

КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ МИКРОДИСТРОФИНОМ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

0. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII и в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 25 ноября 2020 г., называется 38013_0009P1_Sequence_Listing.txt и имеет размер 249417 байт.

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к новым микродистрофинам и векторам генной терапии, таким как рекомбинантные векторы AAV, кодирующие новые микродистрофины, а также к их композициям и применениям и способам лечения с их применением.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Группа нервно-мышечных заболеваний, называемых дистрофинопатиями, вызвана мутациями в гене *DMD*. Каждая дистрофинопатия имеет свой фенотип, при этом все пациенты страдают от мышечной слабости и, в конечном итоге, от кардиомиопатии различной степени тяжести. Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой тяжелое, сцепленное с X-хромосомой, прогрессирующее нервно-мышечное заболевание, поражающее примерно одного из 3600–9200 живорожденных мальчиков. Заболевание вызвано мутациями со сдвигом рамки считывания в гене дистрофина, устраняющими экспрессию белка дистрофина. Из-за отсутствия белка дистрофина скелетные мышцы и, в конечном итоге, сердечные и дыхательные мышцы (например, межреберные мышцы и диафрагма) дегенерируют, вызывая преждевременную смерть. Прогрессирующая слабость и мышечная атрофия начинаются в детстве. Заболевшие индивидуумы испытывают трудности с дыханием, респираторные инфекции и проблемы с глотанием. Почти у всех пациентов с МДД развивается кардиомиопатия. Пневмония, осложненная поражением сердца, является наиболее частой причиной смерти, которая часто наступает в возрасте до третьего десятилетия жизни.

[0004] Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) имеет менее тяжелые симптомы, чем МДД, но все же приводит к преждевременной смерти. По сравнению с МДД, МДБ характеризуется более поздним проявлением слабости скелетных мышц. В то время как пациенты с МДД зависят от инвалидной коляски до 13 лет, пациенты с МДБ теряют способность передвигаться и нуждаются в инвалидной коляске после 16 лет. У пациентов с МДБ также сохраняется сила мышц-сгибателей шеи, в отличие от их коллег с МДД. Несмотря на более легкое поражение скелетных мышц, сердечная недостаточность вследствие дилатационной кардиомиопатии (ДКМП), связанной с МДД, является частой причиной заболеваемости и наиболее частой причиной смерти при МДБ, которая возникает в среднем в середине 40-летнего возраста.

[0005] Дистрофин представляет собой цитоплазматический белок, кодируемый геном *DMD*, и его функция заключается в связывании актиновых филаментов цитоскелета с мембранными белками. В норме белок дистрофин, находящийся в основном в скелетных и сердечных мышцах, в меньшем количестве экспрессируется в головном мозге, действует как амортизатор во время сокращения мышечного волокна, связывая актин сократительного аппарата со слоем соединительной ткани, который окружает каждое мышечное волокно. В мышцах дистрофин локализуется на цитоплазматической стороне мембраны сарколеммы.

[0006] Ген *DMD* является самым большим известным геном человека. Наиболее распространенными

мутациями, вызывающими МДД или МДБ, являются крупные мутации по типу делеции одного или более экзонов (60–70%), а также мутации по типу дупликации (5–10%) и однонуклеотидные варианты (включая небольшие делеции или инсерции, однонуклеотидные изменения, и изменения сайта сплайсинга, на которые приходится примерно 25-35% патогенных вариантов у самцов с МДД и около 10-20% мужчин с МДБ), также могут вызывать патогенные варианты дистрофина. При МДД мутации часто приводят к сдвигу рамки считывания, что приводит к преждевременному стоп-кодону и укороченному, нефункциональному или нестабильному белку. Точечные нонсенс-мутации также могут привести к преждевременным терминирующим кодоном с тем же результатом. В то время как мутации, вызывающие МДД, могут затрагивать любой экзон, экзоны 2-20 и 45-55 являются распространенными «горячими точками» для крупных мутаций по типу делеций и дупликаций. Делеции внутри рамки считывания приводят к менее тяжелой мышечной дистрофии Беккера (МДБ), при которой у пациентов экспрессируется укороченный, частично функциональный дистрофин.

[0007] Полноразмерный дистрофин представляет собой большой (427 кДа) белок, содержащий ряд субдоменов, которые вносят вклад в его функцию. Эти субдомены включают, в порядке от amino-конца к карбокси-концу, N-концевой актинсвязывающий домен, центральный, так называемый «стержневой», домен, богатый цистеином домен, и, наконец, карбоксиконцевой домен или область. Стержневой домен состоит из 4 богатых пролином шарнирных доменов (сокращенно Н) и 24 спектрин-подобных повторов (сокращенно R) в следующем порядке: первый шарнирный домен (Н1), 3 спектрин-подобных повтора (R1, R2, R3), второй шарнирный домен (Н2), еще 16 спектрин-подобных повторов (R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19), третий шарнирный домен (Н3), еще 5 спектрин-подобных повторов (R20, R21, R22, R23, R24) и четвертый шарнирный домен (Н4) (включая домен WW). За стержневым доменом следуют богатый цистеином домен и СООН (С)-концевой (СТ) домен.

