышечная дистрофия, или любой другой дистрофин-ассоциированной мышечной дистрофии.

[0089] Также предлагается способ лечения мышечной дистрофии у млекопитающего субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества описанного в данном документе вектора AAV (или композиции, содержащей описанный в данном документе вектор AAV) млекопитающему субъекту. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мышечная дистрофия представляет собой тазово-плечевую мышечную дистрофию.

[0090] В любом из способов по данному изобретению гAAV вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом способе по данному изобретению гAAV вводят системно, например, посредством парентерального введения путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0091] Композиции по данному изобретению составляют для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, композиции данному изобретению составляют для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0092] Кроме того, любую из композиций составляют для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией (такой как тазово-плечевая мышечная дистрофия или любая другая мышечная дистрофия, ассоциированная с дистрофином). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать второй рекомбинантный вектор AAV, содержащий полинуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 8.

[0093] В любом из применений данного изобретения лекарственное средство составляют для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом из применений данного изобретения лекарственное средство составляют для системного введения, такого как парентеральное введение, путем инъекции, инфузии или имплантации. Кроме того, любое из лекарственных средств может быть приготовлено для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией (такой как тазово-плечевая мышечная дистрофия или любая другая мышечная дистрофия, ассоциированная с дистрофином). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное лекарственное средство может дополнительно содержать второй рекомбинантный вектор AAV, содержащий полинуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 8.

[0094] В данном изобретении также предлагается состав или композиция, содержащая вирион гAAV, который содержит капсид, производный от AAVrh74, буферный агент, агент ионной силы и поверхностно-активное вещество. В предложенном составе или композиции, гAAV находится в концентрации от около $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл до около $5,0 \times 10^{14}$ гв/мл или в концентрации от около $5,0 \times 10^{12}$ гв/мл до около $1,0 \times 10^{14}$ гв/мл. Кроме того, концентрация гAAV составляет около $2,0 \times 10^{13}$ гв/мл, 4×10^{13} гв/мл или 5×10^{13} гв/мл. В предложенных составах или композициях, гAAV может представлять собой вирусную частицу scAAVrh74.МНСК7.hSGCB или вектор scAAVrh74.МНСК7.hSGCB. Например, в любом из предложенных составов или в любой из предложенных композиций, scAAVrh74.МНСК7.hSGCB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0095] В любом из предложенных составов или в любой из предложенных композиций, буферный агент содержит один или большее количество из следующих компонентов: трис, трицин, бис-трицин, HEPES, MOPS, TES, TAPS, PIPES и CAPS. Например, буферный агент содержит трис с pH 8,0 в концентрации от около 5 мМ до

около 40 мМ или буферный агент содержит трис с рН 8,0 в концентрации около 20 мМ.

[0096] В любом из предложенных составов или в любой из предложенных композиций агент ионной силы содержит один или большее количество из следующих компонентов: хлорид калия (KCl), ацетат калия, сульфат калия, сульфат аммония, хлорид аммония (NH₄ Cl), ацетат аммония, хлорид магния (MgCl₂), ацетат магния, сульфат магния, хлорид марганца (MnCl₂), ацетат марганца, сульфат марганца, хлорид натрия (NaCl), ацетат натрия, хлорид лития (LiCl) и ацетат лития. Например, агент ионной силы содержит MgCl₂ в концентрации от около 0,2 мМ до около 4 мМ, или агент ионной силы содержит NaCl в концентрации от около 50 мМ до около 500 мМ, или агент ионной силы содержит MgCl₂ в концентрации от около 0,2 до около 4 мМ и NaCl в концентрации от около 50 мМ до около 500 мМ, или агент ионной силы содержит MgCl₂ в концентрации около 1 мМ и NaCl в концентрации около 200 мМ.

[0097] В любом из предложенных составов или в любой из предложенных композиций поверхностно-активное вещество содержит один или большее количество из следующих компонентов: сульфонат, сульфат, фосфонат, фосфат, полоксамер и катионное поверхностно-активное вещество. Например, полоксамер содержит один или большее количество из следующих компонентов: полоксамер 124, полоксамер 181, полоксамер 184, полоксамер 188, полоксамер 237, полоксамер 331, полоксамер 338 и полоксамер 407. Полоксамер может иметь концентрацию от около 0,00001% до около 1%. Типовым поверхностно-активным веществом является полоксамер 188 в концентрации около 0,001%.

[0098] Вышеупомянутые параграфы не предназначены для определения каждого аспекта данного изобретения, а дополнительные аспекты описаны в других разделах, таких как Подробное описание. Предполагается, что весь документ связан как единое описание, и следует понимать, что рассматриваются все комбинации функций, описанные в данном документе, даже если комбинация функций не встречается вместе в одном предложении, или параграфе, или разделе этого документа. Данное изобретение включает в себя в качестве дополнительного аспекта все варианты осуществления, более узкие по объему в любом случае, чем варианты, определенные конкретными параграфами выше. Например, когда определенные аспекты данного изобретения описаны как род, следует понимать, что каждый представитель рода индивидуально является аспектом данного изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0099] **На Фигуре 1** представлена схема терапевтической трансгенной кассеты β-саркогликана. Самокомплементарный вектор AAV, содержащий ген β-саркогликана человека с оптимизированными кодонами (hSGCB). Мышечно-специфический промотор МНСК7 управляет экспрессией. Указанная кассета также содержит химерный интрон для усиления сигнала процессинга и полиаденилирования для стабильности.

[00100] **На Фигуре 2А-2В** продемонстрирована экспрессия β-саркогликана человека в скелетных мышцах. А) Иммунофлуоресцентная визуализация скелетных

мышц, диафрагмы и сердца мышей SGCB^{-/-}, которым внутривенно вводили дозу, составляющую в общей сложности 3e12 гв scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Репрезентативные изображения со всеми мышцами, отображающие $\geq 98\%$ трансдукции. Продемонстрированы 20X изображения. В) Вестерн-блоттинг, демонстрирующий экспрессию трансгена hSGCB (43 кДа) в мышцах, обработанных клинической дозой (# 716) и высокой дозой (# 785, 786). N=6 для экспериментальной группы, 100 кДа соответствует контролю нагрузки α -актина.

[00101] **На Фигуре 3** продемонстрирован эффект системного введения высоких доз scAAVrh74.MHCK7.hSGCB на мышечную патологию. (А) Окраска четырехглавой мышцы и диафрагмальной мышцы посредством H&E у мышей C57BL/6 WT, SGCB^{-/-}, обработанных scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, (В) Количественная оценка сокращения центрально-ядерных волокон, (С) нормализация распределения волокон, и (D) увеличение среднего размера волокон. N=6 для каждой группы. * = $P < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

[00102] **На Фигуре 4** продемонстрирована коррекция дефицита мышечной силы в диафрагме мышей SGCB^{-/-}. После 24 недель лечения у мышей собирали фрагменты мышц диафрагмы для измерения продуцирования силы после стимуляции. Лечение восстанавливало силу до уровней WT и обеспечивало большее восстановление по сравнению с ранее изученной дозой (общая доза 1-12 гв) (WT: n=5; КО: n=4; Низкая доза: n=6; Высокая доза: n=6). ** = $p < 0,01$.

[00103] **Фигура 5** демонстрирует, что общее передвижение в плоскостях x и y значительно уменьшилось у мышей КО и несколько улучшилось у мышей, получавших MHCK7. Вертикальная активность подъема на задние конечности несколько улучшилась у мышей, получавших MCHK7 (n=6).

[00104] **На Фигуре 6** продемонстрировано биораспределение вестернов по мышцам и органам от двух мышей SGCB^{-/-} после высокой дозы ($2,0 \times 10^{14}$ гв/кг) scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, вводимой посредством системных инъекций. 43 кДа соответствует белку β -саркогликана. 125 кДа соответствует контролю нагрузки винкулина.

[00105] **На Фигуре 7** представлена экспрессия белка β -саркогликана в биоптатах мышц у субъектов-людей после системного введения $5,0 \times 10^{13}$ гв/кг scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, что обнаружено и количественно определено с помощью иммуногистохимического метода.

[00106] **На Фигуре 8** представлена экспрессия белка β -саркогликана в биоптатах мышц у субъектов-людей через 90 дней после системного введения $5,0 \times 10^{13}$ гв/кг scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, что обнаружено и количественно определено с помощью вестерн-блоттинга.

[00107] **Фигура 9** демонстрирует, что экспрессия белка β -саркогликана усиливает экспрессию саркогликанового комплекса, на что указывает обнаружение и количественная оценка альфа-саркогликана с помощью иммуногистохимического метода.

[00108] **На Фигуре 10** продемонстрировано восстановление экспрессии β —саркогликана, α -саркогликана, и совместная локализация как β -саркогликана, так и α -саркогликана на мембране пациента № 3 в исследовании.

[00109] **На Фигуре 11** продемонстрировано среднее процентное изменение по сравнению с исходным уровнем или улучшение результата теста с ходьбой на дистанцию 100 метров у трех субъектов в течение первых трех месяцев после переноса гена с scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB.

[00110] **На Фигурах 12А-С** продемонстрировано изменение по сравнению с исходным уровнем оценки подвижности пациента North Star для тазово-плечевой мышечной дистрофии (NSAD) для контрольной группы с естественным течением (Фигура 12А) и для субъектов после введения $5,0 \times 10^{13}$ гв/кг scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB (Фигура 12В). Данные NSAD для шести отдельных пациентов из контрольной группы с естественным течением приведены на Фигуре 12С.

[00111] **На Фигуре 13** представлена схематическая карта pAAV.MHCK7.hSGCB. KAN AAV векторная плазида.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00112] Данное изобретение основано на открытии того факта, что введение вектора AAV, содержащего полинуклеотид, экспрессирующий β -саркогликан, приводит к уменьшению или полному обратному развитию мышечного фиброза на животной модели тазово-плечевой мышечной дистрофии. Как продемонстрировано в примерах, введение вектора AAV, описанного в данном документе, привело к обратному развитию дистрофических признаков, включая уменьшение количества дегенерирующих волокон, уменьшение воспаления и улучшение функционального восстановления за счет защиты от эксцентрического сокращения с увеличением генерирования силы.

[00113] В данном контексте документе термин «AAV» означает стандартную аббревиатуру для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК-парвовирус, который растет только в клетках, в которых определенные функции обеспечиваются коинфицирующим вирусом-помощником. В настоящее время охарактеризовано тринадцать серотипов AAV. Общую информацию и обзоры AAV можно найти, например, в публикациях Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228, и Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York). Однако вполне ожидаемо, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны как структурно, так и функционально, даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; и Rose, Comprehensive Virology 3: 1-61 (1974)). Например, все серотипы AAV, по-видимому, проявляют очень похожие свойства репликации, опосредованные гомологичными генами гер, и все они несут три родственных капсидных белка, таких как экспрессированные в AAV2. Степень родства дополнительно подтверждается гетеродуплексным анализом, который выявляет обширную перекрестную гибридизацию

между серотипами по всей длине генома, и наличие аналогичных сегментов самоотжига на концах, которые соответствуют «последовательностям инвертированного концевых повтора» (ITR). Подобные профили инфекционности также предполагают, что функции репликации в каждом серотипе находятся под сходным регуляторным контролем.

[00114] В данном контексте термин «вектор AAV» относится к вектору, содержащему один или большее количество представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевых повторов AAV (ITR). Такие векторы AAV могут реплицироваться и упаковываться в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов гер и сар.

[00115] «Вирион AAV» или «вирусная частица AAV» или «векторная частица AAV» относятся к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного вектора AAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (то есть полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его обычно называют «векторной частицей AAV» или просто «вектором AAV». Таким образом, получение векторной частицы AAV обязательно включает производство вектора AAV, поскольку такой вектор содержится в векторной частице AAV.

AAV

[00116] Рекомбинантные геномы AAV по данному изобретению включают молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению и одну или несколько ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах rAAV может происходить из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая серотипы AAV-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 и AAV rh.74., но не ограничиваясь ими. Продуцирование псевдотипированного rAAV описано, например, в публикации WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с капсидными мутациями. См., например, публикацию Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Как отмечено выше в разделе «Уровень техники», в данной области известны нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV. Для стимулирования специфической экспрессии скелетных мышц можно применять AAV1, AAV5, AAV6, AAV8 или AAV9.

[00117] ДНК-плазмиды по данному изобретению содержат геномы rAAV. ДНК-плазмиды переносят в клетки, восприимчивые к инфицированию вирусом-помощником AAV (например, аденовирусом, аденовирусом с делецией E1 или герпесвирусом), для сборки генома rAAV в инфекционные вирусные частицы. Способы продукции частиц rAAV, при которых в клетку вводят геном AAV, подлежащий упаковке, гены гер и сар и функции вируса-помощника, являются стандартными в данной области техники. Продукция rAAV требует присутствия в одной клетке (называемой в данном документе

упаковывающей клеткой) следующих компонентов: генома гAAV, отделенных от генома гAAV (т.е. не входящих в состав генома) генов гер и сар AAV, и функций вируса-помощника. Гены гер и сар AAV могут происходить из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут происходить из серотипа AAV, отличного от ITR генома гAAV, включая серотипы 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 и AAV rh.74, но не ограничиваясь ими. Продуцирование псевдотипированного гAAV описано, например, в публикации WO 01/83692, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00118] Способ получения упаковывающей клетки заключается в создании линии клеток, стабильно экспрессирующих все необходимые компоненты для продукции частиц AAV. Например, плазмиду (или множество плазмид), содержащую геном гAAV без генов 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 гAAV можно внедрить в бактериальные плазмиды посредством таких процедур, как концевое присоединение GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления эндонуклеазами рестрикции (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73), или прямое лигирование тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Упаковывающую клеточную линию затем инфицируют вирусом-помощником, таким как аденовирус. Преимущества этого способа заключаются в возможности отбора клеток и в том, что они подходят для крупномасштабной продукции гAAV. Другие примеры подходящих способов задействуют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки.

[00119] Общие принципы получения гAAV рассмотрены, например, в публикациях Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Различные подходы описаны в публикациях Ratschin et al., Mol. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); патенте США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте США № 5658776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) Vaccine 13:1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3:1124-1132; патенте США № 5786211; патенте США № 5871982; и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы тем самым полностью включены в данный документ посредством ссылок, с особым вниманием на разделы документов, которые касаются продуцирования гAAV.

[00120] Таким образом, в данном изобретении предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном варианте осуществления

данного изобретения упаковывающие клетки могут быть стабильно трансформированными раковыми клетками, например, клетками HeLa, клетками 293 и клетками PerC.6 (линии, родственной 293). В еще одном варианте осуществления данного изобретения упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, например, клетки 293 после небольшого количества пересевов (клетки почки плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты плода человека), клетки WI-38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода макака-резуса).

[00121] Рекомбинантный AAV (*m.e.* инкапсидированные инфекционные частицы rAAV) по данному изобретению содержат геном rAAV. Варианты осуществления включают, но не ограничиваются ими, rAAV, названный pAAV.MHCK7.hSCGB, который содержит полинуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19; и pAAV.tMCK.hSCGB, который содержит полинуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5.

[00122] rAAV можно очистить стандартными способами, известными в данной области техники, например, колоночной хроматографией или центрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия. Способы очистки векторов rAAV от вируса-помощника известны в данной области техники и включают способы, описанные, например, в статьях Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69: 427-443 (2002); патенте США № 6566118 и заявке WO 98/09657.

[00123] В другом варианте осуществления изобретения предложены композиции, содержащие rAAV по данному изобретению. Описанные в данном документе композиции содержат rAAV в фармацевтически приемлемом носителе. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты нетоксичны для реципиентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозах и концентрациях и включают: буферы, например, фосфатный буфер, цитратный буфер или буфер на основе других органических кислот; антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные полипептиды; белки, например, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, например, поливинилпирролидон; аминокислоты, например, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, например, ЭДТК; сахароспирты, например, маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, например, натрия; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, например, Tween, плуроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[00124] Титры rAAV, которые можно вводить в способах по данному изобретению, зависят, например, от конкретного rAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток-мишеней; их можно определить посредством способов, стандартно

применяемых в данной области техники. Титры гAAV могут варьировать от около 1×10^6 , около 1×10^7 , около 1×10^8 , около 1×10^9 , около 1×10^{10} , около 1×10^{11} , около 1×10^{12} , от около 1×10^{13} до около 1×10^{14} или более устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки можно также выражать в единицах геномов вируса (гв). Титры гAAV могут быть определены на основе суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения или на основе линейаризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения.

[00125] В данном изобретении предлагаются способы трансформации клетки-мишени с помощью гAAV *in vivo* или *in vitro*. Способы *in vivo* включают этап введения эффективной дозы или эффективных множественных доз композиции, содержащей гAAV по данному изобретению, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития нарушения/заболевания, введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития нарушения/заболевания, введение является терапевтическим. В вариантах осуществления данного изобретения эффективная доза представляет собой дозу, которая облегчает (устраняет или уменьшает) по меньшей мере один симптом, ассоциированный с нарушением/патологическим состоянием, которое лечат, которая замедляет или предотвращает прогрессирование нарушения/патологического состояния, которая замедляет или предотвращает прогрессирование нарушения/патологического состояния, которая уменьшает степень заболевания, что приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или продлевает выживаемость. Примером заболевания, рассматриваемого для профилактики или лечения с помощью способов по данному изобретению, является мышечная дистрофия, например, тазово-плечевая мышечная дистрофия. Таким образом, предлагается способ трансдуцирования клетки-мишени посредством AAV scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или 19.

[00126] В данном изобретении также предлагается комбинированная терапия. В данном документе комбинация включает как одновременное, так и последовательное лечение. В частности, рассматриваются комбинации способов по данному изобретению со стандартными медикаментозными методами лечения (*например*, стероидами, кортикостероидами и/или глюкокортикоидами, включая, помимо прочего, один или большее количество из следующих агентов: преднизон, преднизолон и дефлазакорт), а также комбинации с новыми методами лечения. В этом отношении, комбинации включают введение субъекту одного или большего количества из следующих агентов: стероид, кортикостероид и/или глюкокортикоид, включая, помимо прочего, один или большее количество из следующих агентов: преднизон, преднизолон и дефлазакорт, перед введением субъекту гAAV по данному изобретению, одновременно с введением субъекту гAAV или после введения субъекту гAAV.

[00127] В родственных вариантах осуществления комбинированной терапии, рассматриваемой в данном изобретении, глюкокортикоид включает, помимо прочего,

беклометазон, бетаметазон, будесонид, кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон или триамцинолон.

[00128] Известно, что у субъекта, которому вводят вектор rAAV, может формироваться антиген-специфический Т-клеточный ответ. Формирование указанного ответа ожидается через 2-4 недели после переноса гена. Одним из возможных последствий таких антиген-специфических Т-клеточных ответов является клиренс трансдуцированных клеток и потеря экспрессии трансгена. Чтобы ослабить иммунный ответ организма хозяина на терапию на основе rAAV, перед терапией, например, за двадцать четыре часа до проведения терапии, субъекты могут начать профилактический прием преднизона в дозе около 1 мг/кг/день или сопоставимого глюкокортикоида внутрь в максимальной дозе 60 мг/день. При необходимости также допустимо внутривенное введение сопоставимого глюкокортикоида в приблизительной дозе 1 мг/кг/день. Лечение будет продолжаться приблизительно один месяц. Протокол постепенного снижения дозы преднизона или сопоставимого глюкокортикоида может быть реализован на основе иммунного ответа отдельных субъектов на перенос гена, оцененного с помощью анализа ELISpot, а также мониторинга функции печени с учетом уровня GGT.

[00129] Терапевтически эффективное количество вектора rAAV представляет собой дозу rAAV в диапазоне от около $1e13$ гв/кг до около $5e14$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $2e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $3e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $4e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $5e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $6e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $7e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $8e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $9e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $1e14$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $2e14$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $3e14$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $4e14$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $4e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $5e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $6e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $7e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $8e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $9e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $1e14$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $2e14$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $3e14$ гв/кг, или от около $3e13$ до около $4e14$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $5e14$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $6e13$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $7e13$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $8e13$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $9e13$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $1e14$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $2e14$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $3e14$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $4e14$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $5e14$ гв/кг, или от около $1e14$ гв/кг до около $2e14$ гв/кг, или от около $1e14$ гв/кг до около $3e14$ гв/кг, или от около $1e14$ до около $4e14$ гв/кг, или от около $1e14$ гв/кг до около $5e14$ гв/кг, $6e14$ гв/кг, $7e14$ гв/кг, $8e14$ гв/кг или $9e14$ гв/кг. Данное изобретение также включает композиции, содержащие эти диапазоны вектора rAAV.