[0008] С достижениями в использовании опосредованной аденоассоциированным вирусом (AAV) генной терапии для потенциального лечения различных редких заболеваний появилась надежда и интерес к тому, что AAV можно использовать для лечения МДД, МДБ и менее тяжелых дистрофинопатий. Из-за ограничений на размер полезной нагрузки векторов AAV внимание было сосредоточено на создании микро- или минидистрофинов, уменьшенных версий дистрофина, которые устраняют несущественные субдомены, сохраняя при этом по меньшей мере некоторую функцию полноразмерного белка. Сообщалось, что AAV-опосредованная генная терапия минидистрофином у мышей *mdx*, животной модели МДД, демонстрирует эффективную экспрессию в мышцах и улучшение мышечной функции (см., например, Wang et al., J. Orthop. Res. 27:421 (2009)).

[0009] Таким образом, в данной области техники существует потребность в векторах AAV, кодирующих микро- или минидистрофины, которые могут быть экспрессированы на эффективных уровнях в трансдуцированных клетках субъектов с МДД или МДБ и предпочтительно минимизируют иммунные ответы на терапевтический белок.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Предложено изобретение, частично основанное на новых генных конструкциях, которые кодируют белок минидистрофина для использования в генной терапии. Конструкции и кассеты экспрессии гена минидистрофина были сконструированы для улучшения терапии в отношении эффективности, активности и безопасности для субъекта при экспрессии вирусного вектора в мышечных клетках и/или клетках ЦНС.

Основываясь на терапевтических моделях *in vivo*, генная терапия микродистрофина по настоящему изобретению показала измеренное улучшение силы хвата, максимальной и удельной мышечной силы и/или снижение массы органов и мышц. Соответственно, предлагаются улучшенные векторы для генной терапии, например, рекомбинантные векторы AAV, такие как рекомбинантные векторы AAV8 или AAV9, содержащие эти конструкции для генной терапевтической экспрессии белков микродистрофина, и способы применения этих векторов для генной терапии в терапевтических способах и способах создания этих векторов для генной терапии, как описано в данном документе.

[0011] Предложены белки микродистрофина и конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующие их, которые содержат N-концевой актинсвязывающий домен и подмножество шарнирного, стержневого и спектринного доменов, за которыми следует богатый цистеином домен, и, необязательно, весь или часть, например, содержащей спираль 1 части С-концевого домена. В конкретных вариантах осуществления микродистрофин имеет весь или часть С-концевого домена или его связывающую $\alpha 1$ -синтрофин и/или α -дистробревин часть. Микродистрофины, имеющие С-концевой домен, или его часть, связывающую $\alpha 1$ -синтрофин и/или α -дистробревин, могут обладать улучшенной кардиопротекторной активностью и/или приводить к регрессу или уменьшению/задержке прогрессирования ослабленной функции сердечной мышцы.

[0012] Иллюстративные конструкции, кодирующие микродистрофины, проиллюстрированы на **Фиг. 1А** и **22**. Варианты осуществления, описанные в данном документе, представляют собой белок микродистрофин, имеющий от амино-конца до карбокси-конца:

[0013] ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR,

[0014] ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT

[0015] ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT, или

[0016] ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR,

[0017] где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, H1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R3 представляет собой область спектрина 3 дистрофина, H3 представляет собой область шарнира 3 дистрофина, R16 представляет собой область спектрина 16 дистрофина, R17 представляет собой область спектрина 17 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина или по меньшей мере ее часть, которая связывает β -дистрогликан, а CT представляет собой по меньшей мере часть С-концевой области дистрофина, где часть содержит сайт связывания $\alpha 1$ -синтрофина и/или сайт связывания α -дистробревина. В определенных вариантах осуществления домен CT имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, 70 или 83. В определенных вариантах осуществления домен H3 представляет собой полную последовательность SEQ ID NO: 11. Домен CR может представлять собой полноразмерный домен CR или укороченный домен CR, в частности, укороченный домен CR, который связывает β -дистрогликан. В определенных вариантах осуществления домен CR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 90. В определенных вариантах осуществления эндогенные линкерные последовательности связывают домены, например, всю или 3-аминокислотную часть линкера между R23 и R24 в эндогенном белке дистрофине человека, связывают домен H3 и домен R24. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления H3 может быть заменен областью шарнира 2 дистрофина (H2).

[0018] Представленные в данном документе микродистрофины проявляют функции дистрофина (см. Фиг.

13), такие как (1) связывание с одним актином, комбинацией или всеми из актина, β -дистрогликана, $\alpha 1$ -синтрофина, α -дистрофина и pNOS (включая связывание pNOS опосредованно через $\alpha 1$ -синтрофин); (2) стимулирование улучшения мышечной функции или замедление прогрессирования снижения мышечной функции в животной модели (например, в мышечной модели *mdx*, описанной в данном документе) или у субъектов-людей; и/или (3) кардиопротекторная функция или способствуют улучшению функции сердечной мышцы, или ослаблению сердечной дисфункции, или замедлению прогрессирования дегенерации сердечной функции в животных моделях или у пациентов-людей.