[00130] Например, терапевтически эффективное количество вектора rAAV представляет собой дозу $1e13$ гв/кг, около $2e13$ гв/кг, около $3e13$ гв/кг, около $4e13$ гв/кг,

около 5×10^3 гв/кг, около 6×10^3 гв/кг, около 7×10^3 гв/кг, около $7,4 \times 10^3$ гв/кг, около 8×10^3 гв/кг, около 9×10^3 гв/кг, около 1×10^4 гв/кг, около 2×10^4 гв/кг, около 3×10^4 гв/кг, около 4×10^4 гв/кг и 5×10^4 гв/кг. Титр или дозировка векторов AAV может варьироваться в зависимости от физических форм плазмидной ДНК в качестве стандарта количественного определения. Например, значение титра или дозировки может варьироваться в зависимости от метода титрования кПЦР для суперспиральной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения или метода титрования кПЦР для линейной плазмиды в качестве стандарта количественного определения. В одном варианте осуществления данного изобретения терапевтически эффективное количество гAAV представляет собой дозу 5×10^3 гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения или дозу $1,85 \times 10^3$ гв/кг, исходя из линейаризованной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения. В другом варианте осуществления данного изобретения терапевтически эффективное количество гAAV представляет собой дозу 2×10^4 гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения или дозу $7,41 \times 10^3$ гв/кг, исходя из линейаризованной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения. В другом варианте осуществления изобретения терапевтически эффективное количество scAAVrh74.MHCK7.hSGCB представляет собой дозу в диапазоне от около 1×10^3 гв/кг до около 5×10^4 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 2×10^3 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 3×10^3 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 4×10^3 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 5×10^3 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 6×10^3 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 7×10^3 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 8×10^3 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 9×10^3 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 1×10^4 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 2×10^4 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 3×10^4 гв/кг, или от около 1×10^3 гв/кг до около 4×10^4 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 4×10^3 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 5×10^3 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 6×10^3 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 7×10^3 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 8×10^3 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 9×10^3 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 1×10^4 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 2×10^4 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 3×10^4 гв/кг, или от около 3×10^3 до около 4×10^4 гв/кг, или от около 3×10^3 гв/кг до около 5×10^4 гв/кг, или от около 5×10^3 гв/кг до около 6×10^3 гв/кг, или от около 5×10^3 гв/кг до около 7×10^3 гв/кг, или от около 5×10^3 гв/кг до около 8×10^3 гв/кг, или от около 5×10^3 гв/кг до около 9×10^3 гв/кг, или от около 5×10^3 гв/кг до около 1×10^4 гв/кг, или от около 5×10^3 гв/кг до около 2×10^4 гв/кг, или от около 5×10^3 гв/кг до около 3×10^4 гв/кг, или от около 5×10^3 гв/кг до около 4×10^4 гв/кг, или от около 5×10^3 гв/кг до около 5×10^4 гв/кг, или от около 1×10^4 гв/кг до около 2×10^4 гв/кг, или от около 1×10^4 гв/кг до около 3×10^4 гв/кг, или от около 1×10^4 до около 4×10^4 гв/кг, или от около 1×10^4 гв/кг до около 5×10^4 гв/кг, 6×10^4 гв/кг, 7×10^4 гв/кг, 8×10^4 гв/кг, или 9×10^4 гв/кг, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения. Данное изобретение также включает композиции, содержащие эти дозы вектора гAAV.

[00131] Введение эффективной дозы композиций может осуществляться с

помощью стандартных в данной области техники способов, включая внутримышечное, парентеральное, внутривенное, пероральное, буккальное, назальное, легочное, внутричерепное, внутрикостное, внутриглазное, ректальное или вагинальное введение, но не ограничиваясь ими. Способ(ы) введения и серотип(ы) компонентов AAV гAAV (в частности, ITR AAV и капсидный белок) по данному изобретению могут быть выбраны и/или согласованы специалистами в данной области техники с учетом инфекции и и/или патологического состояния, подвергаемых лечению, и клетки-/ткань(и)-мишени, которые должны экспрессировать β -саркогликан.

[00132] В данном изобретении также предлагается местное введение и системное введение эффективной дозы гAAV и композиций по данному изобретению. Например, системное введение представляет собой введение в систему кровообращения для влияния на весь организм. Системное введение включает энтеральное введение, такое как всасывание через желудочно-кишечный тракт, и парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации.

[00133] В частности, фактическое введение гAAV по данному изобретению может быть осуществлено с помощью любого физического способа, который будет транспортировать рекомбинантный вектор гAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно данному изобретению включает, но не ограничивается этим, инъекцию в мышцу, введение кровотока и/или непосредственно в печень. Было продемонстрировано, что простого ресуспендирования гAAV в физиологическом растворе с фосфатным буфером достаточно для обеспечения носителя, пригодного для экспрессии мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений для носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с гAAV (хотя в обычном режиме с гAAV следует избегать композиций, которые расщепляют ДНК). Капсидные белки гAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы гAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См., например, публикацию WO 02/053703, описание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[00134] Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде составов для инъекции или в виде составов для местного применения для доставки в мышцы посредством трансдермального транспорта. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для трансдермального транспорта, были ранее разработаны и могут применяться в практике данного изобретения. RAAV можно применять с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обращения. Таким образом, в другом аспекте, данная заявка направлена на состав, который содержит гAAV, содержащий капсид, полученный из AAVrh74, буферный агент, агент ионной силы и поверхностно-активное вещество. В одном варианте осуществления данного изобретения гAAV находится в концентрации от около $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл до около $5,0 \times 10^{14}$ гв/мл. В другом варианте осуществления данного изобретения гAAV находится в концентрации от около $5,0 \times 10^{12}$ гв/мл до около $1,0 \times 10^{14}$ гв/мл, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения. В

другом варианте осуществления данного изобретения rAAV находится в концентрации около $2,0 \times 10^{13}$ гв/мл, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения. В одном из вариантов осуществления данного изобретения rAAV представляет собой вектор scAAVrh74.МНСК7.hSGCB. В одном из вариантов осуществления данного изобретения концентрация rAAV в композиции или в составе препарата составляет от 1×10^{13} гв/мл до 2×10^{14} гв/мл, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения. В другом варианте осуществления данного изобретения указанная концентрация составляет 2×10^{13} гв/мл, 4×10^{13} гв/мл или 5×10^{13} гв/мл, исходя из суперспиральной плазмиды в качестве стандарта для количественного определения. В одном из вариантов осуществления данного изобретения буферный агент содержит один или большее количество из следующих компонентов: трис, трицин, бис-трицин, HEPES, MOPS, TES, TAPS, PIPES и CAPS. В другом варианте осуществления данного изобретения указанный буферный агент содержит трис с pH 8,0 в концентрации от около 5 mM до около 40 mM. В одном из вариантов осуществления данного изобретения буферный агент содержит трис с pH 8,0 в концентрации около 20 mM. В одном из вариантов осуществления данного изобретения агент ионной силы содержит один или большее количество из следующих компонентов: хлорид калия (KCl), ацетат калия, сульфат калия, сульфат аммония, хлорид аммония (NH_4Cl), ацетат аммония, хлорид магния (MgCl_2), ацетат магния, сульфат магния, хлорид марганца (MnCl_2), ацетат марганца, сульфат марганца, хлорид натрия (NaCl), ацетат натрия, хлорид лития (LiCl) и ацетат лития. В одном из вариантов осуществления данного изобретения указанный агент ионной силы содержит MgCl_2 в концентрации от около 0,2 mM до около 4 mM. В другом варианте осуществления данного изобретения указанный агент ионной силы содержит NaCl в концентрации от около 50 mM до около 500 mM. В другом варианте осуществления данного изобретения указанный агент ионной силы содержит MgCl_2 в концентрации от около 0,2 mM до около 4 mM и NaCl в концентрации от около 50 mM до около 500 mM. В другом варианте осуществления данного изобретения указанный агент ионной силы содержит MgCl_2 в концентрации около 1 mM и NaCl в концентрации около 200 mM. В одном варианте осуществления данного изобретения поверхностно-активное вещество содержит один или большее количество из следующих компонентов: сульфонат, сульфат, фосфонат, фосфат, полксамер и катионное поверхностно-активное вещество. В одном варианте осуществления данного изобретения полксамер содержит один или большее количество из следующих компонентов: полксамер 124, полксамер 181, полксамер 184, полксамер 188, полксамер 237, полксамер 331, полксамер 338 и полксамер 407. В одном варианте осуществления данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество содержит полксамер в концентрации от около 0,00001% до около 1%. В другом варианте осуществления данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество содержит полксамер 188 в концентрации около 0,001%. Для целей внутримышечной инъекции можно применять растворы в адьюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или в водном

пропиленгликоле, а также стерильные водные растворы. Такие водные растворы могут быть забуферены, при желании, и жидкий разбавитель сначала становится изотоническим с солевым раствором или глюкозой. Растворы гAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислотные фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсию гAAV также можно приготовить в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В этой связи все применяемые стерильные водные среды можно легко приготовить с помощью стандартных методов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

[00135] Фармацевтические формы, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить в шприц. Указанная форма должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное), их подходящие смеси и растительные масла. Подходящее жидкое состояние может поддерживаться, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть осуществлено с помощью различных противобактериальных и противогрибковых агентов, например, парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, тимеросал и тому подобное. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция композиций для инъекций может быть достигнута путем применения агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[00136] Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения гAAV в необходимом количестве в соответствующем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией на фильтре. Обычно дисперсии готовят путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и метод сублимационной сушки, в результате которых получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно

стерильно отфильтрованного раствора.

[00137] Трансдукцию с помощью гAAV также можно проводить *in vitro*. В одном варианте осуществления данного изобретения желаемые мышечные клетки-мишени удаляют из организма субъекта, трансдуцируют с помощью гAAV и повторно вводят в организм субъекта. В альтернативном варианте можно применять сингенные или ксеногенные мышечные клетки, когда эти клетки не будут генерировать ненадлежащий иммунный ответ у субъекта.

[00138] В данной области техники известны пригодные способы трансдукции и повторного введения трансдуцированных клеток в организм субъекта. В одном варианте осуществления данного изобретения клетки можно трансдуцировать *in vitro* путем объединения гAAV с мышечными клетками, *например*, в соответствующих средах, и отбирать те клетки, которые несут интересующую ДНК, с помощью традиционных методов, таких как Саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с применением селективируемых маркеров. Затем трансдуцированные клетки могут быть составлены в фармацевтические композиции, и указанная композиция введена субъекту с помощью различных способов, таких как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу с использованием, *например*, катетера.

[00139] Трансдукция клеток гAAV по данному изобретению приводит к устойчивой экспрессии β -саркогликана. Таким образом, в данном изобретении предлагаются способы введения/доставки гAAV, который экспрессирует β -саркогликан, субъекту-млекопитающему, предпочтительно человеку. Эти способы включают трансдукцию тканей (включая такие ткани, как мышцы, органы, такие как печень и мозг, и железы, такие как слюнные железы, но не ограничиваясь ими) посредством одного или большего количества гAAV по данному изобретению. Трансдукция может быть осуществлена с помощью генных кассет, содержащих тканеспецифичные регулирующие элементы. Например, в одном варианте осуществления данного изобретения предлагаются способы трансформации мышечных клеток и мышечных тканей, управляемые специфичными для мышц регулирующими элементами, включая полученные из семейств генов актина и миозина, таких как из семейства генов *myoD* [см. публикацию Weintraub et al., Science, 251 : 761-766 (1991)], специфичный для миоцитов энхансер-связывающий фактор MEF-2 [Cserjesi и Olson, Mol Cell Biol 11: 4854-4862 (1991)], регулирующие элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека [Muscat et al., Mol Cell Biol, 7 : 4089-4099 (1987)], гена актина сердечных мышц, элементы последовательности мышечной креатинкиназы [см. публикацию Johnson et al., Mol Cell Biol, 9 : 3393-3399 (1989)] и элемент-энхансер креатинкиназы мышцы (mCK), регулирующие элементы, происходящие из быстро сокращающегося гена тропонина С скелетных мышц, медленно сокращающегося гена тропонина С сердечных мышц и медленно сокращающегося гена тропонина I: ядерные факторы, индуцируемые при гипоксии (Semenza et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88 : 5680-5684 (1991)), стероид-индуцируемые элементы и промоторы, включающие глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (см. публикацию Mader and

White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603-5607 (1993)) и другие регулирующие элементы, но не ограничиваясь ими.

[00140] Мышечная ткань является эффективной мишенью для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. В данном изобретении рассматривается устойчивая экспрессия миРНК трансдуцированными миофибриллами.

[00141] Под «мышечной клеткой» или «мышечной тканью» подразумевают клетку или группу клеток, происходящих из мышц любого вида (например, скелетных мышц и гладких мышц, *например*, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или сердечной ткани). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, такими как миобласты, миоциты, мышечные трубочки, кардиомиоциты и кардиомиобласты.

[00142] Термин «трандукция» применяется для обозначения введения/доставки полинуклеотида, представляющего интерес (например, полинуклеотид, последовательность, кодирующая β -саркогликан), в клетку - реципиент либо *in vivo*, либо *in vitro*, посредством описанного rAAV с дефицитом репликации, что приводит к экспрессии β -саркогликана клеткой-реципиентом.

[00143] Таким образом, в данном изобретении описаны способы введения эффективной дозы (или доз, вводимых по существу одновременно или доз, вводимых с интервалами) rAAV, который кодируют β -саркогликан, пациенту, нуждающемуся в этом.

[00144] Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, включены в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки. В случае конфликта, данная заявка, включая любые определения в данном документе, будет иметь преимущественную силу.

[00145] Данное изобретение дополнительно описано в следующих примерах, которые не ограничивают его объем, описанный в формуле изобретения.

[00146] В другом варианте осуществления данного изобретения, в описании предлагается способ генерирования rAAV pAAV.MHCK7.hSCGB, который включает перенос векторной плазмиды AAV в клетку-хозяина. Способы переноса ДНК в клетку-хозяина известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, трансфекцию, инфекцию, трансформацию, электропорацию и трандукцию. В одном варианте осуществления данного изобретения векторная плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 24. В другом варианте осуществления данного изобретения указанная векторная плазмида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24. В другом аспекте данного изобретения предлагается клетка-хозяин, содержащая векторную плазмиду AAV, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная векторная плазмида AAV стабильно экспрессируется в клетке-хозяине. Клетка-хозяин, стабильно

несущая векторную плазмиду AAV, может применяться для генерирования гAAV. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная векторная плазида AAV представляет собой pAAV.MHCK7.hSGCB. Плазида KAN. pAAV.MHCK7.hSGCB. Плазида KAN проиллюстрирована на Фигуре 11.

[00147] В одном варианте осуществления данного изобретения указанная векторная плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 19. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная векторная плазида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 19. В одном варианте осуществления данного изобретения способ генерирования гAAV дополнительно включает перенос упаковывающей плазмиды и/или вируса-помощника в клетку-хозяина. Упаковывающая плазида в некоторых вариантах осуществления данного изобретения содержит ген *rep* и/или *cap* AAV, который функционально связан с промотором. В одном варианте осуществления данного изобретения указанный промотор представляет собой промотор транскрипции AAV. В одном варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин представляет собой упаковывающую клетку. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная упаковывающая клетка содержит стабильно интегрированный ген *cap* AAV. В другом варианте осуществления данного изобретения указанная упаковывающая клетка содержит стабильно интегрированный ген *rep* AAV.

[00148] В данном контексте термин «клетка-хозяин» относится к клетке, которую можно применять для экспрессии экзогенной последовательности ДНК. Неограничивающие примеры клетки-хозяина включают микроорганизм, дрожжевую клетку, клетку насекомого и/или клетку млекопитающего. Клетка-хозяин может применяться в качестве реципиента для конструкции помощника AAV, упаковывающей плазмиды, векторной плазмиды AAV, вектора вспомогательной функции или другой ДНК. В данном контексте термин охватывает потомство исходной клетки после экспрессии экзогенной последовательности ДНК в исходной клетке-хозяине. Неограничивающие примеры клеток-хозяев для продукции AAV включают клетки насекомых Sf9 и клетки НЕК 293Т. В одном варианте осуществления данного изобретения описанная в данном документе клетка включает клетку насекомого, например, *клетку дрозофилы* (например, клетку S2 или клетку Кс), клетку шелкопряда (например, клетку Bme21) или клетку комара (например, клетку C6/36); или клетку млекопитающего (предпочтительно клетка человека, например, первичная клетка человека или стабильная клеточная линия). В одном варианте осуществления данного изобретения указанная клетка млекопитающего включает клетку 293, клетку COS, клетки HeLa или клетку KB. Векторная плазида AAV может быть введена в клетки-хозяева, например, Sf9 или 293Т, путем инфицирования (вирусом или бакуловирусом), временной трансфекции с применением реагентов (например, липосомальных реагентов, реагентов с фосфатом кальция) или физического воздействия (например, электропорация) или с

помощью других способов, известных в данной области техники. В другом варианте осуществления данного изобретения линии клеток-хозяев являются стабильно интегрированными с плазмидами гAAV в их геномы. Такие стабильные клеточные линии могут быть созданы путем включения селекционного маркера в векторную плазмиду.

[00149] В одном варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин представляет собой упаковывающую клетку для продуцирования вирусных частиц AAV. Таким образом, в другом аспекте данного изобретения предлагается клетка-хозяин, которая содержит векторную плазмиду AAV, содержащую нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 24. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная векторная плазида AAV содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24. В другом варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 19.

ПРИМЕРЫ

[00150] Доклинические исследования с применением scAAVrh74.MHCK7.hSGCB описаны в международной патентной публикации № WO 2017/180976, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Пример 1 Материалы и способы

[00151] *Модели на животных.* Все процедуры были одобрены Научно-исследовательским институтом Национальной детской больницы и Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (протокол AR12-00040). Гетерозиготные мыши B6.129-Sgcb^{tm1Kcam/1J} были приобретены в лаборатории Джексона (Бар-Харбор, штат Мэн, США; штамм № 006832). Мыши Sgcb^{-/-} были получены путем разведения гетерозиготных мышей. Мышей КО разводили и содержали в качестве гомозиготных животных в стандартных условиях в Центре ресурсов животных при Научно-исследовательском институте Национальной детской больницы. Мышей содержали на питании Teklad Global Rodent Diet (3,8z5 клетчатки, 18,8% белка, 5% жиров) с циклом «темнота:свет» 12:12-ч. Идентификацию мышей SGCB^{-/-} проводили посредством генотипирования с помощью ПЦР. Всех животных содержали в стандартных клетках для мышей с пищей и водой ad libitum.

[00152] *Конструирование гена бета-саркогликана.* Полноразмерная кДНК бета-саркогликана человека (номер доступа в GenBank NM_0034994.3) была оптимизирована по кодонам и синтезирована на мощностях компании GenScript Inc, Пискатауэй, штат Нью-Джерси, США. Оптимизация кодонов с помощью GenScript использует алгоритм, который учитывает параметры, включающие транскрипцию, процессинг и стабильность мРНК, трансляцию и фолдинг белка, для создания последовательности кДНК, которая приводит к максимальной экспрессии в мышечной ткани (www.genscript.com).

[00153] Для конструкции pAAV.tMCK.hSGCB, кДНК затем клонировали в плазмиду, содержащую ITR AAV2, и кассета включала консенсусную последовательность Kozak (CCACC), химерный интрон SV40 и синтетический сайт полиаденилирования (53

п.о.). Рекombинантный промотор tMCK был бесплатно предоставлен Dr Xiao Xiao (Университет Северной Каролины). Это модификация ранее описанного промотора SK627 и включает модификацию энхансера выше промоторной области, содержащей сайты связывания факторов транскрипции. Энхансер состоит из двух E-боксов (правого и левого). Модификация промотора tMCK включает мутацию, преобразующую левый E-бокс в правый E-бокс (модификация 2R) и вставку из 6 п.о. (модификация S5). Вектор pAAV.tMCK.hSGCB конструировали путем лигирования фрагмента KpnI/XbaI размером 1040 п.о. из pUC57-BSG (Genscript Inc.) в сайты KpnI/XbaI pAAV.tMCK.hSGCA.26

[00154] Вектор pAAV.MHCK7.hSGCB конструировали путем удаления промотора tMCK и химерного интрона SV40 с сайтами NotI/KpnI и вставки ПЦР амплифицированного фрагмента, содержащего промотор MHCK7 и идентичный химерный интрон SV40 с сайтами NotI/KpnI. MHCK7 представляет собой промотор на основе MCK, который использует энхансер длиной 206 п.о., взятый из ~ 1,2 т.о. 5' сайта начала транскрипции в гене эндогенной мышечной креатинкиназы с проксимальным промотором (enh358MCK, 584 п.о.)³. ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA 12. Сам промотор MHCK7 содержит эту модифицированную кассету SK7 из семейства генов MCK, лигированных с энхансером α -MyHC (тяжелая цепь α -миозина) длиной 188 п.о. ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA 12. Креатинкиназная часть промотора (СК) является идентичной на 96% между tMCK и MHCK7. Наконец, вектор pAAV.MHCK7.hSGCB конструировали путем лигирования интронного фрагмента NotI/KpnI MHCK7+размером 960 п.о. из pAAV.MHCK7.DYSF5'DV44 в сайты NotI/KpnI pAAV.tMCK.hSGCB (Pozgai et al., Pozgai et al. Gene Ther.23 : 57-66, 2016).

[00155] *Продуцирование rAAV*. Для продуцирования вектора rAAV применяли модифицированный подход перекрестной упаковки, о котором ранее сообщили Rodino-Klapas et al. (J. Trans. Med . 5:45, 2007). Описанный метод тройной трансфекции с преципитацией CaPO_4 в клетках HEK293 позволяет упаковывать ITR AAV2 в другой серотип капсида AAV. (28,29) Продуцированные плазмиды представляли собой (i) pAAV.tMCK.hSGCB или pAAV.MHCK7.hSGCB, (ii) rep2-caprh.74-модифицированные вспомогательные плазмиды AAV, кодирующие изолят rh.74, подобный сар серотипу 8, и (iii) вспомогательная плазида аденовируса типа 5 (pAdhelper), экспрессирующая гены РНК аденовируса E2A, E4 ORF6 и VA I/II. Векторы очищали и инкапсидировали, а титр гв определяли как описано ранее (с помощью детекторной системы Prism 7500 Taqman; PE Applied Biosystems, Карлсбад, штат Калифорния, США). Праймер и флуоресцентный зонд нацеливались на промотор tMCK и были следующими: прямой праймер tMCK, 5'-ACC CGA GAT GCC TGG TTA TAA TT-3' (SEQ ID NO: 10); обратный праймер tMCK, 5'-TCC ATG GTG TAC AGA GCC TAA GAC-3' (SEQ ID NO: 11); и зонд tMCK, 5'-FAM-CTG CTG CCT GAG CCT GAG CGG TTA C-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 12). Праймер и флуоресцентный зонд нацеливались на промотор MHCK7 и были следующими: прямой праймер MHCK7, 5'-CCA ACA CCT GCT GCC TCT AAA-3' (SEQ ID NO: 16); обратный праймер MHCK7, 5'-GTC CCC CAC AGC CTT GTT C-3' (SEQ ID NO: 17); и зонд MHCK7,

5'-FAM-TGG ATC CCC-Zen-TGC ATG CGA AGA TC-3IABKFQ-3' (SEQ ID NO: 18).