[0019] В конкретных вариантах осуществления микродистрофин имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 79, 91, 92 или 93.

[0020] В данном документе предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие микродистрофины, включая трансгены или генные кассеты для применения в генной терапии. В вариантах осуществления микродистрофины кодируются нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 20, 21, 81, 101, 102 или 103 или любой нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 79, 91, 92 или 93. Иллюстративные конструкции проиллюстрированы на **Фиг. 1А и 22**. В определенных вариантах осуществления конструкции включают интрон на 5' последовательности, кодирующей микродистрофин. В некоторых вариантах осуществления длина интрона составляет менее 100 нуклеотидов. В конкретных вариантах осуществления конструкции включают интрон 4 (VH4) варибельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина человека, и этот интрон расположен на 5'-конце последовательности, кодирующей микродистрофин. Присутствие интрона VH4 может привести к улучшенной экспрессии микродистрофина в клетках по сравнению с экспрессией из конструкций нуклеиновых кислот, которые не содержат интрон VH4.

[0021] Предлагаемые в данном документе трансгены содержат промоторы, которые управляют экспрессией микродистрофина в соответствующих типах клеток, таких как мышечные клетки (включая скелетные мышцы, сердечную мышцу и/или гладкие мышцы) и/или клетки ЦНС. Уменьшение размера трансгенов, используемых в генной терапии, например, при терапии рекомбинантными векторами AAV, может повысить эффективность и действенность рекомбинантных векторов AAV. В данном документе предложены трансгены, в которых промотор представляет собой специфический для мышц промотор, специфический для ЦНС промотор, или и то, и другое. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой специфический для мышц промотор длиной менее 350 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор SPc5-12 (SEQ ID NO: 39). В данном документе предложены трансгены, в которых промотор представляет собой укороченный промотор SPc5-12 (SEQ ID NO: 40), который управляет экспрессией микродистрофина и является более коротким, чем промотор SPc5-12, как описано в данном документе более подробно. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой специфический для ЦНС промотор.

[0022] Предложены также трансгены или генные кассеты, в которых последовательность, кодирующая микродистрофин, кодон-оптимизирована для повышения экспрессии. В дополнение или альтернативно последовательности, кодирующие микродистрофин, и/или последовательности трансгена могут быть истощены в отношении CpG для снижения иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления трансген микродистрофина имеет менее двух (2) CpG-островков или один (1) CpG-островок (в частности, как определен в данном документе), а в некоторых вариантах осуществления не имеет CpG-островков. Трансген

с менее чем 2, 1 или 0 CpG-островками имеет сниженную иммуногенность, измеренную по титру антител к лекарственному средству, по сравнению с конструкциями микродистрофина, имеющими более 2 CpG-островков.

[0023] В настоящем документе представлены нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 53, 54, 55, 56, 82, 104, 105 или 106, которые кодируют иллюстративные генные кассеты или трансгены.

[0024] Рекомбинантный вектор для доставки трансгенов, описанных в данном документе, включает нереплицирующиеся рекомбинантные векторы аденоассоциированного вируса (rAAV) и может относиться к серотипу AAV8 или AAV9 или любому другому серотипу, подходящему для доставки последовательностей, кодирующих микродистрофин, в мышечные клетки, включая как скелетную, так и сердечную мышцу, и/или клетки ЦНС, которые будут экспрессировать микродистрофин и приносить дополнительную пользу пациенту, и/или доставлять в мышечные клетки.

[0025] Также предложены фармацевтические композиции, содержащие рекомбинантные векторы, кодирующие микродистрофины, представленные в данном документе, в том числе с фармацевтически приемлемым эксципиентом, и способы лечения любой дистрофинопатии, такой как мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) и мышечная дистрофия Беккера (МДБ), X-сцепленная дилатационная кардиомиопатия, а также женщин-носителей МДД или МДБ путем введения векторов генной терапии, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту. Предложены способы лечения, облегчения симптомов или контроля дистрофинопатии, такой как мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) и мышечная дистрофия Беккера (МДБ), X-сцепленная дилатационная кардиомиопатия, путем введения rAAV, содержащего трансген или генную кассету, описанную в данном документе, путем введения нуждающемуся в этом субъекту таким образом, что микродистрофин доставляется в мышцу (включая скелетную мышцу, сердечную мышцу и/или гладкую мышцу) и/или ЦНС. В конкретных вариантах осуществления rAAV вводят системно.