[00156] *Системная доставка гена.* Системную доставку осуществляли путем инъекции вектора в хвостовую вену *мышей sgcb^{-/-}*. Мышам инъекционно вводили 3×10^{12} гв scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB ($2,0 \times 10^{14}$ гв/кг), разведенного в солевом физиологическом растворе, с помощью ультратонкого инсулинового шприца 30 размера. Мышей помещали в удерживающую трубку, фиксируя хвост в обратном направлении через прорезь для хвоста, чтобы согреть его и расширить кровеносные сосуды для облегчения инъекции. После размещения артерии по центральной линии хвоста, инъекцию выполняли в одну из пурпурных/синих латеральных вен, которые проходят вдоль хвостовой артерии. Всем мышам, получавшим препарат, инъекции осуществляли в возрасте 4-5 недель и умерщвляли через 6 месяцев после инъекции.

[00157] *Иммунофлуоресценция.* Криостатные срезы (12 мкм) инкубировали с моноклональным первичным антителом к бета-саркогликану человека (Leica Biosystems, Нью-Касл, Великобритания; № по каталогу NCL-Lb-SARC) при разведении 1:50 в блочном буфере ($1 \times$ TBS, 10% козья сыворотка, 0,1% твин) в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. Затем срезы промывали TBS три раза, каждый по 20 мин, и повторно блокировали на 30 мин. Конъюгированные с AlexaFluor 594 козьи вторичные антитела против IgG1 мыши (Life Technologies, Гранд-Айленд, штат Нью-Йорк, США; № по каталогу A21125) наносили при разведении 1:250 в течение 45 мин. Срезы промывали трижды в TBS по 20 мин и наносили на гистологическую среду Vectashield (Vector Laboratories, Бурлингем, штат Калифорния, США). Четыре случайных изображения $\times 20$, охватывающих четыре разных квадранта мышечного среза, получали с помощью камеры Zeiss AxioCam MRC5. Для каждого изображения определяли процент волокон, положительных по окрашиванию на бета-саркогликан (450% интенсивности окрашивания мышечной мембраны), и усредняли для каждой мышцы.

[00158] *Анализ вестерн-блоттинга.* Срезы тканей или биопсии мышц собирали в микроцентрифугу и гомогенизировали со 100 мкл буфера для гомогенизации (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 4 M мочевины) в присутствии 1 коктейльной таблетки ингибитора протеазы (Roche, Индианаполис, штат Индиана, США). После гомогенизации образцы центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин при 4 °C. Количество белка определяли с помощью NanoDrop (Thermo Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США). Образцы белка (20 мкг) подвергали электрофорезу в 3-8% полиакриламидном трис-ацетатном геле (NuPage, Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США) в течение 1 ч 5 мин при 150 В, а затем переносили на мембрану PVDF (Amersham Biosciences, Пискатауэй, штат Нью-Джерси, США) на 1 ч 15 мин при 35 В. Мембрану блокировали в 5% обезжиренном сухом молоке в TBST в течение 1 ч, а затем инкубировали с кроличьими поликлональными антителами к бета-саркогликану человека (Novus Biologicals, Литтлтон, Колорадо, США; № по каталогу NBP-1-90300, разведение 1:100 или 1:250) и с моноклональным мышинным антителом к гамма-тубулину с разведением 1:5000 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США; № по каталогу T6557) или с мышинным

моноклональным антителом против α -актина мышца с разведением 1:5000 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США; № по каталогу A7811). Применяли разведение 1: 500 кроличьего поликлонального антитела к сердечному тропонину I мышца (Abcam, Кембридж, штат Массачусетс; № по каталогу ab47003) и разведение 1:1000 кроличьего моноклонального антитела к винкулину мышца (Invitrogen, Фредерик, штат Мэриленд, США; № по каталогу 70062). Антимышечные (Millipore, Биллерика, штат Массачусетс, США; № по каталогу AP308P) и анти-кроличьи (Life Technologies; № по каталогу 656120) вторичные HRP антитела применяли для иммунодетекции ECL.

[00159] *Анализ биораспределения кПЦР*. Количественную ПЦР Taqman проводили для количественной оценки количества копий генома вектора, присутствующих в целевой и нецелевой контралатеральной мышце, как описано ранее. (18,30) Набор векторно-специфичных праймерных зондов применяли для амплификации последовательности интронной области непосредственно ниже промотора tMCK, который является уникальным и расположен в трансгенной кассете scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. В этом исследовании применяли следующие праймеры и зондов: tMCK и интрон MHCK7, прямой праймер 5'-GTG AGG CAC TGG GCA GGT AA -3' (SEQ ID NO: 13); ; tMCK и интрон MHCK7, обратный праймер 5'-ACC TGT GGA GAG AAA GGC AAA G -3' (SEQ ID NO: 14); а также tMCK и интрон MHCK7, зонд 5'-6FAM-ATC AAG GTT ACA AGA CAG-GTT TAA GGA GAC CAA TAG AAA-tamra-3' (IDT) (SEQ ID NO: 15). Число копий выражается в виде геномов вектора на микрограмм геномной ДНК. *Иммуногистохимия для окрашивания иммунных клеток*. Иммуногистохимию применяли для идентификации иммунных клеток. Замороженные тканевые срезы на нагруженных предметных стеклах Fisherbrand Superfrost для микроскопа инкубировали с крысиными моноклональными антителами против мышечных моноклональных антител с применением набора для определения антител к крысиным Ig HRP (BD Pharmagen, Сан-Хосе, штат Калифорния, США; № по каталогу 551013): CD3 (№ по каталогу 555273), CD4 (№ по каталогу 550280), CD8 (№ по каталогу 550281) и Mac-3 для макрофагов (№ по каталогу 550292). Все первичные антитела разводили 1:20 физиологическим солевым раствором с фосфатным буфером. Положительное иммунное окрашивание визуализировали с применением DAB-хромагена, разбавленного в буфере DAB со стрептавидин-HRP пероксидазой, эктастаин ABC-пероксидазой. Для каждой мышцы и каждого соответствующего пятна осуществляли десять случайных изображений $\times 40$. Подсчитывали количество одноклеточных клеток и выражали их как общее количество на мм^2 .

[00160] *Иммунофлуоресценция*: криостатные срезы (12 мкм) из передней большеберцовой мышцы (TA), икроножной мышцы (GAS), четырехглавой мышцы (QUAD), большой поясничной мышцы (PSOAS), ягодичной мышцы (GLUT), трехглавой мышцы (TRI) и диафрагмальных мышц вместе с сердечной мышцей подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию на предмет трансгена hSGCB с помощью ранее использованного нами протокола, как описано в публикации Pozgai et al., Gene Therap. 23: 57-66,

<EndNote><Cite><Author>Pozsgai</Author><Year>2016</Year><RecNum>7476</RecNum>
 <DisplayText><style face="superscript">18</style></DisplayText><record><rec-number>7476</rec-number><foreign-keys><key app="EN" db-id="fwwdrsaz9epxf7erswt5vwzr950ps09xfzsd" timestamp="1468511287">7476</key></foreign-keys><ref-type name="Journal Article">17</ref-type><contributors><authors><author>Pozsgai, E. R.</author><author>Griffin, D. A.</author><author>Heller, K. N.</author><author>Mendell, J. R.</author><author>Rodino-Klapac, L. R.</author></authors></contributors><auth-address>Biomedical Sciences Graduate Program, The Ohio State University, Columbus, OH, USA.Center for Gene Therapy, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH, USA.Molecular, Cellular and Developmental Biology Graduate Program, The Ohio State University, Columbus, OH, USA.Department of Pediatrics and Neurology, The Ohio State University, Columbus, OH, USA.</auth-address><titles><title>beta-Sarcoglycan gene transfer decreases fibrosis and restores force in LGMD2E mice</title><secondary-title>Gene Ther</secondary-title><alt-title>Gene therapy</alt-title></titles><periodical><full-title>Gene Ther</full-title><abbr-1>Gene therapy</abbr-1></periodical><alt-periodical><full-title>Gene Ther</full-title><abbr-1>Gene therapy</abbr-1></alt-periodical><pages>57-66</pages><volume>23</volume><number>1</number><dates><year>2016</year><pub-dates><date>Jan</date></pub-dates></dates><isbn>1476-5462 (Electronic)0969-7128 (Linking)</isbn><accession-num>26214262</accession-num><urls><related-urls><url>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26214262</url></related-urls></urls><electronic-resource-num>10.1038/gt.2015.80</electronic-resource-num></record></Cite></EndNote>.

Срезы инкубировали с мышинным моноклональным первичным антителом к бета-саркогликану человека (Leica Biosystems, Нью-Касл, Великобритания; № по каталогу NCL-Lb-SARC) при разведении 1:100. С помощью камеры Zeiss AxioCam MRC5 производили четыре случайных 20-кратных снимка, охватывающих четыре разных квадранта мышечного сечения. Для каждого изображения определяли процент волокон, положительных по окрашиванию на бета-саркогликан (> 50% интенсивности окрашивания мышечной мембраны), и усредняли для каждой мышцы.

[00161] *Морфометрический анализ*. Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) проводили для анализа на криосрезе мышц (толщина 12 мкм) 7-месячных мышей C57BL6 WT (n=5), *sgcb*^{-/-} мышей (n=5) и 7-месячных мышей *sgcb*^{-/-}, получавших rAAV.MHCK7.hSGCB (n=5). Процент миофибрилл с центральными ядрами определяли в мышцах TA, GAS, QUAD, PSOAS, GLUT, TRI и мышцах диафрагмы. Кроме того, в мышцах GAS, PSOAS и TRI измеряли диаметр мышечных волокон. С помощью камеры Zeiss AxioCam MRC5 выполняли четыре случайных 20-кратных снимка каждой мышцы у одного животного. Волокна с центральным ядром количественно определяли с помощью программного обеспечения NIH ImageJ, а диаметры волокон измеряли с помощью программного обеспечения Zeiss Axiovision LE4.

[00162] *XLaser-мониторинг активности в камере «открытое поле»*: Данные активности в камере «открытое поле» использовали для определения общей активности экспериментальных мышей. Мышей в возрасте 7 месяцев из контрольных групп C57BL6 WT (n=6) и мышей *sgcb^{-/-}*, не получавших лечения (n=6), вместе с мышами *sgcb^{-/-}* в возрасте 6 месяцев, получавшими rAAV.MHCK7.hSGCB (n=6), анализировали в соответствии с ранее описанным протоколом (Kobayashi et al., Nature 456: 511-5, 2008, Beastrom et al., Am. J. Pathol. 179: 2464-74, 2011) с некоторыми модификациями. Всех мышей тестировали в одно и то же время дня ранним утром ближе к концу ночного цикла, когда мыши были наиболее активными. Всех мышей тестировали в изолированной комнате при тусклом свете и каждый раз с одним и тем же хэндлером. Чтобы уменьшить беспокойство и свести к минимуму поведенческие переменные, которые потенциально могут повлиять на нормальную активность мышей и, следовательно, на результаты анализа, тестируемых мышей не размещали отдельно (Voikar et al., Genes Brain Behav. 4: 240-52, 2005). Мониторинг активности мышей проводили с помощью системы активности фотолучевого излучения (San Diego Instruments, Сан-Диего, штат Калифорния, США). Эта система использует сетку невидимых инфракрасных световых лучей, которые проходят через камеру для животных спереди назад и слева направо для отслеживания положения и движения мыши в плоскости XYZ. Активность регистрировали в течение 1-часового цикла с 5-минутными интервалами. Мышей акклиматизировали в комнате для тестирования активности на начальную 1-часовую сессию за несколько дней до начала сбора данных. Мышей тестировали в индивидуальных камерах по 4 животных. Тестовое оборудование очищали между каждым использованием, чтобы уменьшить реакционные поведенческие переменные мыши, которые могли повлиять на полученные результаты. Собранные данные преобразовывали в рабочий лист Microsoft Excel, и все расчеты выполняли в программе Excel. Отдельные разрывы луча для движения в плоскостях X и Y добавляли для каждой мыши, чтобы представить общее перемещение, а разрывы луча в плоскости Z добавляли, чтобы получить вертикальную активность в течение 1-часового интервала времени.

Пример 2 Конструкция scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB

[00163] Была сконструирована трансгенная кассета, содержащая полноразмерную кДНК SCGB человека с оптимизированными кодонами, как продемонстрировано на Фиг. 1. Кассета включает консенсусную последовательность Kozak (CCACC), химерный интрон SV40, синтетический сайт полиаденилирования и мышечно-специфичный MHCK7, применяемый для управления экспрессией указанной кассеты. Это промотор на основе MCK, который использует энхансер длиной 206 п.о., взятый из ~ 1,2 т.о. 5' сайта начала транскрипции в гене эндогенной мышечной креатинкиназы с проксимальным промотором(enh358MCK, 584 п.о.)³ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA 12. Кассета упаковывали в самокомплементарный (sc) вектор AAVrh.74, который является на 93% гомологичным AAV8. Было продемонстрировано, что AAVrh.74 является безопасным и эффективным для мышей и приматов, не относящихся к человеку, особенно при

проникновении через сосудистый барьер при доставке в мышцы системой кровообращения (17, 18, 21).

Пример 3 Долгосрочная эффективность системной доставки высоких доз scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB

[00164] После существенных результатов предыдущих исследований с общей дозой $1,0 \times 10^{12}$ гв ($5,0 \times 10^{13}$ гв/кг) scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, вектор доставляли посредством инъекции в хвостовую вену 6 мышам SGCB^{-/-} в высокой дозе $3,0 \times 10^{12}$ гв/кг общей дозы ($2,0 \times 10^{14}$ гв/кг) для оценки экспрессии трансгена и эффективности вектора при системной доставке в долгосрочный момент времени 24 недели. Мышам осуществляли инъекцию в возрасте 4-5 недель, и полную некропсию выполняли на всех 6 мышцах через 24 недели после инъекции. Для анализа отбирали следующие мышцы: ТА, икроножная мышца, четырехглавая мышца, ягодичная мышца, большая поясничная мышца, трехглавая мышца, мышца диафрагмы и сердца. Органы также удаляли для токсикологических исследований и исследований биораспределения. Вкратце, экспрессия трансгена hSGCB была такой же высокой (98,77% по всем мышцам) после 24 недель лечения этой высокой дозой по сравнению с ранее изученной нами дозой (98,10% по всем мышцам), и при этом все мышцы мышей, получавших лечение, снова были почти полностью трансдуцированы. Это сопровождалось улучшением гистопатологической картины мышц и улучшением их функции.

Экспрессия β-саркогликана

[00165] Иммунофлуоресцентное (IF) окрашивание β-саркогликана человека применяли для определения экспрессии трансгена hSGCB в шести скелетных мышцах, в дополнение к мышцам диафрагмы и сердца всех мышей KO, которым вводили системную инъекцию вектора hSGCB. Эти мышцы включали ТА, икроножную мышцу (GAS), четырехглавую мышцу (QUAD), ягодичную мышцу (GLUT), большую поясничную мышцу (PSOAS) и трехглавую мышцу (TRI). В целях анализа экспрессии и эффективности трансдукции для количественной оценки учитывали изображения мышц шести мышей, получавших лечение. Для каждой мышцы было получено четыре 20-кратных изображения, и для каждого изображения был определен процент положительных на hSGCB волокон, в результате чего получали средний процент трансдукции для каждой мышцы; эти данные представлены в Приложении С. Результаты, продемонстрированные на нижней панели на Фиг. 2А, являются репрезентативными изображениями от пролеченных мышей и еще раз демонстрируют $\geq 98\%$ трансдукции во всех проанализированных мышцах, включая мышцы диафрагмы и сердца. Наконец, вестерн-блоттинг, также изображенный на Фиг. 2В, демонстрирует экспрессию hSGCB в мышцах ТА и TRI, аналогичную той, которая была достигнута после введения начальной клинической дозы.

Гистопатологическая характеристика мышцы, которая подвергалась воздействию

[00166] Как обсуждалось ранее, мышцы мышей SGCB^{-/-}, как скелетные, так и

сердечные, демонстрируют широко распространенную миопатию, включая выраженную атрофию и гипертрофию миофибрилл с множественными очагами некроза. Также присутствует увеличивающееся количество очагов воспалений со скоплением моноклеарных клеток (лимфоцитов и макрофагов с одиночными нейтрофилами) и усиление дистрофической кальцификации, жировой инфильтрации, центральной нуклеаризации и фиброза. Окрашивание гематоксилином и эозином на Фиг. 3 ниже иллюстрирует этот дистрофический фенотип у мышей $SGCB^{-/-}$ по сравнению с нормальными мышами дикого типа и улучшение гистопатологических характеристик мышц после лечения. Количественная оценка гистологических параметров демонстрирует снижение центральной нуклеаризации (CN) в различных скелетных мышцах в результате переноса гена β -саркогликана. Более глубокий анализ гистопатологической картины мышц демонстрирует нормализацию распределения волокон по размерам, сопровождаемую увеличением среднего диаметра волокон у больных мышей, получавших вектор, во всех трех исследованных мышцах (икроножной, поясничной и трехглавой) (Фиг. 3).

Функциональная оценка системной доставки

[00167] Чтобы определить, обеспечивает ли перенос гена hSGCB в высокой дозе еще большее функциональное преимущество для пораженной мышцы, необходимо изучить функциональные свойства мышцы диафрагмы от мышей $SGCB^{-/-}$, получавших высокие дозы scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Анализ гистопатологических характеристик продемонстрировал функциональный дефицит мышц диафрагмы и сердца у мышей $SGCB^{-/-}$. Диафрагмальные мышцы мышей КО по β -саркогликану продемонстрировали снижение удельной выходной силы на 50,9% по сравнению с мышами BL6 WT (116,24 мН/мм² против 236,67 мН/мм²). После доставки в хвостовую вену высокой дозы scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, приводящей к почти 100% экспрессии hSGCB в диафрагме, получали восстановление удельной выходной силы диафрагмальной мышцы, которая улучшилась до 259,97 мН/мм² (n=6) (Фиг. 4). Эти данные демонстрируют, что перенос гена hSGCB в высоких дозах действительно обеспечивает большую функциональную пользу пораженным мышцам, дефицитным по β -саркогликану.

[00168] Чтобы определить, обеспечивает ли терапия высокими дозами AAV.hSGCB общий функциональный эффект для больных мышей $SGCB^{-/-}$, как это произошло с доставкой нашей клинической дозы, и улучшается ли в конечном итоге фенотип мышей $SGCB^{-/-}$, во всех группах мышей проводили лазерный мониторинг активности в камере «открытое поле». Графики на Фиг. 5 ниже демонстрируют значительное снижение на 58,6% общего передвижения в плоскостях x и y, а также уменьшение вертикального подъема задних конечностей на 48,9% у мышей КО по сравнению с WT. Мыши, получавшие высокие дозы scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, были в целом более активными по сравнению с КО при качественном наблюдении, что было проиллюстрировано количественной оценкой активности, когда общее передвижение увеличивалось на 36,2%, а вертикальное поднятие задних конечностей увеличивалось на 39,0% у мышей,

получавших МСНК7 (n=6 на группу) (Фиг. 5).

[00169] Внутривенная инъекция scAAVrh.74.МНСК7.hSGCB в более высокой дозе, равной $3,0 \times 10^{12}$ гв общей дозы ($2,0 \times 10^{14}$ гв/кг), приводит к почти полной трансдукции и восстановлению экспрессии hSGCB в скелетных мышцах конечностей, диафрагме и, что особенно важно, в сердечной мышце ($\geq 98\%$) (Фиг. 2). Тот факт, что высокие уровни трансдукции были достигнуты во всех мышцах по всему телу при применении относительно низких доз ($5,0 \times 10^{13}$ гв/кг и $2,0 \times 10^{14}$ гв/кг) благодаря самокомплементарному вектору AAV и серотипу rh.74, дает большие надежды на возможность применения этой терапии у пациентов с LGMD2E. Картина тяжелой дистрофической патологии, наблюдаемая во всех мышцах в отсутствие β -саркогликана, значительно улучшилась после лечения (Фиг. 3). Эти процессы способствовали наблюдаемому увеличению удельной выходной силы диафрагмальных мышц и увеличению активности мышечной массы в камере «открытое поле» (Фиг. 4, 5).