[0026] Также предложены способы производства вирусных векторов, в частности вирусных векторов на основе AAV, и клетки-хозяева для их получения. В конкретных вариантах осуществления представлены способы получения рекомбинантных AAV, включающие культивирование клетки-хозяина, содержащей искусственный геном, содержащий цис-кассету экспрессии, фланкированную ITR AAV, при этом цис-кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий терапевтический микродистрофин, функционально связанный с элементами контроля экспрессии, которые будут контролировать экспрессию трансгена в клетках человека; транс-кассету экспрессии без ITR AAV, при этом транс-кассета экспрессии кодирует гер и капсидный белок AAV, функционально связанный с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией гер и капсидных белков AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивают белки гер и сар в транс-расположении; достаточные хелперные функции аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома капсидными белками AAV; и выделение рекомбинантного AAV, инкапсулирующего искусственный геном, из культуры клеток.

[0027] Настоящие изобретения проиллюстрированы приведенными ниже примерами, описывающими конструирование и получение векторов микродистрофина, а также анализы *in vitro* и *in vivo*, демонстрирующие эффективность.

Иллюстративные варианты осуществления

1. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую белок микродистрофина, где белок микродистрофина содержит или состоит из доменов дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу: ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, H1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R3 представляет собой область спектрина 3 дистрофина, H3 представляет собой область шарнира 3 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, H4 представляет собой область шарнира 4 дистрофина, CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина или его часть, связывающую β -дистрогликан, а CT представляет собой C-концевую область дистрофина или часть C-концевой области, содержащая сайт связывания $\alpha 1$ -синтрофина или сайт связывания дистрофина.

2. Композиция нуклеиновых кислот по варианту осуществления 1 (1), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 91, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, кодирующей терапевтически функциональный белок микродистрофин, или (2) содержащая или состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 20 или 100 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует терапевтически функциональный белок микродистрофин.

3. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 (1), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, кодирующей терапевтически функциональный белок микродистрофин, или (2) содержащая или состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 81, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, где нуклеиновая кислота кодирует терапевтически функциональный белок микродистрофин.

4. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую интрон (I), соединенный с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок микродистрофин, где белок микродистрофин содержит или состоит из доменов дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу: ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, H1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R3 представляет собой область спектрина 3 дистрофина, H3 представляет собой область шарнира 3 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, H4 представляет собой область шарнира 4 дистрофина, CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина.

5. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 4 (1), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, или (2) содержащая или состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21, или

последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, где нуклеиновая кислота кодирует терапевтически функциональный дистрофин.

6. Композиция нуклеиновой кислоты по вариантам осуществления 1-3, дополнительно содержащая интрон (I), соединенный с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок микродистрофин.

7. Композиция нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов реализации 4-6, отличающаяся тем, что I представляет собой интрон 4 (VH4) варибельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина человека, или интрон SV40, или химерный интрон, расположенный на 5'-конце последовательности, кодирующей микродистрофин.

8. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 7, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая интрон VH4, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 41 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности ей, или ее обратной комплементарной цепи, и увеличивает экспрессию микродистрофина относительно эталонной нуклеиновой кислоты, не имеющей последовательности интрона VH4; при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный интрон, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 75 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает экспрессию микродистрофина относительно эталонной нуклеиновой кислоты, не имеющей последовательности химерного интрона; или при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая интрон SV40, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 76 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает экспрессию микродистрофина относительно эталонной нуклеиновой кислоты, не имеющей последовательности химерного интрона.

9. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-3 или 6-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен СТ, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 35 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95 % или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает связывание микродистрофина с $\alpha 1$ -синтрофином, β -синтрофином и/или дистробревином по сравнению с эталонным микродистрофином, не имеющим последовательности домена СТ; при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен СТ, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 70 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает связывание микродистрофина с $\alpha 1$ -синтрофином, β -синтрофином и/или дистробревином по сравнению с эталонным микродистрофином, не имеющим последовательности домена СТ; или при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая минимальный домен СТ, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 80 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает связывание микродистрофина с $\alpha 1$ -синтрофином по сравнению с

эталонным микродистрофином, в котором отсутствует последовательность домена СТ.

10. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 9, отличающаяся тем, что домен СТ имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 83 или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

11. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен CR, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 34 или 69 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает связывание микродистрофина с β -дистрогликаном по сравнению с эталонным микродистрофином, не имеющим последовательности домена CR; при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен CR, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 100 или 109 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает связывание микродистрофина с β -дистрогликаном по сравнению с эталонным микродистрофином, в котором отсутствует последовательности домена CR.

12. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 11, отличающаяся тем, что домен CR имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 90.

13. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ABD, состоит из SEQ ID NO: 22 или 57 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 22 или 57; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H1, состоит из SEQ ID NO: 24 или 59 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 24 или 59; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R1, состоит из SEQ ID NO: 26 или 61 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 26 или 61; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R2, состоит из SEQ ID NO: 27 или 62 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 27 или 62; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R3, состоит из SEQ ID NO: 29 или 64 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 29 или 64; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H2, состоит из SEQ ID NO: 38 или последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 38; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H3, состоит из SEQ ID NO: 30 или 65 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по

меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 30 или 65; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R24, состоит из SEQ ID NO: 32 или 67 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32 или 67; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H4, состоит из SEQ ID NO: 33 или 68 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 33 или 68; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CR, состоит из SEQ ID NO: 34, 69, 100 или 109 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 34, 69, 100 или 109; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CT, если присутствует, состоит из SEQ ID NO: 35, 70 или 80 или последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 35, 70 или 80; и, необязательно, последовательность нуклеиновой кислоты I представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 41 или последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 41, связанной на 5'-конце последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей микродистрофин.

14. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует ABD, состоит из SEQ ID NO: 22 или 57; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H1, состоит из SEQ ID NO: 24 или 59; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R1, состоит из SEQ ID NO: 26 или 61; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R2, состоит из SEQ ID NO: 27 или 62; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R3, состоит из SEQ ID NO: 29 или 64; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H2, состоит из SEQ ID NO: 38; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H3, состоит из SEQ ID NO: 30 или 65; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H4, состоит из SEQ ID NO: 33 или 68; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R24, состоит из SEQ ID NO: 32 или 67; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует CR, состоит из SEQ ID NO: 34, 69, 100 или 109; I состоит из SEQ ID NO: 41; и/или последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует CT, состоит из SEQ ID NO: 35, 70 или 80.

15. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что белок микродистрофин содержит или состоит из последовательностей дистрофина, расположенных от амино-конца к карбокси-концу: ABD-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R3-H3-L4-R24-H4-CR-CT или ABD-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R3-H3-L4-R24-H4-CR, где L1, L2, L3 и L4 представляют собой линкеры.

16. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие L1, содержат или состоят из SEQ ID NO: 23 или 58, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие L2, содержат или состоят из SEQ ID NO: 25 или 60, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие L3, содержат или состоят из SEQ ID NO: 28 или 63, а последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие L4, содержат или состоят из SEQ ID NO: 31, 36, 37,

66, 71 или 72.

17. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин, где белок микродистрофин содержит или состоит из доменов дистрофина, расположенных от амино-конца к карбокси-концу: ABD-N1-R1-R2-R16-R17-R24-N4-CR, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, N1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R16 представляет собой область спектрина 16 дистрофина, R17 представляет собой область спектрина 17 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, N4 представляет собой область шарнира 4 дистрофина, а CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина

18. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 17 (1), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, или (2) содержащая или состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 103, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, где нуклеиновая кислота кодирует терапевтически функциональный микродистрофин.

19. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 17 или 18, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую домен СТ, который содержит сайт связывания α 1-синтрофина и/или сайт связывания дистробревина на С-конце домена CR.

20. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 19 (1), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, или (2) содержащая или состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 102, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, где нуклеиновая кислота кодирует терапевтически функциональный микродистрофин.

21. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 19 или 20, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен СТ, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 35 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает связывание микродистрофина с α 1-синтрофином, β -синтрофином и/или дистробревином по сравнению с эталонным микродистрофином, который не имеет последовательности домена СТ; при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен СТ, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 70 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает связывание микродистрофина с α 1-синтрофином, β -синтрофином и/или дистробревином по сравнению с эталонным микродистрофином, который не имеет последовательности

домена СТ; или при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая минимальный домен СТ, или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 80, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает связывание микродистрофина с α 1-синтрофином по сравнению с эталонным микродистрофином, который не имеет последовательность домена СТ.

22. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 17-21, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ABD, состоит из SEQ ID NO: 22 или 57, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 22 или 57; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H1, состоит из SEQ ID NO: 24 или 59, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 24 или 59; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R1, состоит из SEQ ID NO: 26 или 61, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 26 или 61; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R2, состоит из SEQ ID NO: 27 или 62, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 27 или 62; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R16, состоит из SEQ ID NO: 94 или 98, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 94 или 98; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R17, состоит из SEQ ID NO: 95 или 99, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 95 или 99; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R24, состоит из SEQ ID NO: 32 или 67, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32 или 67; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H4, состоит из SEQ ID NO: 33 или 68, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 33 или 68; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CR, состоит из SEQ ID NO: 34, 69, 100 или 109, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 34 или 69; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая СТ, состоит из SEQ ID NO: 35, 70, или 80, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 35, 70 или 80, кодирующий микродистрофин, который имеет функциональную активность.

23. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 17-22,

отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ABD, состоит из SEQ ID NO: 22 или 57; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H1, состоит из SEQ ID NO: 24 или 59; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R1, состоит из SEQ ID NO: 26 или 61; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R2, состоит из SEQ ID NO: 27 или 62; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R16, состоит из SEQ ID NO: 94 или 98; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R17, состоит из SEQ ID NO: 95 или 99; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H4, состоит из SEQ ID NO: 33 или 68; R24 состоит из SEQ ID NO: 32 или 67; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CR, состоит из SEQ ID NO: 34, 69, 100 или 109; и, если присутствует, последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует CT, состоит из SEQ ID NO: 35, 70 или 80.