Пример 4 Токсикология и биораспространение векторов

[00170] Целью этого исследования было оценить любую потенциальную токсичность или проблемы безопасности генной терапии SGCB у самцов и самок мышей SGCB^{-/-} через 24 недели после доставки тестируемого препарата scAAVrh.74.МНСК7.hSGCB. Тестируемый препарат вводили в общей дозе $3,0 \times 10^{12}$ гв ($2,0 \times 10^{14}$ гв/кг) внутривенно (в/в) мышам SGCB^{-/-} в возрасте 4-5 недель в общем объеме 520 мкл, разделенном на две инъекции по 260 мкл каждая с интервалом 5 часов для достижения желаемой дозы. Для оценки безопасности нашего вектора, окрашивание гематоксилином и эозином выполняли на криосрезе мышечной ткани и всех прилегающих органов, отобранных у группы из шести мышей SGCB^{-/-}, получавших вектор вместе с двумя животными WT и двумя животными KO, взятых в качестве контроля, которым вводили LRS (Таблица 1).

Таблица 1: Дизайн исследования безопасности scAAVrh.74.МНСК7.hSGCB

Группа	Генотип	Титр вектора (гв, общая доза)	Мышь №.	Пол	Возраст на момент инъекции	Возраст на момент некропсии
1	SGCB ^{-/-}	$3,0 \times 10^{12}$	785	Мужской	4 недели	28 недель
			786	Женский	4 недели	28 недель
			787	Женский	4 недели	28 недель
			788	Мужской	4 недели	28 недель
			789	Мужской	4 недели	28 недель
			790	Мужской	4 недели	28 недель
2	SGCB ^{-/-}	Нет	1	Мужской	Н/Д	28 недель
			2	Мужской	Н/Д	28 недель
3	Дикого типа	Нет	1	Мужской	Н/Д	28 недель
			2	Мужской	Н/Д	28 недель

[00171] Затем эти среза были надлежащим образом оценены ветеринарным

патологом на предмет токсичности, и в большинстве образцов от любой из мышей никаких нежелательных эффектов не было обнаружено, за исключением нескольких очагов гепатитных поражений в печени двух пролеченных мышей (№ 789 и № 790). Экспрессию белка и биораспределение вектора также оценивали с помощью кПЦР и вестерн-блоттинга, и эти данные указывают на отсутствие экспрессии трансгена hSGCB в любой немышечной ткани, за исключением печени мышей № 785 и № 787.

Гистопатологическая характеристика трансдуцированной вектором ткани

[00172] Для того, чтобы определить безопасность и токсикологический профиль дозы $2,0 \times 10^{14}$ гв/кг scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, вводимой посредством системной доставки, различные скелетные мышцы, включая диафрагму, а также сердце и пять других органов, были взяты от группы мышей SGCB^{-/-}, получавших вектор, и от контрольной группы, а срезы H&E каждой ткани надлежащим образом оценивались независимым ветеринарным патологом. Информация о группе и дизайн исследования приведены в Таблице 1 ниже.

[00173] Когорты по дозам scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB для гистопатологических исследований. Двум мышам BL6 WT и двум мышам SGCB^{-/-} инъекционно вводили LRS, чтобы они служили надлежащим контролем соответствующего возраста. Шесть мышей SGCB^{-/-} получили общую дозу $3,0 \times 10^{12}$ гв внутривенно. Мышей умерщвляли через 24 недели после инъекции в конечном возрасте 28 недель.

[00174] Таким образом, внутривенное введение высокой дозы scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB не вызывало каких-либо микроскопических изменений в миофибриллах каких-либо исследованных скелетных мышц. Любые отмеченные изменения наблюдались как у пролеченных, так и у контрольных мышей и считались случайными находками. Кроме того, в большинстве немышечных тканей никаких поражений, связанных с лечением, не наблюдалось, что оценивали гистологически, за исключением того, что в печени мышей № 789 и № 790 были обнаружены небольшие очаговые воспалительные поражения.

[00175] Для дальнейшей оценки клинической функции печени оценивали уровни печеночных ферментов в сыворотке мышей. У двух мышей BL6 WT и двух мышей SGCB^{-/-}, не получавших лечение, вместе с шестью мышами, получавшими scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, анализировали уровни аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) для того, чтобы определить, являются ли они повышенными по сравнению с нормальными уровнями. В таблице 2 ниже приведены данные мышей SGCB^{-/-}, не получавших лечение, с повышенными уровнями ALT и AST со средним показателем 288 Ед/л и 784,5 Ед/л соответственно, что выходит за пределы нормального диапазона у здоровых мышей. Однако у мышей SGCB^{-/-}, которым вводили дозу AAV, средний уровень ALT и AST не был повышен и находился в нормальном диапазоне 89,5 Ед/л и 330,75 Ед/л для ALT и AST соответственно.

[00176] Взятые вместе, эти данные указывают на то, что этот тестируемый препарат хорошо переносился субъектами. Кроме того, по сравнению с контрольными

образцами от двух мышей SGCB^{-/-} того же возраста, не получавших препарат, независимая гистопатологическая оценка показала, что введение scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB существенно уменьшило атрофию и разрушение миофибрилл у пролеченных мышей SGCB^{-/-}, таким образом демонстрируя, что тестируемый препарат может уменьшить степень миопатии, ассоциированной с глубоким дефицитом SGCB.

Таблица 2. Анализ уровня ферментов печени в сыворотке мышей SGCB^{-/-}, системно получавших scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB

Номер мыши	Штам	Введение AAV	ALT (Ед/л)	AST (Ед/л)	Среднее ALT (Ед/л)	Среднее AST (Ед/л)
785	BSG KO	Да	71	291	89,5	330,75
786	BSG KO	Да	н/д	н/д		
787	BSG KO	Да	н/д	н/д		
788	BSG KO	Да	55	267		
789	BSG KO	Да	182	563		
790	BSG KO	Да	50	202	69	132
BL6 WT-1	BL6 WT	Нет	н/д	н/д		
BL6 WT-2	BL6 WT	Нет	69	132		
BSG KO-1	BSG KO	Нет	480	862		
BSG KO-2	BSG KO	Нет	96	707		

Нормальный диапазон ALT: 27-195 Ед/л Нормальный диапазон AST: 43-397 Ед/л

[00177] В таблице 2 представлен анализ уровней аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в сыворотке нелеченных мышей BL6 WT (n=2) и мышей SGCB^{-/-} (n=2) вместе с мышами SGCB^{-/-} получавшими scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB (n=6). Средние значения, представленные в двух крайних правых столбцах, относятся к каждой из трех когорт. Указано в единицах/л. Н/Д означает, что образцы были гемолизированы и не могли быть проанализированы.

Биораспределение генома вектора

[00178] Наличие последовательностей ДНК, специфичных для тестируемого препарата, анализировали с помощью количественного ПЦР-анализа (кПЦР) в реальном времени. Анализ биораспределения проводили на образцах тканей, собранных у четырех животных SGCB^{-/-}, которым вводили вектор. Положительным сигналом было что-либо равное или превышающее 100 копий одноцепочечных ДНК/мкг обнаруженной геномной ДНК. Ткани собирали при аутопсии и применяли наборы векторно-специфических праймерных зондов, специфичных для последовательностей промотора MHCK7. В таблице 3 показаны копии генома вектора, обнаруженные в каждом образце ткани от мышей, получавших высокую дозу (общая доза $3,0 \times 10^{12}$ гв) scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB (№ 785, 786, 789, 790), а также количество копий vg из те же образцов тканей у мышей, ранее получавших клиническую дозу (общая доза $1,0 \times 10^{12}$ гв) (№ 712, 713).

[00179] Транскрипт scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB был обнаружен на различных уровнях во всех отобранных тканях. Как и ожидалось, самые высокие уровни отмечались в скелетных мышцах и сердце. Самые низкие уровни были обнаружены в половых железах, легких, почках и селезенке. Следует отметить, что количество копий генома

вектора было одинаковым в каждой ткани при сравнении исходной клинической дозы ($5,0 \times 10^{13}$ гв/кг) с когортой, получавшей высокую дозу ($2,0 \times 10^{14}$ гв/кг). Эти данные указывают на то, что тестируемый препарат эффективно доставлялся во все исследуемые ткани мышей, которым вводили вектор.

Таблица 3. Результаты количественной ПЦР после системной доставки высокой дозы scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB у мышей SGCB-/-

Ткань	Копии генома вектора/мкг					
	$1,0 \times 10^{12}$ гв, доза		$3,0 \times 10^{12}$ гв, доза			
	№ 712	№ 713	№ 785	№ 786	№ 789	№ 790
Половые железы	1,54e+004	2,31e+004	7,27E+04	2,43E+06	2,32E+05	2,02E+05
Сердце	9,81e+005	1,23e+006	2,07E+06	3,59E+06	2,04E+06	4,60E+06
Легкое	2,34e+005	3,21e+005	4,54E+05	9,19E+05	2,55E+06	1,08E+06
Почка	1,30e+005	9,16e+004	5,46E+05	1,48E+06	2,63E+06	5,91E+05
Печень	3,51e+007	4,07e+007	7,31E+07	3,46E+07	4,75E+05	1,84E+06
Селезенка	3,30e+005	1,84e+005	5,39E+05	9,72E+05	9,87E+05	1,02E+06
Диафрагма	9,82e+005	1,29e+006	3,85E+06	4,11E+05	5,50E+06	2,57E+06
TRI	1,82e+006	1,29e+006	1,77E+06	2,21E+06	5,41E+06	2,52E+06
QD	9,20e+005	1,14e+006	1,47E+06	3,45E+06	3,79E+06	3,65E+06
GAS	1,37e+006	8,04e+005	2,06E+06	1,35E+06	7,09E+06	2,35E+06
TA	1,80e+006	1,11e+006	2,02E+06	1,15E+06	2,23E+06	2,51E+06

[00180] В таблице 3 приведены копии генома вектора органов и мышц от четырех мышей SGCB^{-/-}, получавших высокие дозы. Значения приведены в гв/мкг геномной ДНК.

[00181] Как демонстрируют приведенные выше результаты кПЦР, внутривенная доставка высокой дозы scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB приводит к распределению транскрипта вектора на различных уровнях в большинстве тканей, однако самые высокие уровни определялись в мышцах. Следовательно, целью этой части исследования было определение экспрессии белка трансгена β -саркогликана человека в указанных тканях для обеспечения функциональности специфического для мышц промотора MHCK7. Анализ вестерн-блоттинга применяли для обнаружения экспрессии β -саркогликана в образцах тканей четырех пролеченных мышей (№№ 785, 787, 789 и 790).

[00182] Экспрессию белка β -саркогликана наблюдали в различных количествах во всех образцах скелетных мышц, а также в образцах сердца, а также обнаруживали в печени мышей № 785 и № 787. (Таблица 4, Фигура 6). Для дальнейшего исследования экспрессии в печени проводили вестерн-блоттинг для определения экспрессии белка β -саркогликана в ткани печени всех шести пролеченных мышей (№№ 785, 786, 787, 788, 789 и 790). Результаты этого вестерн-блоттинга, продемонстрированные на Фиг. 6, указывают на то, что мы действительно наблюдаем экспрессию белка β -саркогликана в четырех из шести образцах печени мышей, которым вводили дозу векта (№№ 785, 786, 787 и 788). Ниже в Таблице 5 приведены подробные результаты экспрессии белка β -саркогликана у всех шести мышей, для которых выполняли вестерн-блоттинг для анализа полного биораспределения (№№ 785, 796, 787, 788, 789 и 790).

Таблица 4. Биораспределение белка β -саркогликана после системной доставки высокой дозы scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB у мышей SGCB-/-

Ткань	Номер мыши					
	785	786	787	788	789	790
ТА	X	н/д	X	н/д	X	X
GAS	X	н/д	X	н/д	X	X
DIA	X	н/д	X	н/д	X	X
СЕРДЦЕ	X	н/д	X	н/д	X	X
ПОЛОВЫЕ ЖЕЛЕЗЫ		н/д		н/д		
ЛЕГКИЕ		н/д		н/д		
ПОЧКА		н/д		н/д		
ПЕЧЕНЬ	X	X	X	X		
СЕЛЕЗЕНКА		н/д		н/д		

[00183] В Таблице 4 представлена экспрессия белка β -саркогликана в отдельных тканях от шести мышей SGCB^{-/-}, которым системно вводили $2,0 \times 10^{14}$ гв/кг scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. X указывает на экспрессию белка в соответствующей ткани. НД=анализ не проводился

[00184] Эта экспрессия в сердечной мышце с применением промотора MHCK7 очень обнадеживает при уровнях дозы, которые можно применять в клинической практике, и, учитывая высокую частоту поражения сердца при дефиците β -саркогликана у пациентов с LGMD2E, системная доставка была бы наиболее полезной для этих пациентов с клинической точки зрения. Мышей SGCB^{-/-}, которым внутривенно вводили в хвостовую вену scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB в этой предложенной высокой дозе, составляющей $3,0 \times 10^{12}$ гв общей дозы ($2,0 \times 10^{14}$ гв/кг), подвергали полной аутопсии, после чего все извлеченные мышцы и органы окрашивали H&E и отправляли на рассмотрение независимому ветеринарному патологу. В печени четырех мышей, которым вводили дозу вектора (№№ 785, 786, 787 и 788), действительно наблюдалась экспрессия трансгенного белка β -саркогликана, которая была продемонстрирована ранее при системном введении дозы (Salva et al., Mol Ther, 2007. **15**(2): p. 320-9). Сообщалось, что у двух из шести пролеченных животных (№№ 789 и 790) были очаговые поражения печени от минимальных до умеренных, однако все другие органы и мышцы, изученные у шести пролеченных мышей, не продемонстрировали никаких нежелательных эффектов. Чтобы оценить любые клинические проявления легких поражений в печени мышей № 789 и № 790, мы измерили уровни ферментов печени, аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, в сыворотке всех шести пролеченных мышей. Результаты этого эксперимента, приведенные в Таблице 4, демонстрируют, что средние уровни AST и ALT у шести пролеченных мышей находятся в пределах нормы, что указывает на отсутствие клинических отклонений в уровнях ферментов печени. В печени животных №№ 789 и № 790 обнаруживали более низкое число копий гв (Таблица 3) в дополнение к

отсутствующей экспрессии трансгенного белка β -саркогликана. Взятые вместе, эти данные указывают на то, что трансгенный белок β -саркогликана мог быть выведен из печени у этих двух животных; однако влияния на экспрессию в скелетных мышцах или на функцию печени не наблюдалось.

[00185] При высокой дозе ($2,0 \times 10^{14}$ гв/кг) действительно имела место стойкая экспрессия β -саркогликана в печени, которая не наблюдалась у животных, получавших более низкие дозы ($5,0 \times 10^{13}$ гв/кг). Никакой явной токсичности при применении любых доз не наблюдалось. Исследование инициировали с дозы NOAEL ($5,0 \times 10^{13}$ гв/кг). У пациентов тщательно контролировали печеночную токсичность, и повышение уровня печеночных ферментов эффективно купировали с помощью кортикостероидов в другом исследовании системной доставки при спинальной мышечной атрофии с применением AAV (Mendell et al., N Engl J Med 2017; 377: 1713-1722)..

Пример 5 Открытое исследование LGMD2E

[00186] Рекомбинантный AAVrh74, несущий ген SGCB человека под контролем мышечно-специфического промотора MHCK7 (scAAVrh74.MHCK7.hSGCB), доставляли однократно посредством системной инфузии через периферическую вену. При необходимости, вектор доставляют в лактатном растворе Рингера, приблизительно 10 мл/кг, с помощью инфузии в течение приблизительно 1-2 часов. Пациентам подавляли функцию надпочечников глюкокортикостероидами, при этом минимальной функции достигали через 30 дней, но в целях осторожности максимальную дозу для каждого участника снижали на 50% в течение 1 недели и снова на 50% в течение 1 недели перед прекращением.

[00187] Когорта 1 включала 3 пролеченных субъекта в возрасте от 4 до 15 лет, у которых была подтверждена мутация SGCB в обоих аллелях, которые были отрицательные на антитела к AAVrh74 и имели $> 40\%$ нормального результата теста с ходьбой на дистанцию 100 метров. Каждый из субъектов получил дозу 5×10^{13} гв/кг. Через шестьдесят дней после введения дозы выполняли пункционную биопсию передней большеберцовой мышцы и двуглавой мышцы с соответствующей анестезией под руководством анестезиолога (или анестезиста). Биопсию можно было проводить под контролем УЗИ. Каждый субъект получал преднизон в дозе 1 мг/кг за 1 день до переноса гена, дозу фиксировали на 30 дней.

[00188] Биопсии анализировали, и если $\geq 50\%$ мышечных волокон экспрессировали SGCB в ТА и двуглавой мышце всех субъектов Когорты 1, повышения дозы в Когорте 2 не осуществляли. Если эти критерии не соблюдались, субъекты в Когорте 2 получали 2×10^{14} гв/кг. Трое пациентов в Когорте 2 получали плацебо в виде лактатного раствора Рингера. Этим субъектам, получающим плацебо, будет назначаться та же доза, что и пациентам в их когорте, приблизительно через год.

Исходные измерения перед инъекцией (от Дня -60 до Дня -2)

[00189] После получения информированного согласия и завершения процедур регистрации собирали исходный анамнез пациента, включая записи обо всех

лекарственных средствах и добавках, которые принимает пациент. Исходное функциональное тестирование для установления стабильного исходного уровня сравнивали с результатами функционального тестирования, полученными в предыдущем исследовании естественного течения заболевания, для согласованности исходного тестирования. Во время скринингового визита результат теста с ходьбой на дистанцию 100 метров на время должен быть $\geq 40\%$ от прогнозируемого для включения здоровых людей контрольной группы, соответствующих по возрасту, росту и весу. Если субъект не проходит скрининг, он или она может продолжить участие в исследовании естественного течения LGMD. Следующие оценки выполняли для подтверждения возможности субъекта на участие в этом исследовании. Исходные тесты, которые необходимо было выполнить до начала лечения, включали следующие:

Исходный уровень

От Дня -60 до Дня -2 до переноса гена

Информированное согласие

Медицинский анамнез

Физикальный осмотр/жизненно важные функции

ЭКГ

MPT сердца (будет проводиться без анестезии, но если процедура плохо переносится и с учетом важности кардиологического обследования при этом заболевании, мы обсудим варианты с анестезией, применяя приемлемый протокол в Общенациональном протоколе для детей)

MPT скелетных мышц без анестезии

Тестирование на антитела (IgG и IgM) к гепатиту В, С и ВИЧ

Лабораторные тесты безопасности:

Общий анализ крови (ОАК) с подсчетом лейкоцитарной формулы и тромбоцитами

Общий белок в сыворотке

Гамма-глутамилтрансфераза в сыворотке крови (GGT)

Для мониторинга ферментов печени будет учитываться показатель GGT, а не ALT или AST, поскольку источник этих ферментов находится в пораженной мышце, где уровни могут достигать 9-10 X ВГН. ALT и AST могут меняться на 30-40% изо дня в день, что затрудняет интерпретацию. На показатель GGT не влияют мышечные заболевания^{22,23}

Общий билирубин в сыворотке

Глюкоза

Креатинкиназа (СК) (уровни СК будут определяться предпочтительно только при двухдневных визитах, но могут быть проверены при однодневном визите по усмотрению ГИ)

Креатинин/BUN

Цистатин С

Щелочная фосфатаза

Амилаза

AST

ALT

Протромбиновое время (PT), частичное тромбопластиновое время (PTT)

Электролиты (натрий, калий, хлорид, CO₂)

Анализ мочи

Связывающие антитела к гAAVrh74 в сыворотке

Связывающие антитела к β -саркогликану в сыворотке

Анализ ELISpot на капсидные белки AAVrh74 и β -саркогликан

Тест на беременность (если, по мнению исследователя, женщина имеет детородный потенциал)

Силовые тесты (ручная динамометрия) сгибателей и разгибателей колена и локтя, приводящих мышц бедра и отводящих мышц плеча

Анкеты PROMIS

Настройка с помощью оборудования для мониторинга активности

Исследование функции легких (PFT), включая спирометрию

Функциональное тестирование на время [тест на преодоление дистанции 100 метров на время, подъем по 4 ступеням, тест двигательной функции "встань и иди" с отсчетом времени]

Объем рабочей области

Оценка подвижности пациента North Star при тазово-плечевой мышечной дистрофии (NSAD)

Исходная биопсия мышц, может выполняться ультразвуковое исследование мышц верхней и нижней конечностей; выбор в зависимости от клинических данных, нацеленных на мышцу, которая будет подходящей для анализа с наименьшим риском для пациента. Субъектам, получившим отсроченное введение плацебо, вторая исходная биопсия мышц проводиться не будет.

Рентгенограмма грудной клетки

День -1

Физикальный осмотр и показатели жизненно важных функций

Начало с преднизона или аналогичного глюкокортикоида

Фотографии потенциального места инъекции

Лабораторные тесты безопасности:

Общий анализ крови (ОАК) с подсчетом лейкоцитарной формулы и тромбоцитами

Общий белок в сыворотке

Гамма-глутамилтрансфераза в сыворотке крови (GGT)

Для мониторинга ферментов печени будет учитываться показатель GGT, а не ALT или AST, поскольку источник этих ферментов находится в пораженной мышце, где уровни могут достигать 9-10 X ВГН. ALT и AST могут меняться на 30-40% изо дня в день, что затрудняет интерпретацию. На показатель GGT не влияют мышечные заболевания^{22,23}

Общий билирубин в сыворотке

Глюкоза

Креатинкиназа (СК) (уровни СК будут определяться предпочтительно только при двухдневных визитах, но могут быть проверены при однодневном визите по усмотрению ГИ)

Креатинин/BUN

Цистатин С

Щелочная фосфатаза

Амилаза

AST

ALT

Протромбиновое время (РТ), частичное тромбопластиновое время (РТТ)

Электролиты (натрий, калий, хлорид, CO₂)

Анализ мочи

Профилактическое введение преднизона

[00190] Ожидаемый антиген-специфический Т-клеточный ответ на вектор AAV ожидался в период от 2 до 4 недель после переноса гена. Одним из возможных последствий таких антигенспецифических Т-клеточных ответов был клиренс трансдуцированных клеток и потеря экспрессии трансгена. Чтобы ослабить иммунный ответ хозяина на терапию, основанную на AAV, за двадцать четыре часа до процедуры субъекты начали принимать профилактический преднизон или сопоставимый глюкокортикоид в дозе приблизительно 1 мг/кг/день внутрь с максимальной дозой 60 мг/день. При необходимости также допускалось внутривенное введение сопоставимого глюкокортикоида в приблизительной дозе 1 мг/кг/день. Лечение продолжали около месяца. Был реализован протокол постепенного снижения дозы преднизона или сопоставимого глюкокортикоида на основе иммунного ответа отдельных субъектов на перенос гена, оцененного с помощью анализа ELISpot, а также мониторинга функции печени с учетом уровня GGT.

Протокол переноса генов

[00191] Генный вектор scAAVrh74.MHCK7.hSGCB был приготовлен фармацевтом-исследователем в соответствии с Руководством по рабочим процедурам (MOOP). Непосредственно перед транспортировкой в клиническое учреждение в аптеке были выполнены соответствующие разведения тестируемого препарата. Вектор разбавляли с применением лактатного раствора Рингера и набирали в стерильные полипропиленовые шприцы на 60 мл. Документация о разведении заполнялась аптекой в соответствии со стандартным протоколом аптеки.

[00192] Шприцы, содержащие вектор, доставляли при комнатной температуре и вводили субъекту в течение 24 часов после приготовления. Обработку scAAVrh74.MHCK7.hSGCB проводили согласно стандартам соответствия для векторов с Уровнем биобезопасности 1. (Рекомендации NIH по исследованиям с применением рекомбинантных молекул или молекул синтетических кислот [Рекомендации NIH], апрель

2016 г., Департамент здравоохранения и социальных служб, Национальные институты здравоохранения, Управление научной политики, Управление биотехнологической деятельности.

[00193] Субъекты госпитализировались для переноса гена в ПИТР или в пульмонологическую ПИТР за ночь до переноса гена и были обследованы либо ГИ, либо соисследователем (ДЕНЬ -1). Субъектам назначали режим NPO (без воды и еды) после полуночи за ночь до процедуры переноса гена. Процедуры проводились в стерильных условиях в больничной палате.

[00194] Внутривенный катетер с гепариновым замком помещали в периферическую вену для доставки вектора. Второй внутривенный катетер устанавливали для использования в случае осложнения с первым местом введения. Фотографии этих участков были сделаны в день переноса гена. Вектор вводили внутривенно, пока пациент не спал. Если врач-исследователь рассценивал это необходимым, пациент получал седативные средства при сохраненном сознании согласно протоколу. Пациенту вводили дозу scAAVrh74.MHCK7.hSGCB в течение приблизительно 1-2 часов через полипропиленовые шприцы объемом 60 мл с использованием шприцевого насоса. Показатели жизненно важных функций пациента контролировали во время инфузии, каждые 15 минут в течение 4 часов и каждый час в течение оставшихся 24 часов после инфузии.

Мониторинг после переноса гена

[00195] Показатели жизненно важных функций пациента контролировали каждые 15 минут в течение 4 часов и каждый час в течение оставшихся 24 часов после инфузии. На следующий день после процедуры были проверены анализы безопасности и анализ мочи. Сопутствующие препараты и все нежелательные/серьезные нежелательные явления также отслеживались и документировались после инъекции. Субъектов выписывали через день после переноса гена (если не наблюдались побочные эффекты, вызывающие беспокойство относительно безопасности). Субъекты возвращались в исследовательский центр для последующих визитов в дни 7, 14, 30, 60, 90 и 180 и месяцы 9, 12, 18, 24, 30 и 36. Мониторинг токсичности в каждую из этих дат включал:

Физикальный осмотр и показатели жизненно важных функций

Лабораторные тесты безопасности:

Общий анализ крови (ОАК) с подсчетом лейкоцитарной формулы и тромбоцитами

Общий белок в сыворотке

Гамма-глутамилтрансфераза (GGT)* в сыворотке

Для мониторинга ферментов печени будет учитываться показатель GGT, а не ALT или AST, поскольку источник этих ферментов находится в пораженной мышце, где уровни могут достигать 9-10 X ВГН. ALT и AST могут меняться на 30-40% изо дня в день, что затрудняет интерпретацию. На показатель GGT не влияют мышечные заболевания^{22,23}

Общий билирубин в сыворотке

Глюкоза

Креатинкиназа (СК) (уровни СК будут определяться предпочтительно только при двухдневных визитах, но могут быть проверены при однодневном визите по усмотрению ГИ)

Креатинин/BUN

Цистатин С

Щелочная фосфатаза

Амилаза

AST

ALT

Протромбиновое время (PT), частичное тромбопластиновое время (PTT)

Электролиты (натрий, калий, хлорид, CO₂)

Анализ мочи

Иммунологические исследования

Оценка физиотерапевтических процедур, начиная со Дня 30 (тест с ходьбой на дистанцию 100 метров на время, силовые испытания, анкеты PROMIS, Оценка подвижности пациента North Star при тазово-плечевой мышечной дистрофии (NSAD), подъем по 4 ступеням, тест двигательной функции "встань и иди" с отсчетом времени)

Анализ мочи

Фотография места инъекции (Дни -1, 0, 1, 7, 14, 30)

Нежелательные явления (данные собирают во время всех визитов в исследовании)

ЭКГ (День 180, Месяцы 12, 24, 36)

MPT сердца и скелетных мышц (Месяцы 12, 24, 36),

Тесты функции легких (Дни 60, 180, Месяцы 12, 24, 36)

Биопсия мышц после переноса генов через 60 дней для Когорт 1 и 2 и через 2 года после лечения для всех субъектов; выбор мышц будет таким же, как и участки проведения биопсии перед лечением. Биопсия после лечения предпочтительно будет проводиться на той же стороне, если только риски не требуют проведения биопсии на противоположной конечности.

Долгосрочный мониторинг

[00196] В отношении долгосрочного мониторинга за пациентами, после переноса гена соблюдают последние рекомендации FDA. Как обсуждалось, на основании предыдущего опыта с rAAV или трансгеном, существует очень низкая вероятность отсроченных нежелательных явлений, связанных с переносом гена. Краткосрочная безопасность оценивается в течение трехлетнего периода, который включает активную фазу протокола. Если с препаратом ассоциируются вновь выявленные риски или если субъекты имеют какими-либо нежелательные явления в течение этого периода, начинается долгосрочное наблюдение в соответствии с рекомендациями FDA.

[00197] Если есть какие-либо признаки необходимости продления периода наблюдения, об этом уведомляют CBER. Всем субъектам будут предоставлены письменные инструкции о том, как связаться с главным исследователем или

координатором исследования, если у них возникнут какие-либо серьезные нежелательные явления, которые, по их мнению, могут быть связаны с исследуемым лечением или участием в исследовании. Эта информация включена в документ информированного согласия. Всем субъектам поручено уведомить главного исследователя об изменении адреса или контактной информации.

Последующее наблюдение после исследования

[00198] В отношении долгосрочного мониторинга за пациентами, после переноса гена соблюдают самые последние рекомендации FDA. Как указано в рекомендациях, этот вектор характеризуется очень низкой вероятностью отсроченных нежелательных явлений, связанных с переносом гена. Безопасность оценивается в течение трехлетнего периода после приема препарата, который включает активную фазу протокола. Если с препаратом ассоциируются вновь выявленные риски или если субъекты имеют какими-либо нежелательные явления в течение этого периода, начинается долгосрочное наблюдение в соответствии с рекомендациями FDA.

Первичный результат для клинического исследования

[00199] Это клиническое исследование фазы I, и поэтому безопасность является первичным результатом. Демонстрация экспрессии белка β -SG по результатам количественного иммунофлуоресцентного анализа или иммуноблоттинга ($\geq 20\%$ выше исходного уровня) при биопсии мышц через 8 недель.

Поисковые результаты

Улучшение результата теста с ходьбой на дистанцию 100 метров на время $\geq 10\%$ по сравнению с исходным уровнем для каждого участника через 3 года после переноса гена

Снижение СК после генной терапии будет служить поисковым результатом. Уровни СК будут определяться предпочтительно только при двухдневных визитах, но могут быть проверены при однодневном визите по усмотрению ГИ

Объем рабочей области

Ручная динамометрия разгибателей и сгибателей колена и локтя, приводящих мышц бедра и отводящих мышц плеча

Улучшение фракции выброса по данным кМРТ

МРТ скелета

Исследование функции легких (PFT), включая спирометрию

Функциональное тестирование на время [подъем по 4 ступенькам, тест двигательной функции "встань и иди" с отсчетом времени]

Оценка подвижности пациента North Star при тазово-плечевой мышечной дистрофии (NSAD)

Уровень активности, определяемый с помощью Fitbit или аналогичного устройства для мониторинга активности.

Сообщения пациента о физических функциях с помощью анкет PROMIS относительно верхних конечностей и подвижности

Когорта 1 Результаты

[00200] Все субъекты в Когорте 1 чувствовали себя хорошо во время тестирования (Субъекты 1 и 2: тестировались через 90 дней после инъекции; Субъект 3 тестировался через 60 дней после инъекции). Все пациенты продолжали чувствовать себя хорошо до 9 месяцев после инъекции. В этом исследовании было одно серьезное нежелательное явление, когда один субъект продемонстрировал повышение уровня печеночных ферментов и билирубина после прекращения приема стероидов. Это явление разрешилось путем повышения дозы стероидов. У двух субъектов был повышенный уровень печеночных ферментов, который разрешился путем повышения дозы стероидов, и при этом этот повышенный уровень вернулся к исходному значению.

[00201] Пункционную биопсию передней большеберцовой мышцы и двуглавой мышцы выполняли для количественной оценки экспрессии трансгена, сравнивая исходный уровень с уровнем в День 60 в Когорте 1. Первичным критерием оценки было повышение экспрессии белка SGCB $\geq 20\%$. Если экспрессия SGCB повышалась на $\geq 50\%$ выше исходного уровня у всех пролеченных субъектов, дозу не увеличивали. Если экспрессия SGCB составляла $< 50\%$ от исходного уровня у всех пролеченных субъектов, дозу увеличивали до 2×10^{14} гв/кг для Когорты 2 и субъектов, получавших плацебо. Биопсию через 2 года после лечения выполняли на той же мышце (ах), что и исходную биопсию, когда это было возможно. Все образцы, полученные при биопсии, были заслеплены и закодированы директором лаборатории с помощью компьютерного кода. Количественную оценку экспрессии проводили с помощью прямой иммунофлуоресценции и вестерн-блоттинга биопсий мышц. Автоматизированное программное обеспечение Bioquant® применяли для количественной оценки количества мышечных волокон, экспрессирующих SGCB. Демографические данные на исходном уровне представлены в Таблице 5.

Таблица 5: Демографические данные на исходном уровне

Субъект	Возраст (лет)	Уровни СК на исходном уровне (Ед/л)
1	13	10 727
2	4	12 826
3	13	10 985

[00202] На Фиг. 7 представлены репрезентативные изображения, которые демонстрируют устойчивую экспрессию SGCB в мышцах всех трех субъектов через 8 недель после введения вектора. В Таблице 6 представлены средняя интенсивность и процент SGCB-положительных волокон у каждого субъекта. Средняя интенсивность иммуногистохимического окрашивания для всей когорты составляла 47%, а средний процент SGCB-положительных волокон составлял 51%. На Фиг. 8 представлен вестерн-блоттинг, демонстрирующий обнаружение экспрессии β -саркогликана у трех субъектов через 90 дней после введения вектора. Данные вестерн-блоттинга демонстрируют, что

перенос гена доставляет β -саркогликан полной длины. Количественная оценка с помощью вестерн-блоттинга, представленная в Таблице 7, демонстрирует, что средняя экспрессия белка β -саркогликана увеличилась на около 36,1% по сравнению с нормальным уровнем.

Таблица 6 - Иммуногистохимия

Субъект	Средняя интенсивность	Процент SCGB-положительных волокон
1	47%	63%
2	57%	49%
3	38%	42%
СРЕДНЕЕ	47%	51%

Таблица 7 - Вестерн-блоттинг

Субъект	Средняя экспрессия бета-саркогликана (N=3) по сравнению с нормальным уровнем
1	34,7%
2	39,2%
3	34,5%
СРЕДНЕЕ	36,1%

[00203] Наличие последовательностей ДНК, специфичных для тестируемого препарата, анализировали с помощью количественного ПЦР-анализа (кПЦР) в реальном времени на собранных биоптатах мышц. Положительным сигналом было что-либо равное или превышающее 100 копий одноцепочечных ДНК/мкг обнаруженной геномной ДНК. В биоптатах мышц было обнаружено в среднем $8,4E+04$ копий вектора/мкг ДНК и 0,6 копий на ядро.

[00204] Также у каждого субъекта исследовали наличие саркогликанового комплекса. По данным вестерн-блоттинга, средняя экспрессия микродистрофина составляла 36% от нормы ($n=3$). Кроме того, экспрессию альфа-саркогликана количественно определяли с помощью иммуногистохимического анализа. Фигура 9 демонстрирует, что экспрессия бета-саркогликана у субъектов активирует саркогликановый комплекс, на что указывает экспрессия альфа-саркогликана.

[00205] Анализировали уровни креатинкиназы (СК) в крови субъекта. Как продемонстрировано в Таблице 9, среднее снижение уровней СК у субъектов составило около 82%.

Таблица 9

Субъект	Возраст	Уровни СК (Ед/л)					
		Исходный уровень	День 30	День 60	День 90	День 180	День 270
1	13	10 727	619	2257	1135	1553	2300
2	4	12 826	4795	910	2159	5070	2665
3	13	10 985	687	2061	2392	10 055	1295

Пример 6 Перенос гена β -саркогликана восстанавливает саркогликановый

комплекс на мембране

[00206] Введение scAAVrh74.MHCK7.hSGCB восстанавливало саркогликановый комплекс на мембране (Фиг. 10). На Фигуре 10 продемонстрировано восстановление экспрессии β -саркогликана, α -саркогликана, и совместная локализация как β -саркогликана, так и α -саркогликана на мембране пациента в исследовании. Совместная локализация β -саркогликана и α -саркогликана указывает на то, что scAAVrh74.MHCK7.hSGCB восстанавливает саркогликановый комплекс.

Пример 7 У пациентов с LGMD2E, получавших лечение с применением переноса гена β -саркогликана, улучшался результат теста с ходьбой на дистанцию 100 метров на время через три месяца после введения.

[00207] Применение scAAVrh74.MHCK7.hSGCB обеспечило пациентам заметное улучшение результата теста с ходьбой на дистанцию 100 метров на время всего за 3-месячный период после переноса гена (Фиг. 11). Тесты с ходьбой на время, такие как тест на преодоление дистанции 100 метров на время, применяются для измерения функции у субъектов с мышечной дистрофией. С помощью этого теста в этом исследовании измеряли исходную работоспособность пациентов по сравнению с их показателями после лечения. На Фигуре 11 продемонстрировано среднее процентное изменение по сравнению с исходным уровнем у трех субъектов в течение первых трех месяцев после переноса гена. Полученные данные показывают, что среднее увеличение более чем на 15% по сравнению с исходным уровнем через 3 месяца, демонстрируя улучшение двигательной функции после переноса гена β -саркогликана.

Пример 8 Пациенты с LGMD2E, получающие лечение с переносом гена β -саркогликана, продемонстрировали улучшенные функциональные показатели через девять месяцев после введения

[00208] Лечение scAAVrh74.MHCK7.hSGCB обеспечило пациентам очевидное улучшение через девять месяцев после системного введения scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. В функциональном исследовании участвовали три пациента. Например, в тесте на преодоление дистанции 100 метров на время на исходном уровне (до введения) у одного пациента было ограниченное разгибание и сгибание бедра при беге на 100 м. Однако через 9 месяцев после введения у того же пациента улучшилось разгибание и сгибание бедра, а также повысилась скорость бега. Кроме того, в тесте удержания верхней части тела другой пациент продемонстрировал улучшение времени подъема через 9 месяцев после введения. На исходном уровне или до введения субъекты демонстрировали слабый контроль за удержанием верхней части тела, но через 9 месяцев после введения он также улучшился. Кроме того, в тесте приподнимания из сидячего положения пациентов просили приподняться из положения сидя. У оставшегося пациента, например, отмечалось более короткое время поднятия на ноги через 9 месяцев после введения по сравнению с периодом до введения. Эти данные сведены в Таблицу 10.

Таблица 10

Субъект	Оценка	NSAD	Время	Подъем	100 м	10 м
---------	--------	------	-------	--------	-------	------

		(Δ)	приподниман ия (сек)	по 4 ступеня м (сек)	(сек)	(сек)
1	Исходный уровень	40	5,0	2,4	49,3	5
	День 270	41	4,1	2,3	43,2	4,5
2	Исходный уровень	41	3,5	2,8	49,9	5,2
	День 270	47	3,0	1,9	48,6	4,3
3	Исходный уровень	48	1,5	1,6	59,3	3,4
	День 270	54	1,2	1,3	48,4	3,2

[00209] В исследовании естественного течения заболевания с соответствующим возрастом сравнивали изменение по сравнению с исходным уровнем по NSAD, обозначенной в данном документе как «Оценка подвижности пациента North Star при тазово-плечевой мышечной дистрофии», для нелеченных субъектов (обозначенных как субъекты с естественным течением заболевания; см. Таблицу 11) и субъектов, которым вводили scAAVrh74.МНСК7. hSGCB. Как продемонстрировано на Фигурах 12А-С, у субъектов с естественным течением заболевания наблюдалось устойчивое уменьшение изменения NSAD в течение 200 дней, в то время как у получавших лечение субъектов наблюдалось устойчивое улучшение изменения NSAD в течение 270 дней (Фигуры 12А и 12С), в то время как у получавших лечение субъектов отмечалось устойчивое улучшение изменения NSAD в течение 270 дней (Фигура 12В).

Таблица 11

Субъект	Возраст (лет)
1	5
2	12
3	10
4	9
5	9

Пример 9 Составы

[00210] scAAVrh74.МНСК7.hSGCB готовили в буфере, содержащем 20 mM Трис (pH 8,0), 1 mM хлорид магния (MgCl₂), 200 mM хлорида натрия (NaCl) и 0,001% полоксамера 188. В одном варианте осуществления данного изобретения информация о составе сведена в Таблицу 12.

Таблица 12

Состав (как замороженная жидкость)	
Компонент	Концентрация
scAAVrh.74.МНСК7.hSGCB	2×10^{13} гв/мл, 5×10^{13} гв/мл или 4×10^{13} гв/мл ^a
Трис (pH 8,0)	20 mM

Хлорид магния (MgCl ₂)	1 мМ
Хлорид натрия (NaCl)	200 мМ
Полоксамер 188	0,001%

[00211] Лекарственный препарат хранят в виде замороженной жидкости при температуре ниже -60 °С. Перед клиническим применением замороженный лекарственный препарат необходимо разморозить.

[00212] scAAVrh74.МНСК7.hSGCB хранят при температуре ниже -60°C, при которой материал стабилен в условиях длительного хранения. Флаконы scAAVrh74.МНСК7.hSGCB размораживают при комнатной температуре (от 20°C до 25 °C). Размороженные флаконы с векторами протирают спиртом и помещают в шкаф биобезопасности. Состав scAAVrh74.МНСК7.hSGCB готовят в асептических условиях в шкафу биобезопасности класса II в стерильных условиях.

[00213] ScAAVrh74.МНСК7.hSGCB для внутривенной (в/в) инфузии поставляется во флаконе (2 мл на флакон). Общая доза гв рассчитывается на основе массы тела пациента. Соответствующее количество флаконов определяется для каждого пациента на основе массы тела, что эквивалентно 5×10^{13} гв/кг или 2×10^{14} гв/кг, а также титра продукта для партии scAAVrh74.МНСК7.hSGCB из 2×10^{13} гв/кг, 5×10^{13} гв/кг или 4×10^{13} гв/кг.

[00214] ScAAVrh74.МНСК7.hSGCB вводят в виде однократной внутривенной инфузии, доставляемой в течение примерно 1-2 часов с помощью шприцевого насоса в периферическую вену конечности.

Пример 10 Пожилые пациенты и долговременная устойчивость

[00215] scAAVrh74.МНСК7.hSGCB-опосредованная замена гена продемонстрировала положительные результаты при лечении LGMD-2E и других ассоциированных заболеваний. Целью исследования является анализ способности scAAVrh74.МНСК7.hSGCB воздействовать на более старые, более серьезно пораженные мышцы, а также долговременную устойчивость вирусного вектора AAV. Во-первых, в целях долгосрочного исследования устойчивости, мышам sgcb^{-/-} возрасте 4 недель системно вводили scAAVrh74.МНСК7.hSGCB. Спустя более 24 месяцев после лечения количество копий векторного генома высокого уровня было обнаружено с помощью ПЦР во всех трансдуцированных мышцах. Более того, иммунофлуоресцентное окрашивание обработанной мышцы не продемонстрировало снижения уровней экспрессии белка во всех мышцах (> 95%) по сравнению с более ранними моментами времени, при этом белок hSGCB оставался правильно локализованным на мембране.