24. Композиция нуклеиновой кислоты по вариантам осуществления 17-23, дополнительно содержащая интрон (I), связанный с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок микродистрофин.

25. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 24, отличающаяся тем, что I представляет собой интрон 4 (VH4) варибельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина человека, или интрон SV40, или химерный интрон, расположенный на 5'-конце последовательности, кодирующей микродистрофин.

26. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 25, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая интрон VH4, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 41 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает экспрессию микродистрофина по сравнению с эталонной нуклеиновой кислотой, которая не имеет последовательности интрона VH4; при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный интрон, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 75 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает экспрессию микродистрофина по сравнению с эталонной нуклеиновой кислотой, которая не имеет последовательности химерного интрона; или где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая интрон SV40, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 76, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратной комплементарной цепью, и увеличивает экспрессию микродистрофина по сравнению с эталонной нуклеиновой кислотой, не имеющей последовательности химерного интрона.

27. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 17-26, отличающаяся тем, что белок микродистрофина содержит или состоит из последовательностей дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу: ABD-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R16-L4.1-R17-L4.2-R24-H4-CR-CT или ABD-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R16-L4.1-R17-L4.2-R24-H4-CR, где L1, L2, L3, L4.1 и L4.2 представляют собой линкеры.

28. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 27, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L1, содержит или состоит из SEQ ID NO: 23 или 58; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L2, содержит или состоит из SEQ ID NO: 25 или 60;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L3, содержит или состоит из SEQ ID NO: 28 или 63; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L4.1, содержит или состоит из SEQ ID NO: 107 или 125; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L4.2, содержит или состоит из SEQ ID NO: 108 или 126.

29. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой вектор нуклеиновой кислоты, содержащий регуляторный элемент транскрипции, который способствует экспрессии в мышечной ткани и/или ткани ЦНС, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок микродистрофин.

30. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 29, отличающаяся тем, что регуляторный элемент транскрипции содержит специфический для мышц промотор, необязательно, специфический для скелетной, гладкой и/или сердечной мышцы промотор.

31. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 29 или 30, отличающаяся тем, что промотор представляет собой SPc5-12 или его транскрипционно активную часть.

32. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 31, отличающаяся тем, что промотор состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 39 или 40.

33. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 29, отличающаяся тем, что регуляторный элемент транскрипции содержит специфический для ЦНС промотор.

34. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 29, отличающаяся тем, что промотор представляет собой промотор CB7, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор MMT, промотор EF-1 альфа (SEQ ID NO: 118), промотор UB6, куриный промотор бета-актина, промотор CAG (SEQ ID NO: 116), промотор RPE65, промотор опсина, промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина), промотор APOA2, промотор SERPINA1 (hAAT), промотор MIR122 или индуцируемый промотор, такой как индуцируемый гипоксией или индуцируемый рапамицином промотор.

35. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 29 или 30, отличающаяся тем, что специфический для мышц регуляторный элемент транскрипции представляет собой один из промотора СК1, промотора СК4, промотора СК5, промотора СК6, промотора СК7, промотора СК8 (SEQ ID NO: 115), промотора МСК (или его укороченной формы) (SEQ ID NO: 121), промотора десмина (SEQ ID NO: 119), промотора МНСК7 (SEQ ID NO: 120), промотора enh358МСК, промотора dМСК или промотора tМСК.

36. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность содержит сигнал полиаденилирования на 3'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей микродистрофин.

37. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 36, отличающаяся тем, что сигнал полиаденилирования имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 42.

38. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность вектора AAV, содержащую от 5' до 3': (i) ITR AAV - регуляторный элемент транскрипции - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домены микродистрофина, расположенные от N-конца к С-концу, ABD-N1-R1-R2-R3-N3-R24-N4-CR-CT- последовательность полиаденилирования - ITR AAV; (ii) ITR AAV - регуляторный элемент транскрипции - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домены

микродистрофина, расположенные от N-конца к С-концу, ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR - последовательность полиаденилирования - ITR AAV; (iii) ITR AAV - регуляторный элемент транскрипции - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домены микродистрофина, расположенные от N-конца к С-концу, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT- последовательность полиаденилирования - ITR AAV; или (iv) ITR AAV - регуляторный элемент транскрипции - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домены микродистрофина, расположенные от N-конца к С-концу, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR - последовательность полиаденилирования - ITR AAV, где ITR AAV необязательно представляет собой ITR AAV2.

39. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность кодон-оптимизирована и/или истощена в отношении последовательностей CpG.

40. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, которая имеет менее 2 или 1 CpG-островок или не имеет CpG-островков.

41. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 40, которая проявляет сниженную иммуногенность при введении человеку, что измеряется по титру антител к лекарственному средству, по сравнению с конструкцией микродистрофина, имеющей более 0 CpG-островков.

42. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 53, 54, 55, 56, 82, 104, 105 или 106

43. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая нуклеотидную последовательность вектора AAV, содержащую ITR AAV на 5'- и 3'-концах последовательности нуклеиновой кислоты, где ITR AAV необязательно представляет собой ITR AAV2.