[00216] Во-вторых, на мышиную модель LGMD2E (β-саркогликан) воздействовали более старшем возрасте (например, 12 месяцев) посредством системной доставки вектора scAAVrh74.МНСК7.hSGCB. Через 6 месяцев после лечения мышцы этих мышей оценивали на экспрессию белка, гистологическое восстановление и функциональное улучшение. В частности, наблюдалась экспрессия гена в мышцах нижней конечности,

верхней конечности и проксимальных мышцах туловища, включая диафрагму и сердце. Более того, уровень фиброза сравнивали с нелечеными контролями. Кроме того, функциональное исследование включало оценку выходной силы в передней большеберцовой (ТА) и диафрагмальной (DIA) мышце и устойчивости к повреждению, вызванному сокращением, в ТА-мышце.

[00217] Хотя в следующих примерах описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области техники будет понятно, что могут иметь место их варианты и модификации. Соответственно, на данное изобретение должны быть наложены только те ограничения, которые указаны в формуле изобретения.

[00218] Все документы, упомянутые в данной заявке, в полном объеме включены в данной документ посредством ссылок.

Список литературы:

1 Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E et al. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995; 11: 266-273.

2 Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 995-1003.

3 Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1589-1598.

4 Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL et al. Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell* 2000; 5: 141-151.

5 Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK et al. Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1953-1961.

6 Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology* 1999; 52: 176-179.

7 Sandona D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Exp Rev Mol Med* 2009; 11: e28.

8 Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. *Neuromusc Disord* 2003; 13: 303-309.

9 Sveen ML, Thune JJ, Kober L, Vissing J. Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy. *Arch Neurol* 2008; 65: 1196-1201.

10 Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA et al. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve* 1999; 22: 473-479.

11 Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology* 2014; 83: 1453-1463.

12 Wong-Kisiel LC, Kuntz NL. Two siblings with limb-girdle muscular dystrophy type 2E responsive to deflazacort. *Neuromusc Disord* 2010; 20: 122-124.

13 Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoli R, Vitali A, Felisari G et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet* 2000; 37: 102-107.

14 Gibertini S, Zanotti S, Savadori P, Curcio M, Saredi S, Salerno F et al. Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse. *Cell Tissue Res* 2014; 356: 427-443.

15 McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 2003; 10: 2112-2118.

16 McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 2001; 8: 1248-1254.

17 Chicoine LG, Rodino-Klapac LR, Shao G, Xu R, Bremer WG, Camboni M et al. Vascular delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the gastrocnemius muscle of the rhesus macaque stimulates the expression of dystrophin and laminin alpha2 surrogates. *Mol Ther* 2014; 22: 713-724.

18 Rodino-Klapac LR, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Malik V, Davis N et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* 2010; 18: 109-117.

19 Rodino-Klapac LR, Janssen PM, Montgomery CL, Coley BD, Chicoine LG, Clark KR et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* 2007; 5: 45.

20 Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther* 2008; 15: 1489-1499.

21 Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Griffin DA, Heller KN et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on micro-dystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther* 2014; 22: 338-347.

22 Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem* 1995; 118: 959-964.

23 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; 139: 375-385.

- 24 Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther* 2015; 23: 192-201.
- 25 Dressman D, Araishi K, Imamura M, Sasaoka T, Liu LA, Engvall E et al. Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1631-1646.
- 26 Rodino-Klapac LR, Lee JS, Mulligan RC, Clark KR, Mendell JR. Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D. *Neurology* 2008; 71: 240-247.
- 27 Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, Hauschka SD. E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5058-5068.
- 28 Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; 76: 791-801.
- 29 Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* 2006; 1: 1412-1428.
- 30 Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1031-1039.
- 31 Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 2005; 11: 245-256.
- 32 Hakim CH, Grange RW, Duan D. The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2- to 20-mo-old mdx mice. *J Appl Physiol* 2011; 110: 1656-1663.
- 33 Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szeghyarto CA, Maiti B, Findlay A et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat Med* 2014; 20: 992-1000.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения мышечной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий стадию введения субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, причем

rAAV вводят посредством системного пути введения и в дозе от приблизительно 1.0×10^{12} гв/кг до приблизительно 5.0×10^{14} гв/кг на основе суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения; при этом уровень сывороточной креатинкиназы (СК) у субъекта снижается после введения rAAV по сравнению с уровнем сывороточной креатинкиназы до введения rAAV.

2. Способ лечения мышечной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий стадию введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) scAAVrh74.MHCK7.hSGCB

причем уровень экспрессии гена бета-саркогликана в клетке субъекта увеличивается после введения rAAV по сравнению с уровнем экспрессии гена бета-саркогликана до введения rAAV.

причем количество положительных по бета-саркогликану волокон в мышечной ткани субъекта увеличивается после введения rAAV по сравнению с количеством положительных по бета-саркогликану волокон до введения rAAV; или

причем двигательная функция у указанного субъекта улучшается по сравнению с двигательной функцией указанного субъекта до введения rAAV, и причем двигательную функцию определяют с помощью теста с ходьбой на дистанцию 100 метров на время.

3. Способ по п.2, в котором двигательная функция улучшается по меньшей мере на 5% через 1 месяц или тридцать дней после переноса гена, по меньшей мере на 10% через 2 месяца или шестьдесят дней после переноса гена, или по меньшей мере на 15% через 3 месяца или девяносто дней после переноса гена

4. Способ по п.2 или 3, в котором двигательная функция улучшается по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45% или 50%.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором rAAV вводят внутривенно.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором rAAV вводят в количестве в дозе приблизительно 5.0×10^{13} гв/кг или приблизительно 2.0×10^{14} гв/кг на основе суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, или приблизительно 1.85×10^{13} гв/кг или 7.41×10^{13} гв/кг на основе линеаризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором rAAV вводят в концентрации приблизительно 10 мл/кг.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором rAAV вводят путем инъекции, инфузии или имплантации.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором rAAV вводят путем инфузии в течение приблизительно 1-2 часов.

10. Способ по любому из пп. 1-8, в котором rAAV вводят внутривенно в

периферическую вену конечности.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором гAAV содержит нуклеотидную последовательность β -саркогликана человека SEQ ID NO: 1.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором гAAV содержит последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 4.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором гAAV имеет серотип AAVrh.74.

14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором гAAV содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором гAAV содержит интронную последовательность SEQ ID NO: 20.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором гAAV содержит последовательность полиА SEQ ID NO: 21.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором гAAV содержит последовательность 5' инвертированного концевого повтора (ITR) SEQ ID NO: 22.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором гAAV содержит последовательность 3'-инвертированного концевого повтора (ITR) SEQ ID NO: 23.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором мышечная дистрофия представляет собой тазово-плечевую мышечную дистрофию.

20. Способ по любому из пп. 1-18, в котором мышечная дистрофия представляет собой тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2E.

21. Способ лечения тазово-плечевой мышечной дистрофии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту внутривенной инфузии гAAV в течение приблизительно 1-2 часов в дозе приблизительно $5,0 \times 10^{13}$ гв/кг или приблизительно $2,0 \times 110^{14}$ гв/кг на основе суперспиральной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, или приблизительно $1,85 \times 10^{13}$ гв/кг или $7,41 \times 10^{13}$ гв/кг на основе линейаризованной плазмиды в качестве стандарта количественного определения, и при этом гAAV содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

22. Способ экспрессии гена бета-саркогликана в клетке субъекта, включающий введение субъекту конструкции scAAVrh74.МНСК7.hSGCB, содержащей нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 19.

23. Способ увеличения положительных по бета-саркогликану волокон и/или снижения уровня СК в мышечной ткани субъекта, включающий введение субъекту нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.МНСК7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 19.

24. Способ по п.22 или 23, в котором экспрессию гена бета-саркогликана или количество положительных по бета-саркогликану волокон определяют путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью вестерн-блоттинга в биопсиях мышц до и

после введения гAAV.

25. Способ по п.22, в котором экспрессия белка бета-саркогликана увеличивается по меньшей мере на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40% после введения гAAV.

26. Способ по любому из пп. 22-25, в котором экспрессию гена бета-саркогликана или количество мышечных волокон, положительных по бета-саркогликану, определяют путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью иммуногистохимии в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

27. Способ по п.22, в котором экспрессия белка бета-саркогликана увеличивается по меньшей мере на 39% после введения гAAV.

28. Способ по п.23, в котором количество положительных по бета-саркогликану волокон в мышечной ткани субъекта увеличивается по меньшей мере на 40, 41 или 42% после введения гAAV по сравнению с количеством положительных по бета-саркогликану волокон до введения гAAV.

29. Способ по п.22, в котором клетка имеет более одной вирусной копии AAV.

30. Способ по любому из пп. 22-29, в котором уровень СК в сыворотке у субъекта снижается после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке до этого введения гAAV.

31. Способ по п.30, в котором уровень СК в сыворотке у субъекта снижается по меньшей мере на 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 или 90% за 60-90 дней, по истечению 60 дней или 90 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке до введения гAAV.

32. Способ по любому из пп. 1-31, в котором уровень альфа-саркогликана у субъекта повышается после введения гAAV по сравнению с уровнем альфа-саркогликана до введения гAAV.

33. Способ повышения экспрессии альфа-саркогликана у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту гAAV, содержащего конструкцию scAAVrh74.MHCK7.hSGCB с нуклеотидной последовательностью, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

34. Способ увеличения локализации альфа-саркогликана на клеточной мембране у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту нуклеотидной последовательности конструкции scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 19.

35. Способ по п.33 или 34, в котором альфа-саркогликан обнаруживают путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью иммуногистохимии в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

36. Способ по п.33 или 34, в котором альфа-саркогликан обнаруживают путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью вестерн-блоттинга на биоптатах мышц до и после введения гAAV.

37. Способ по любому из пп. 34-36, в котором альфа-саркогликан совместно локализован на мембране клетки, экспрессирующей бета-саркогликан, кодируемый

scAAVrh74.MHCK7.hSGCB.

38. Способ повышения экспрессии саркогликана в мышечной ткани или улучшения мышечной функции субъекта, включающий введение субъекту rAAV, содержащего нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 19.

39. Способ по п.38, в котором субъект несет генетическую мутацию в гене, кодирующем саркогликан, или страдает мышечной дистрофией.

40. Способ по п.38, в котором саркогликан представляет собой β -саркогликан (SGCB), α -саркогликан (SGCA), γ -саркогликан (SGCG) или δ -саркогликан (SGCD).

41. Способ по п.38, в котором нуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

42. Способ повышения экспрессии саркогликана в мышечной ткани субъекта, включающий введение субъекту конструкции, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую первый саркогликан, и обнаружение повышенной экспрессии по меньшей мере второго саркогликана в клеточной мембране клетки, экспрессирующей указанный первый саркогликан.

43. Способ по п.42, в котором указанный первый саркогликан представляет собой β -саркогликан (SGCB), а указанный второй саркогликан представляет собой α -саркогликан (SGCA), γ -саркогликан (SGCG) и/или δ -саркогликан (SGCD).

44. Способ по любому из пп. 1-43, в котором субъектом является человек в возрасте от 4 до 15 лет.

45. Способ по любому из пп. 1-43, в котором субъектом является субъект-ребенок, субъект-подросток или субъект молодого взрослого возраста.

46. Способ по любому из пп. 1-43, в котором субъект является человеком в возрасте 4-15 лет, имеет подтвержденную мутацию бета-саркогликана (SGCB) в обоих аллелях, был отрицательным по антителам AAVrh74 и/или имел $> 40\%$ или нормальный результат теста с ходьбой на дистанцию 100 метров.

47. Способ по любому из пп. 1-43, в котором субъектом является взрослый среднего возраста или пожилой субъект.

48. Способ по любому из пп. 1-43, в котором субъектом является субъект-человек в возрасте от 25 до 55 лет.

49. Способ по любому из пп. 1-43, в котором субъектом является субъект-человек старше 50 лет.

50. Композиция, содержащая
вектор rAAV scAAVrh74.MHCK7.hSGCB,
буферный агент,
агент ионной силы, и
поверхностно-активное вещество.

51. Композиция по п.50, в которой rAAV находится в концентрации от приблизительно $1,0 \times 10^{12}$ гв/мл до приблизительно $5,0 \times 10^{14}$ гв/мл или в концентрации от

приблизительно $5,0 \times 10^{12}$ гв/мл до приблизительно $1,0 \times 10^{14}$ гв/мл.

52. Композиция по п.50, в которой rAAV находится в концентрации приблизительно $2,0 \times 10^{13}$ гв/мл, 4×10^{13} гв/мл, 5×10^{13} гв/мл.

53. Композиция по п.50, в которой буферный агент содержит один или более из следующих компонентов: трис, трицин, бис-трицин, HEPES, MOPS, TES, TAPS, PIPES и CAPS.

54. Композиция по п.53, в которой буферный агент содержит трис с pH 8,0 в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 40 мМ.

55. Композиция по п.53, в которой буферный агент содержит трис с pH 8,0 при приблизительно 20 мМ.

56. Композиция по п.50, в которой агент ионной силы содержит один или более из следующих компонентов: хлорид калия (KCl), ацетат калия, сульфат калия, сульфат аммония, хлорид аммония (NH_4Cl), ацетат аммония, хлорид магния (MgCl_2), ацетат магния, сульфат магния, хлорид марганца (MnCl_2), ацетат марганца, сульфат марганца, хлорид натрия (NaCl), ацетат натрия, хлорид лития (LiCl) и ацетат лития.

57. Композиция по п.50, в которой агент ионной силы содержит MgCl_2 в концентрации от приблизительно 0,2 мМ до приблизительно 4 мМ.

58. Композиция по п.50, в которой агент ионной силы содержит NaCl в концентрации от приблизительно 50 мМ до приблизительно 500 мМ.

59. Композиция по п.50, в которой агент ионной силы содержит MgCl_2 в концентрации от приблизительно 0,2 мМ до окло 4 мМ и NaCl в концентрации от приблизительно 50 мМ до приблизительно 500 мМ.

60. Композиция по п.50, в которой агент ионной силы содержит MgCl_2 в концентрации от приблизительно 1 мМ до окло 4 мМ и NaCl в концентрации от приблизительно 50 мМ до приблизительно 200 мМ.

61. Композиция по п.50, в которой поверхностно-активное вещество содержит один или более из следующих компонентов: сульфонат, сульфат, фосфонат, фосфат, полоксамер и катионное поверхностно-активное вещество.

62. Композиция по п.61, в которой полоксамер содержит один или более из следующих компонентов: полоксамер 124, полоксамер 181, полоксамер 184, полоксамер 188, полоксамер 237, полоксамер 331, полоксамер 338 и полоксамер 407.

63. Композиция по п.61, в которой поверхностно-активное вещество содержит полоксамер в концентрации от приблизительно 0,00001% до приблизительно 1%.

64. Композиция по п.61, в которой поверхностно-активное вещество содержит полоксамер 188 в концентрации приблизительно 0,001%.

65. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный AAV (rAAV) scAAVrh74.МНСК7.hSGCB, причем scAAVrh74.МНСК7.hSGCB содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 19.

66. Фармацевтическая композиция по п.65, в которой scAAVrh74.МНСК7.hSGCB

содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

67. Способ получения рекомбинантного AAV scAAVrh74.MHCK7.hSGCB, включающий перенос плазмиды в клетку, причем плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 24.

68. Способ по п.83, в котором плазида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

69. Способ по п.67, в котором плазида содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 1, 3 или 19.

70. Способ по любому из пп. 67-69, в котором плазида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

71. Способ по любому из пп. 67-70, дополнительно включающий перенос упаковывающей плазмиды и/или вируса-помощника в клетку.

72. Способ по любому из пп. 67-70, в котором клетка содержит стабильно интегрированный ген cap AAV.

73. Способ по любому из пп. 67-70, в котором клетка содержит стабильно интегрированный ген гер AAV.

74. Клетка, содержащая плазмиду, которая содержит нуклеотидную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичной SEQ ID NO: 24.

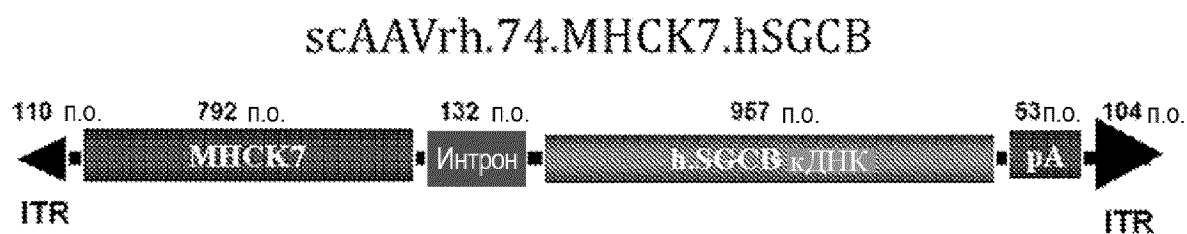
75. Клетка по п.74, в которой плазида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

76. Клетка по п.74 или 75, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

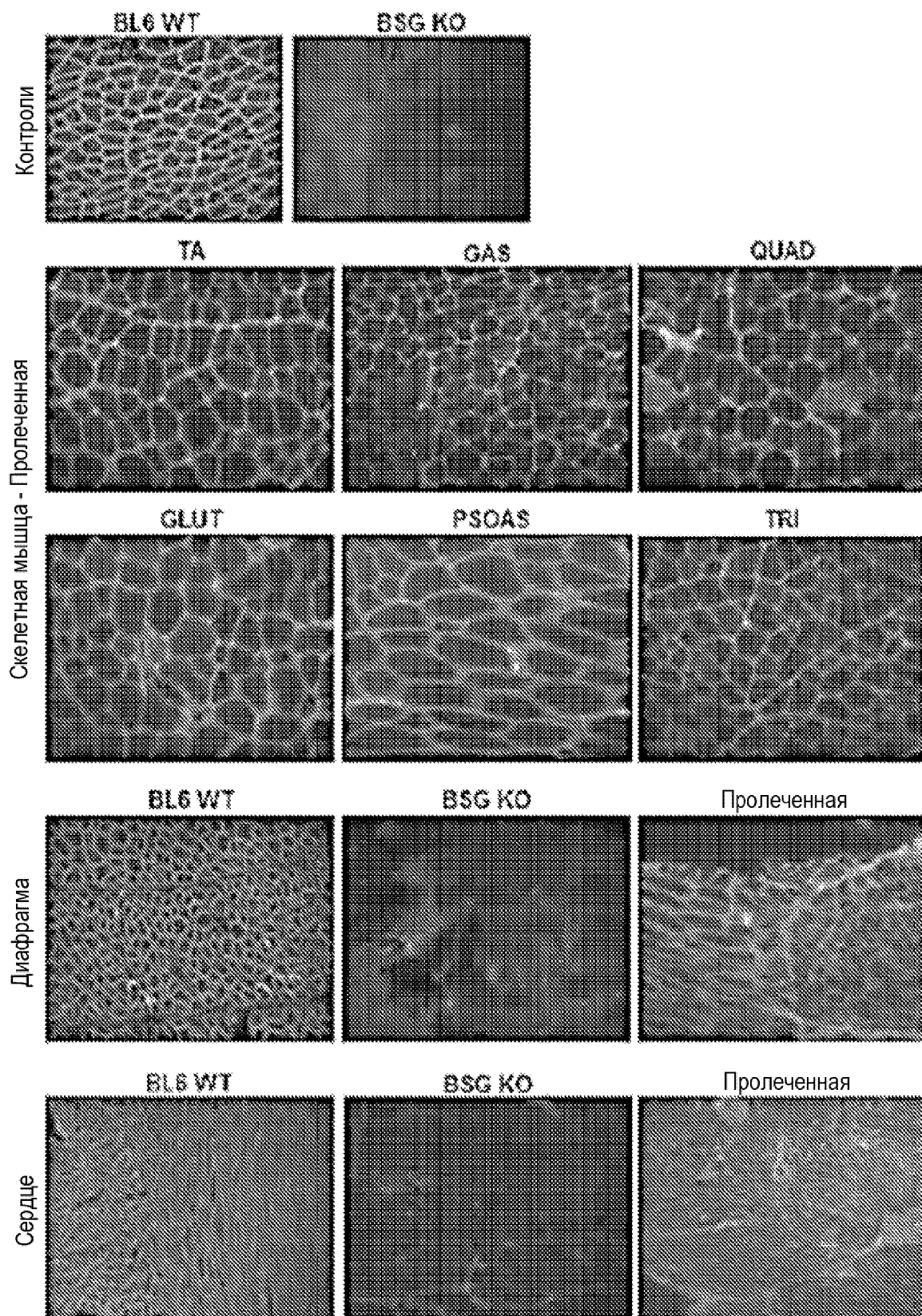
77. Клетка по любому из пп. 74-76, причем клетка представляет собой клетку насекомого, клетку комара или клетку млекопитающего.

По доверенности

Фиг. 1



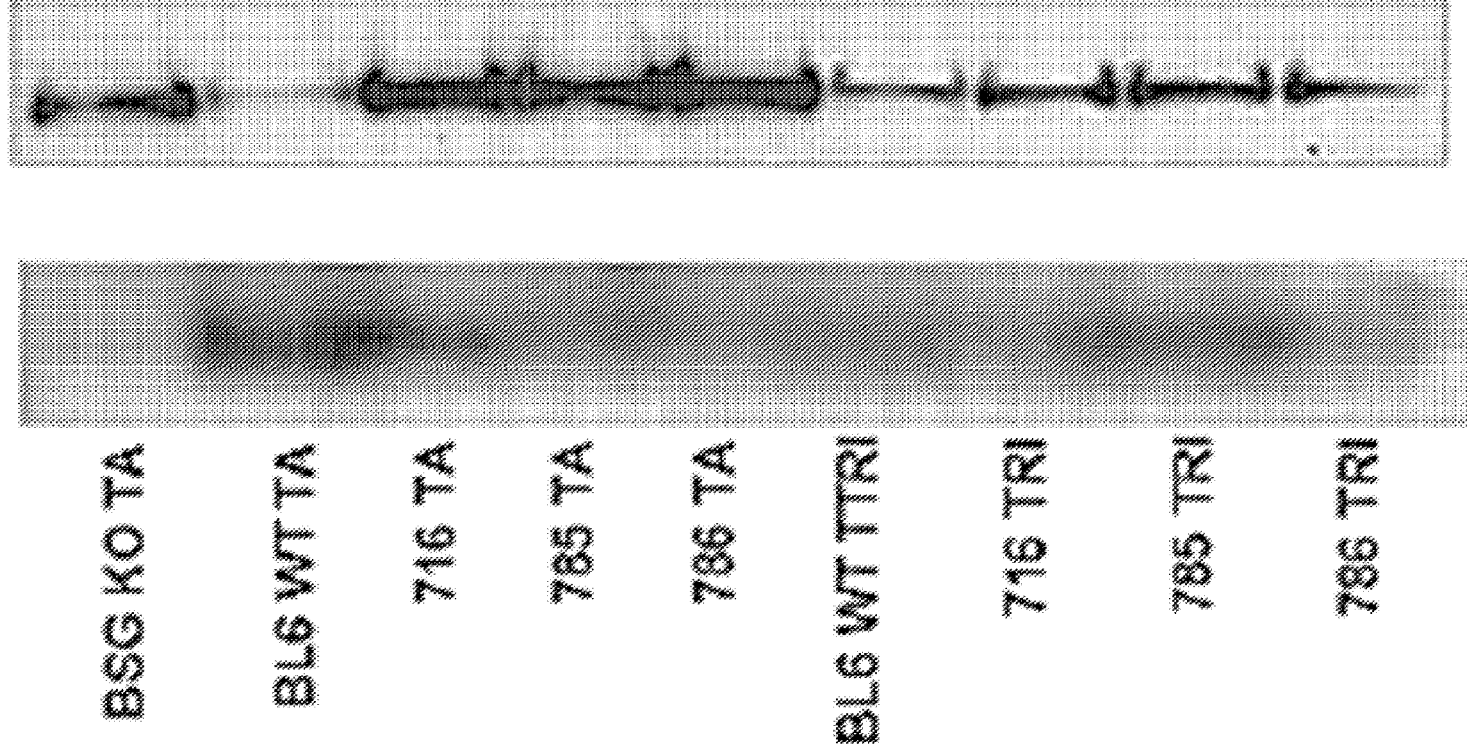
Фиг. 2А



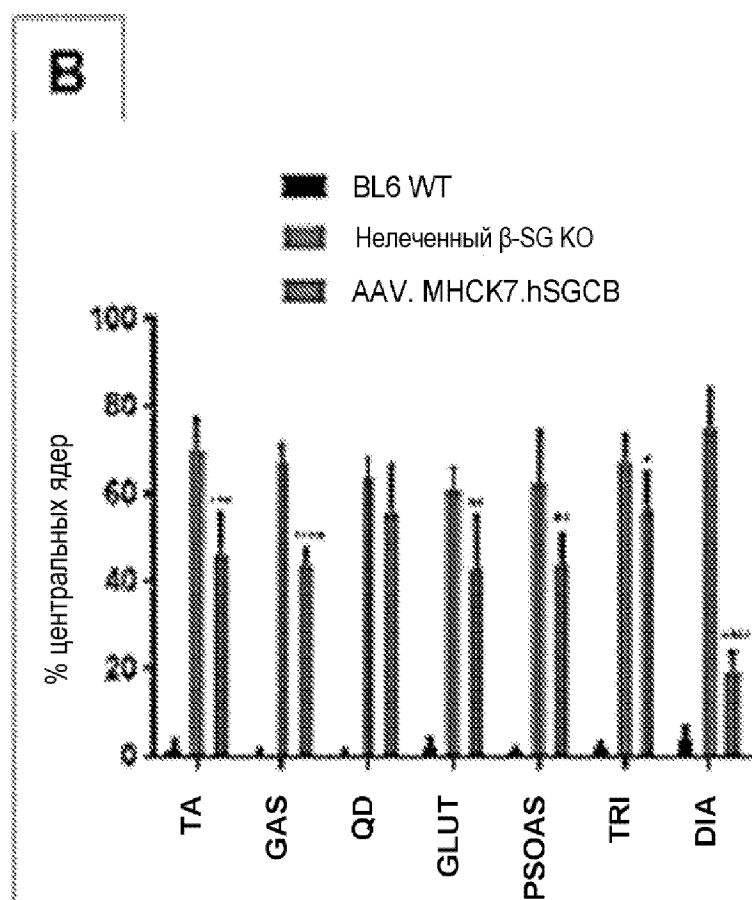
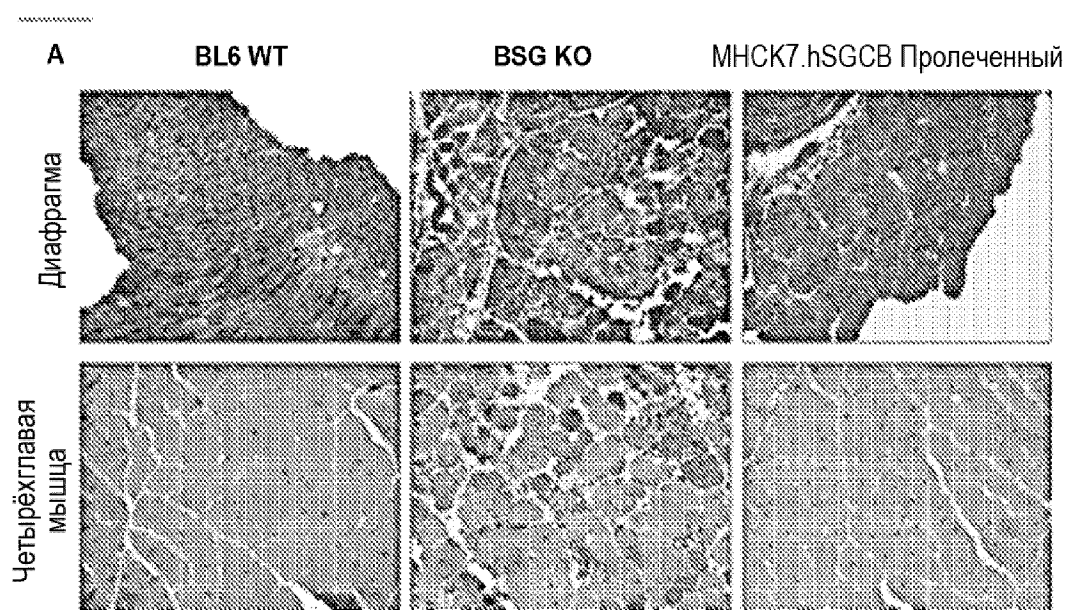
Фиг. 2В

100 кДа

43 кДа

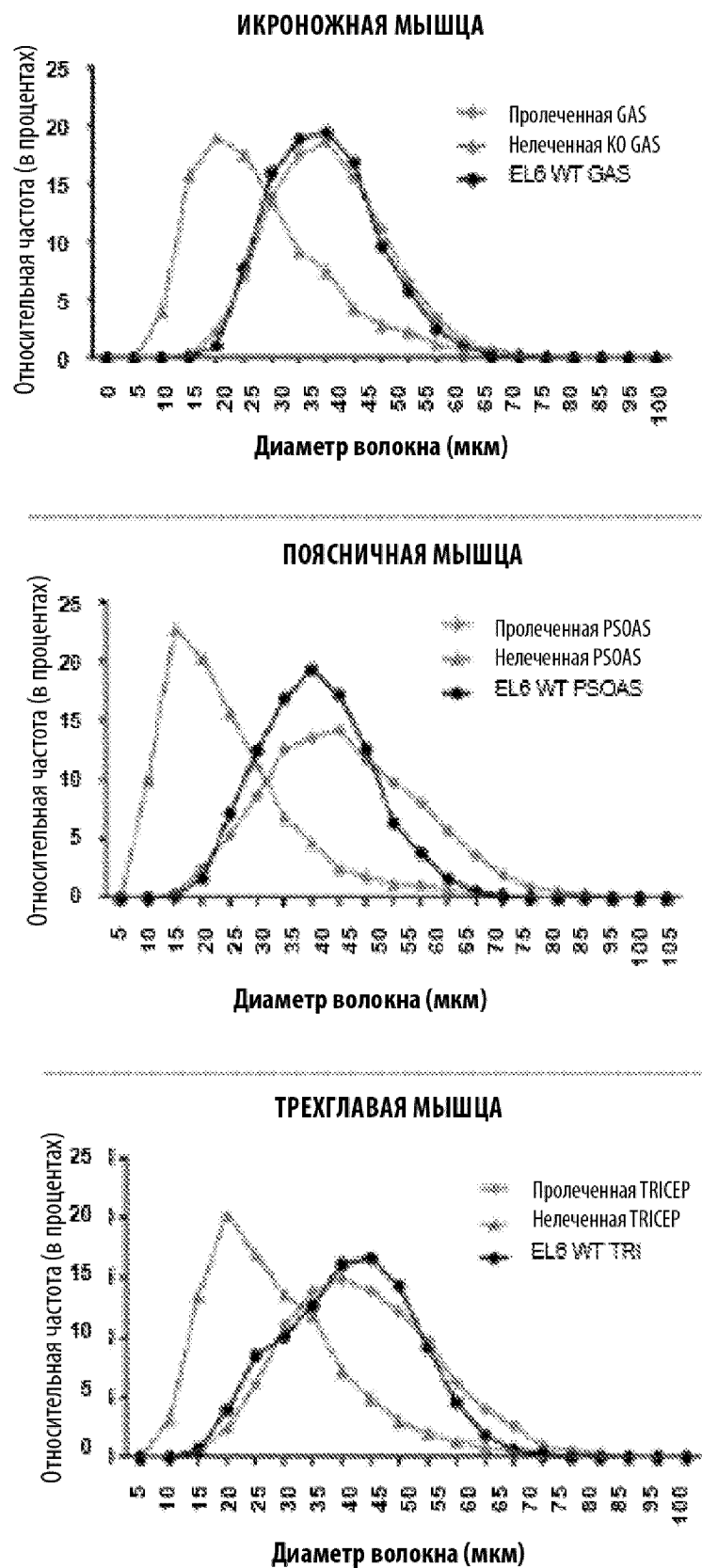


Фиг. 3



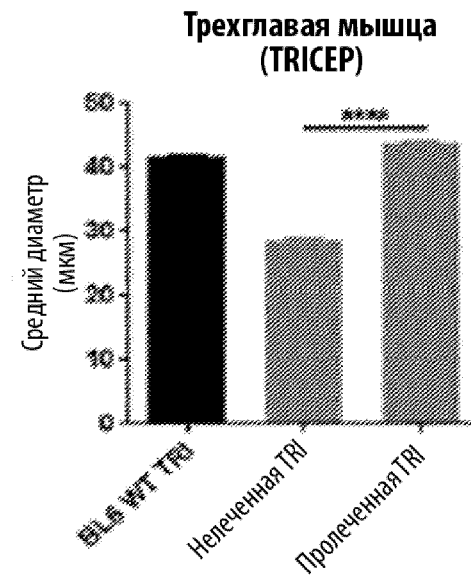
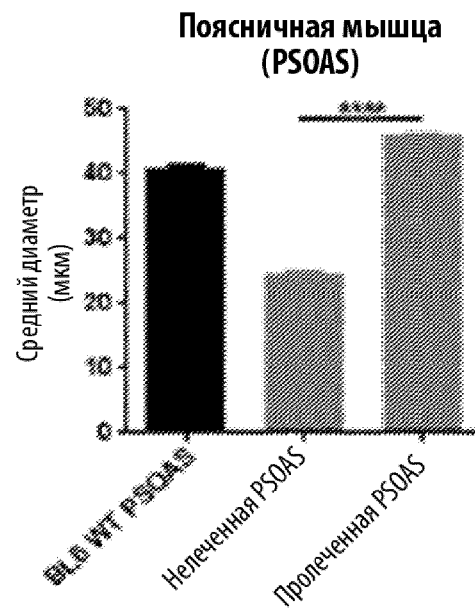
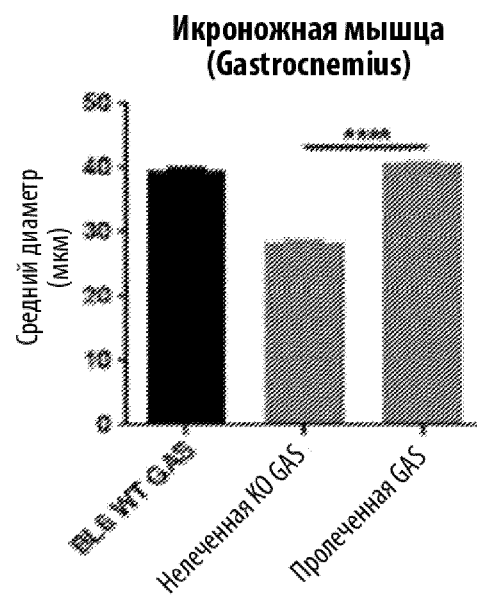
Фиг. 3

С

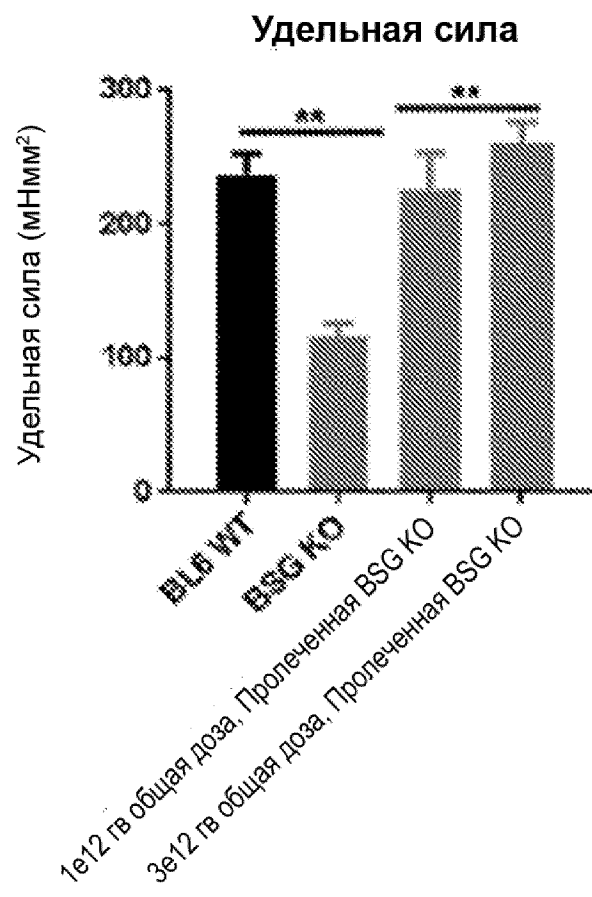


Фиг. 3

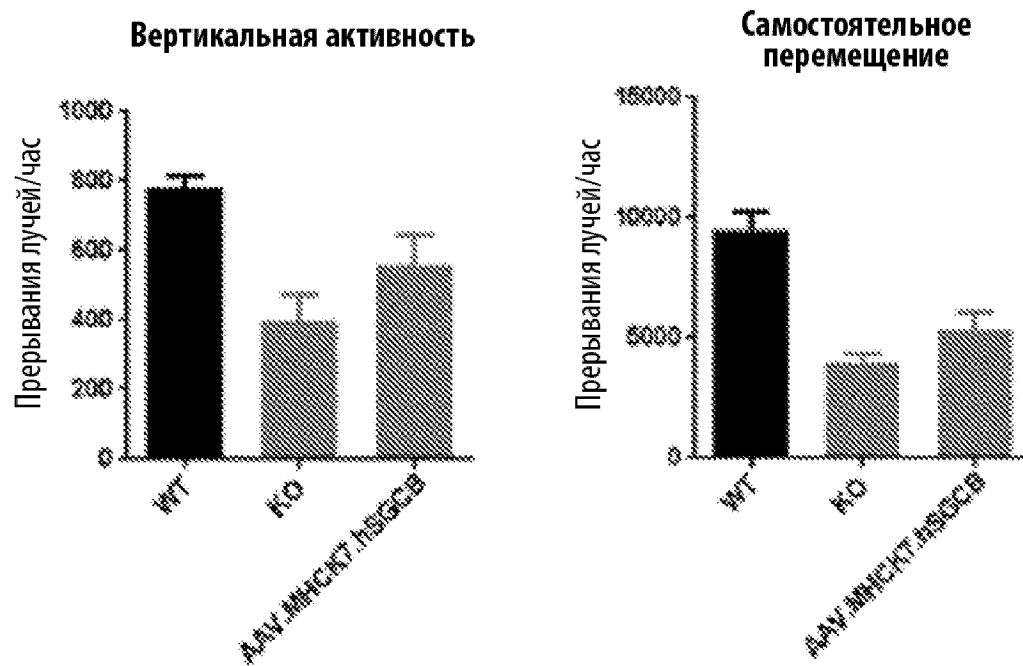
D



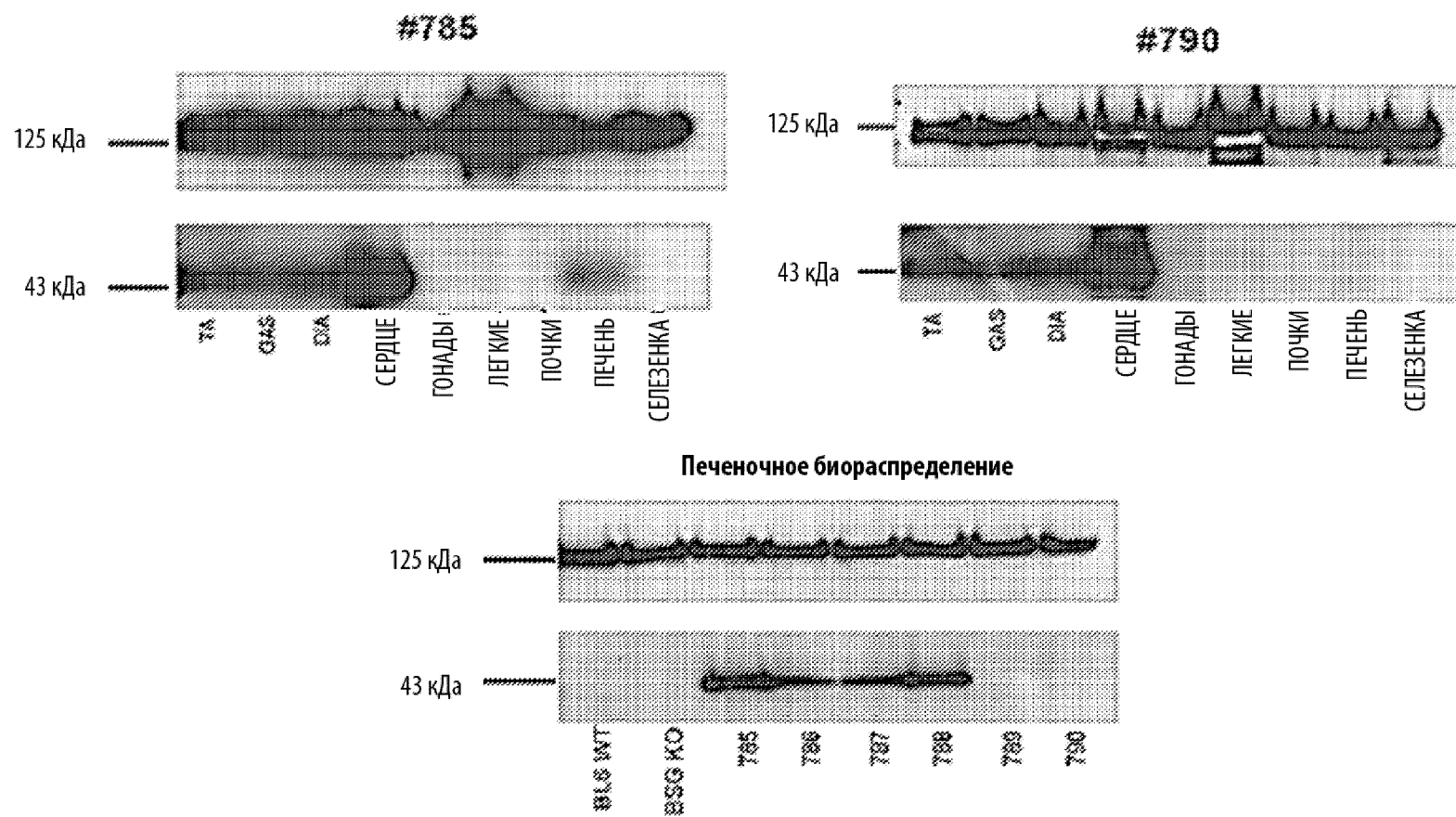
Фиг. 4



Фиг. 5

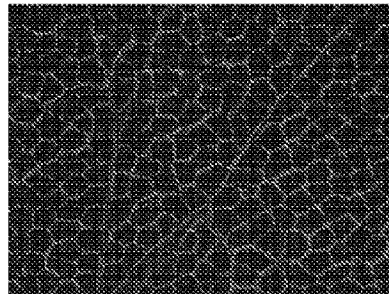


Фиг. 6

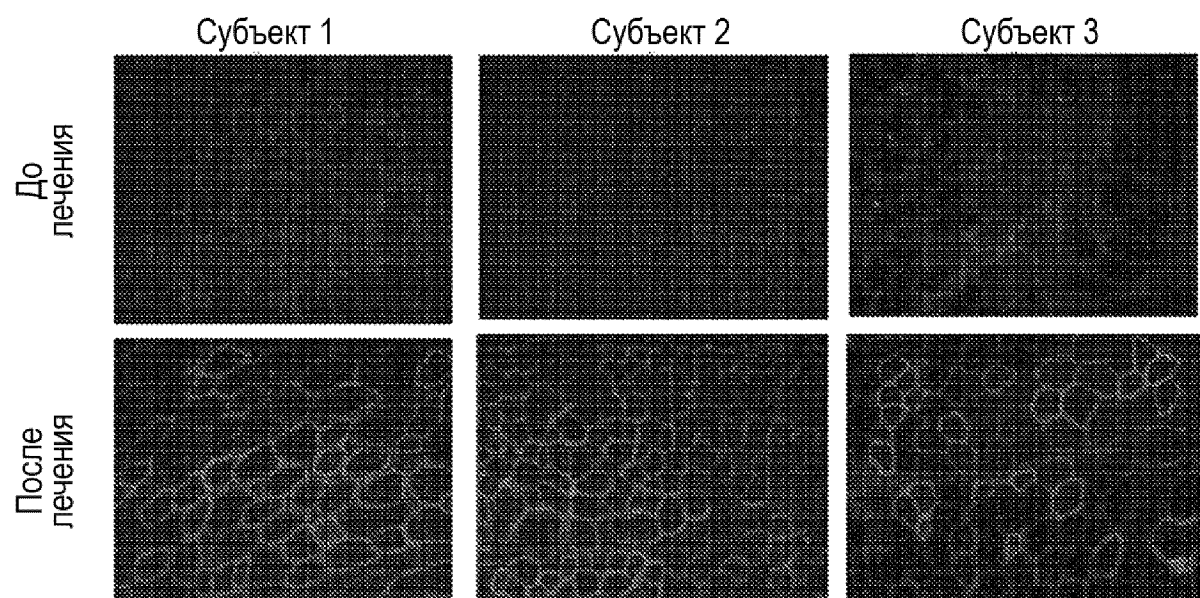


Фиг. 7

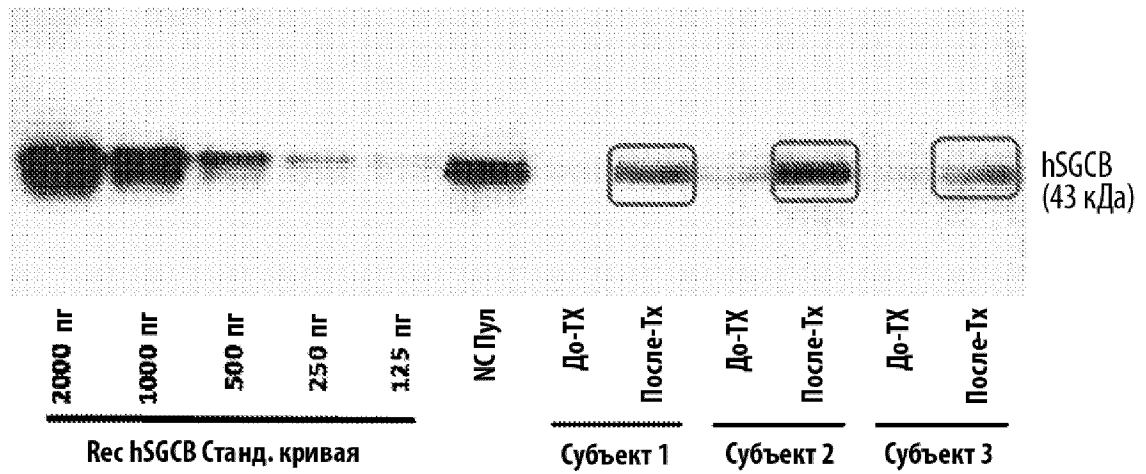
Нормальный контроль



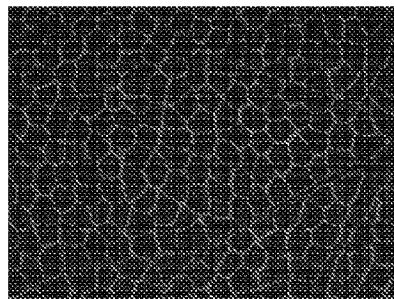
Экспрессия бета-саркогликана (ИНС)



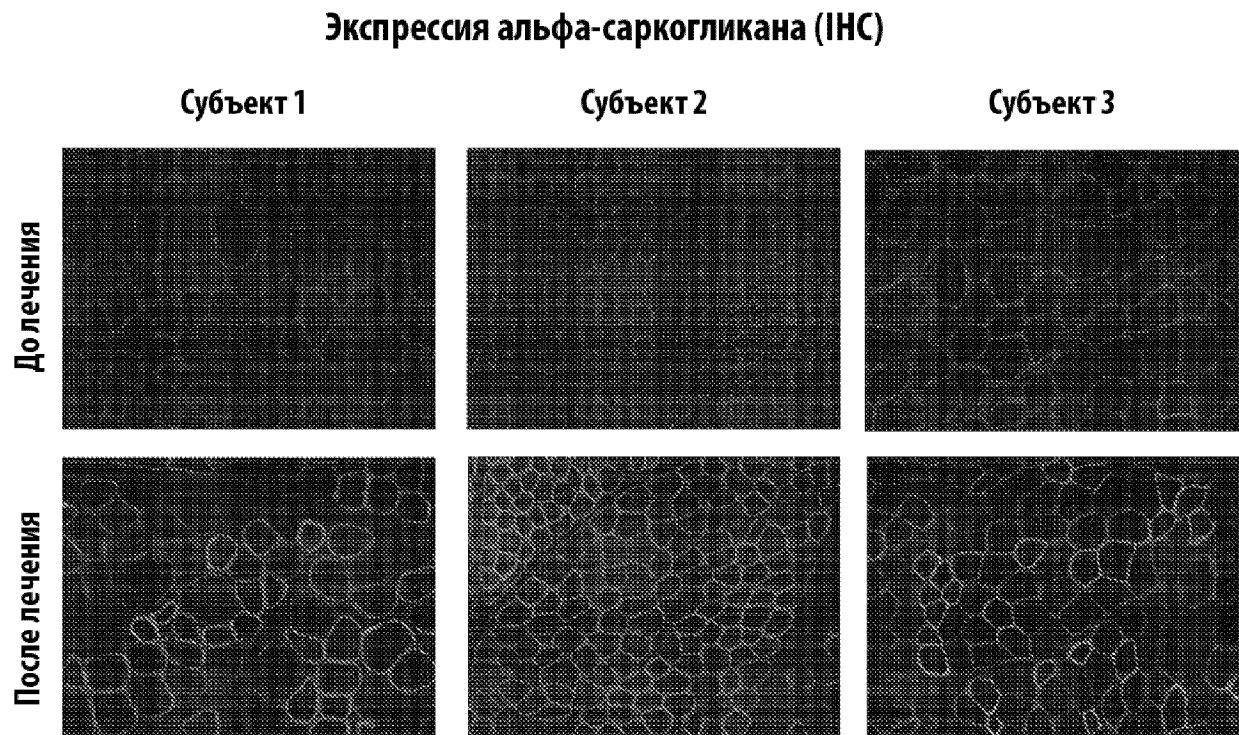
Фиг. 8



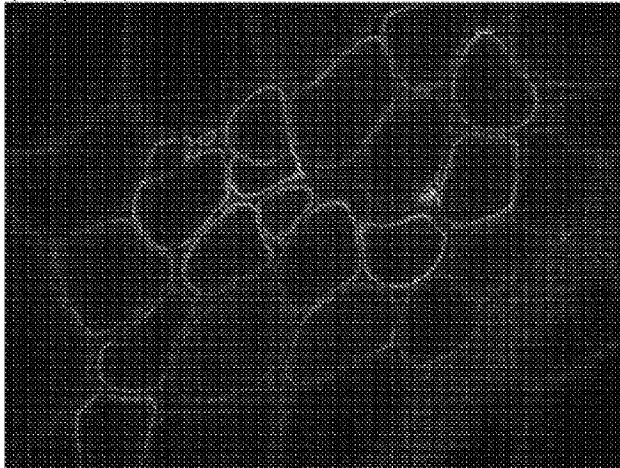
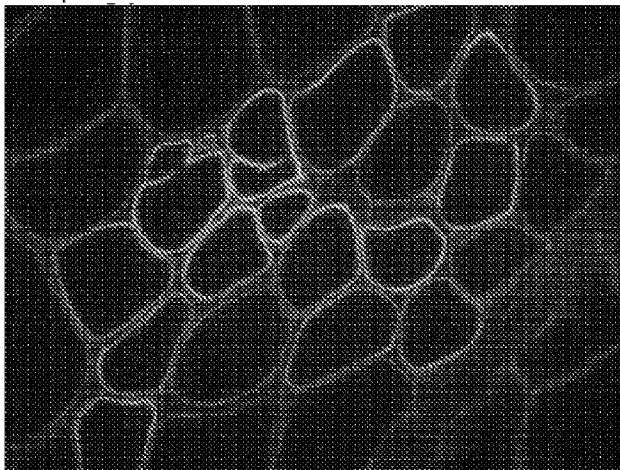
Нормальный контроль



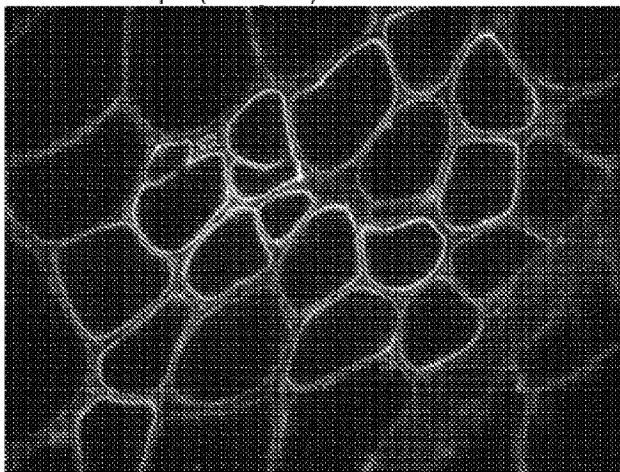
Фиг. 9



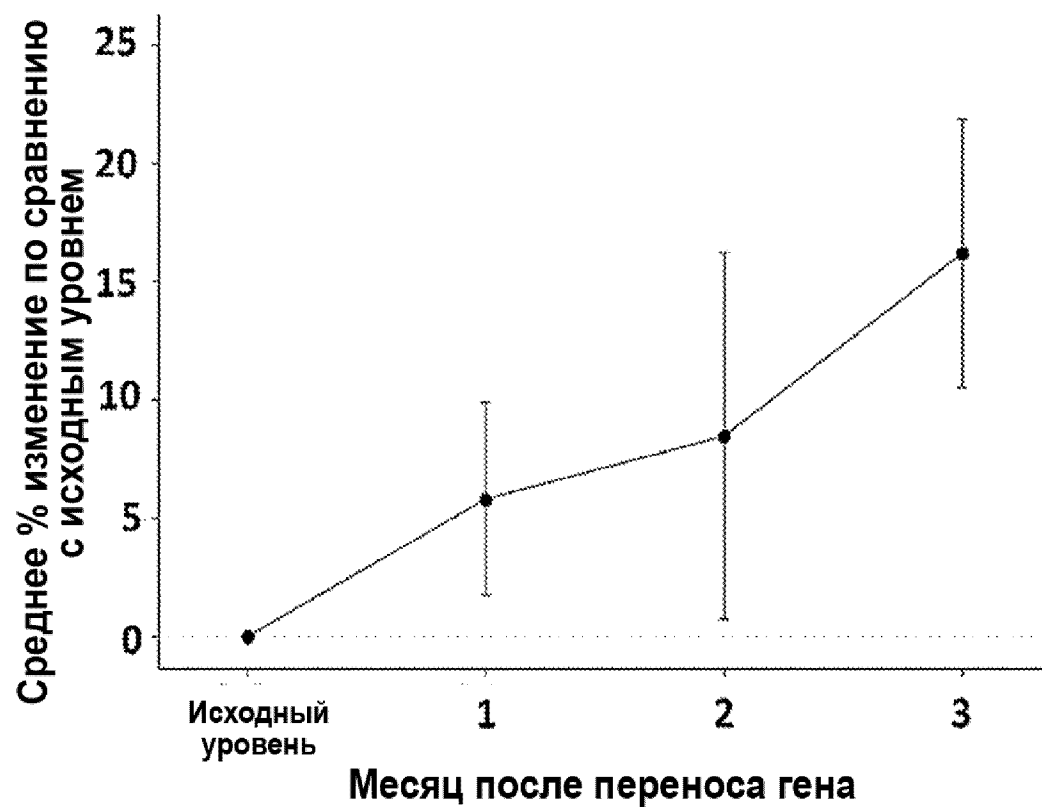
Фиг. 10

 β -саркогликан α -саркогликан

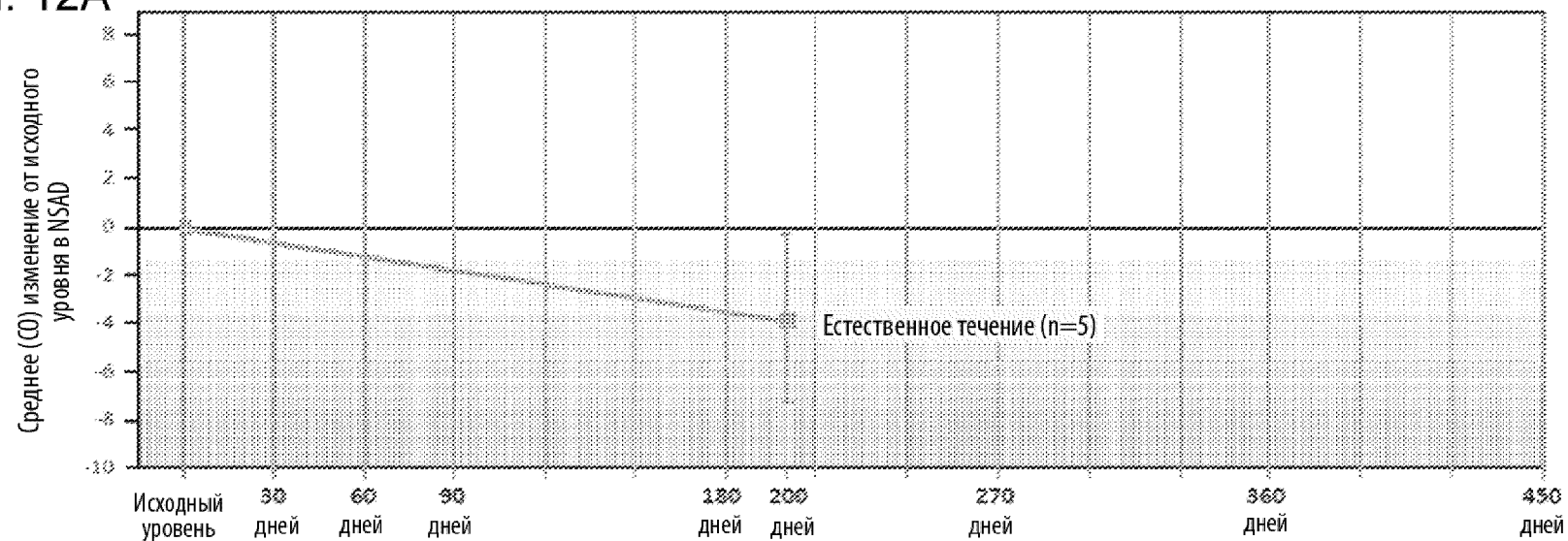
Колокализация (Слияние)



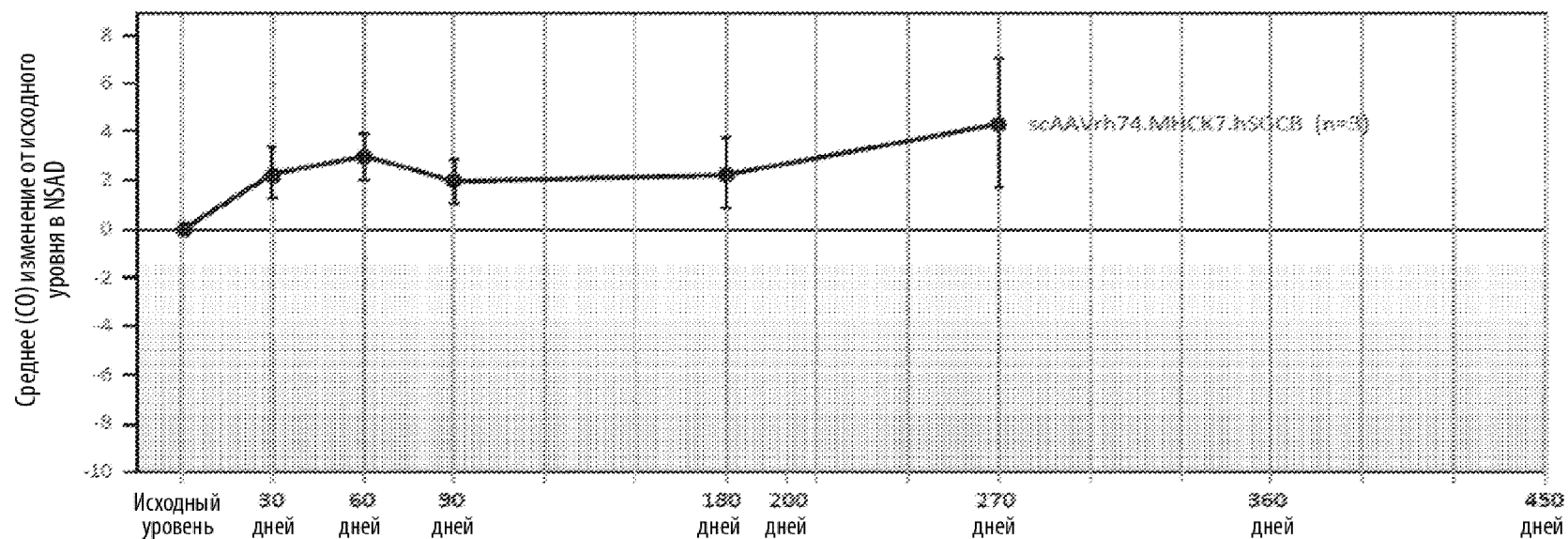
Фиг. 11



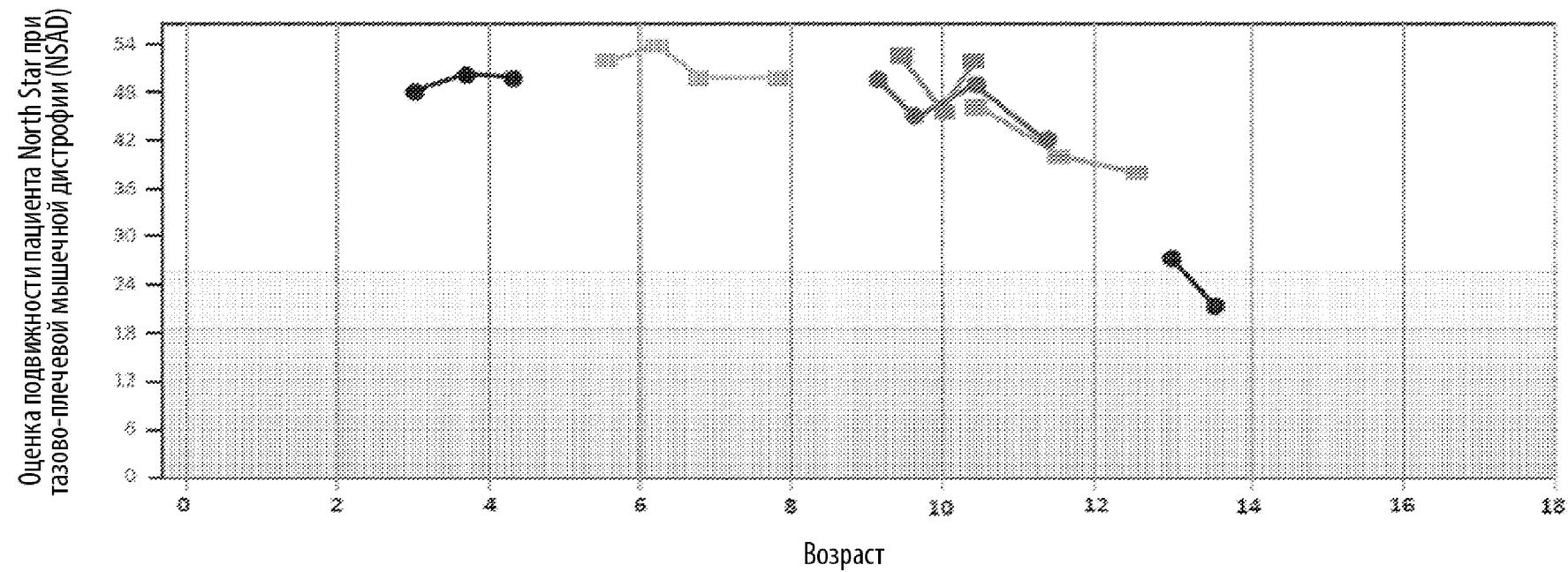
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 12С



Фиг. 13