44. Композиция нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 43, отличающаяся тем, что 5'-ITR содержит или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 73, а 3'-ITR содержит или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 74

45. Частица gAAV, содержащая каскету экспрессии, содержащую композицию нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления.

46. Частица gAAV по варианту осуществления 45, имеющая капсидный белок по меньшей мере одного типа AAV, выбранного из AAV типа 1 (AAV1), типа 2 (AAV2), типа 3 (AAV3), типа 4 (AAV4), типа 5 (AAV5), типа 6 (AAV6), типа 7 (AAV7), типа 8 (AAV8), типа rh8 (AAVrh8), типа 9 (AAV9), типа PHP.B (AAVPHP.B), типа hu37 (AAV.hu37), типа hu31 (AAV.hu31), типа hu32 (AAV.hu32), типа rh10 (AAVrh10), типа rh20 (AAVrh20), типа rh39 (AAVrh39) и типа rh74 (AAVrh74).

47. Частица gAAV по варианту осуществления 45 или 46, отличающаяся тем, что указанный капсидный белок имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 77 (капсид AAV8), или имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

48. Частица gAAV по варианту осуществления 45 или 46, отличающаяся тем, что указанный капсидный белок имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO 78 (капсид AAV9), или имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

49. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество

частицы гAAV по любому из вариантов осуществления 45-48 и фармацевтически приемлемый носитель.

50. Способ доставки трансгена в клетку, включающий приведение указанной клетки в контакт с частицей гAAV по любому из вариантов осуществления 45-49, при этом указанная клетка приводится в контакт с вектором.

51. Фармацевтическая композиция для лечения дистрофинопатии у нуждающегося в этом человека, содержащая терапевтически эффективное количество частицы гAAV по любому из вариантов осуществления 45-49, необязательно при этом указанная частица гAAV составлена для введения в кровоток, мышечную ткань или ЦНС указанного субъекта.

52. Способ лечения дистрофинопатии у нуждающегося в этом человека, включающий: введение указанному субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество частицы гAAV по любому из вариантов осуществления 45-49, так что в мышце указанного субъекта образовалось депо, которое высвобождает белок микродистрофина.

53. Способ предотвращения передачи дистрофинопатии потомству нуждающегося в этом человека, включающий:

введение указанному субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество частицы гAAV по любому из вариантов осуществления 45-49, так что нуклеиновая кислота, кодирующая микродистрофин, включается в зародышевую линию указанного субъекта.

54. Фармацевтическая композиция или способ по вариантам осуществления 51-53, отличающиеся тем, что дистрофинопатия представляет собой МДД, МДБ, X-сцепленную дилатационную кардиомиопатию, или субъект является женщиной-носителем МДД или МДБ.

55. Фармацевтическая композиция или способ по вариантам осуществления 51-54, где композицию вводят по меньшей мере вместе со вторым агентом, эффективным для лечения дистрофинопатии.

56. Фармацевтическая композиция или способ по варианту осуществления 55, отличающиеся тем, что второй агент выбран из группы, состоящей из бессмысленного олигонуклеотида, вызывающего пропуск экзона гена *DMD*, антитела к миостатину, агента, который способствует рибосомному сквозному прочтыванию нонсенс-мутаций, агента, который супрессирует преждевременные стоп-кодоны, анаболического стероида и кортикостероида.

57. Фармацевтическая композиция или способ по любому из вариантов осуществления 51-56, отличающиеся тем, что указанное введение улучшает силу хвата пациента, увеличивает максимальную и удельную мышечную силу и/или снижает массу органов и мышц.

58. Фармацевтическая композиция или способ по любому из вариантов осуществления 51-57, отличающиеся тем, что введение частицы гAAV улучшает или поддерживает функцию сердца или замедляет ухудшение функции сердца.

59. Фармацевтическая композиция или способ по любому из вариантов осуществления 51-58, отличающиеся тем, что введение частицы гAAV увеличивает мышечную массу или силу, или поддерживает мышечную массу или силу, или снижает вероятность потери мышечной массы или силы.

60. Белок микродистрофин, содержащий или состоящий из доменов дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу, ABD-N1-R1-R2-R3-N3-R24-N4-CR-CT, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, N1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область

спектрина 2 дистрофина, R3 представляет собой область спектрина 3 дистрофина, H3 представляет собой область шарнира 3 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина, а CT представляет собой по меньшей мере часть С-концевой области дистрофина, содержащую сайт связывания α 1-синтрофина, сайт связывания β -синтрофина и/или сайт дистрофина.

61. Белок микродистрофин по варианту осуществления 60, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 79 или 91.

62. Белок микродистрофин по варианту осуществления 60 или 61, отличающийся тем, что домен CT представляет собой укороченный домен CT, который содержит сайт связывания α 1-синтрофина.

63. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 60-62, отличающийся тем, что домен CT содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16 или 83 или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

64. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 60-63, отличающийся тем, что домен CR содержит сайт связывания β -дистрогликана.

65. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 60-64, отличающийся тем, что домен CR содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или 90.

66. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 60-66, отличающийся тем, что ABD состоит из SEQ ID NO: 3 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3; H1 состоит из SEQ ID NO: 5 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5; R1 состоит из SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7; R2 состоит из SEQ ID NO: 8 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; H3 состоит из SEQ ID NO: 11 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11; R24 состоит из SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13; H4 состоит из SEQ ID NO: 14 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14; CR состоит из SEQ ID NO: 15 или 90 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по

меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15 или 90; и СТ состоит из SEQ ID NO: 16 или 83 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16 или 83.

67. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 60-66, отличающийся тем, что ABD состоит из SEQ ID NO: 3, H1 состоит из SEQ ID NO: 5; R1 состоит из SEQ ID NO: 7; R2 состоит из SEQ ID NO: 8; R3 состоит из SEQ ID NO: 10; H3 состоит из SEQ ID NO: 11; R24 состоит из SEQ ID NO: 13; H4 состоит из SEQ ID NO: 14; CR состоит из SEQ ID NO: 15 или 90; или СТ состоит из SEQ ID NO: 16 или 83.

68. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 60-67, содержащий домены дистрофина, расположенные от amino-конца к карбокси-концу: ABD-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R3-H3-L4-R24-H4-CR-CT, L1, L2, L3, и L4 представляют собой линкеры.

69. Белок микродистрофин по варианту осуществления 68, отличающийся тем, что аминокислотные последовательности L1, L2, L3 и L4 состоят из SEQ ID NO: 4, 6, 9 и 12, соответственно.

70. Белок микродистрофин, содержащий или состоящий из доменов дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу: ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, H1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R16 представляет собой область спектрина 16 дистрофина, R17 представляет собой область спектрина 17 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, а CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина.

71. Белок микродистрофин по варианту осуществления 70, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93.

72. Белок микродистрофин по варианту осуществления 70, содержащий или состоящий из доменов дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT, где СТ представляет собой по меньшей мере часть C-концевой области дистрофина, содержащую сайт связывания α 1-синтрофина или сайт связывания дистрофина.

73. Белок микродистрофин по варианту осуществления 72, отличающийся тем, что домен СТ содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16 или 83, или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

74. Белок микродистрофин по варианту осуществления 72 или 73, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92.

75. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 70-74, отличающийся тем, что домен H4 содержит сайт связывания β -дистрогликана.

76. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 70-75, отличающийся тем, что ABD состоит из SEQ ID NO: 3 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3; H1 состоит из SEQ ID NO: 5 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере

97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5; R1 состоит из SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7; R2 состоит из SEQ ID NO: 8 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; R16 состоит из SEQ ID NO: 86 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 86; R17 состоит из SEQ ID NO: 87 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 87; R24 состоит из SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13; H4 состоит из SEQ ID NO: 14 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14; и CR состоит из SEQ ID NO: 15 или 90, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15 или 90;

77. Белок микродистрофин в соответствии по любому из вариантов осуществления 70-76, содержащий или состоящий из домена СТ на С-конце домена CR, причем СТ состоит из SEQ ID NO: 16 или 83, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16 или 83.

78. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 70-77, отличающийся тем, что ABD состоит из SEQ ID NO: 3, H1 состоит из SEQ ID NO: 5; R1 состоит из SEQ ID NO: 7; R2 состоит из SEQ ID NO: 8; R16 состоит из SEQ ID NO: 86; R17 состоит из SEQ ID NO: 87; R24 состоит из SEQ ID NO: 13; H4 состоит из SEQ ID NO: 14; и CR состоит из SEQ ID NO: 15 или 90; и/или СТ состоит из SEQ ID NO: 16 или 83.

79. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 70-78, отличающийся тем, что СТ состоит из SEQ ID NO: 16 или 83.

80. Белок микродистрофин по любому из вариантов осуществления 70-80, содержащий домены дистрофина, расположенные от amino-конца к карбокси-концу: ABD-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R16-L4.1-R17-L4.2-R24-H4-CR-CT или ABD-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R16-L4.1-R17-L4.2-R24-H4-CR, где L1, L2, L3, L4.1 и L4.2 представляют собой линкеры.

81. Белок микродистрофина по варианту осуществления 80, отличающийся тем, что

аминокислотные последовательности L1, L2, L3, L4.1 и L4.2 состоят из SEQ ID NO: 4, 6, 9, 110, и 89, соответственно.

82. Способ лечения дистрофинопатии у нуждающегося в этом человека, включающий доставку в кровоток, мышечную ткань и/или спинномозговую жидкость указанного субъекта-человека терапевтически эффективного количества белка микродистрофина по любому из вариантов осуществления 60-81.

83. Фармацевтическая композиция для лечения дистрофинопатии у человека, содержащая терапевтически эффективное количество белка микродистрофина по любому из вариантов осуществления 60-81, составленная для доставки в кровоток, мышечную ткань и/или спинномозговую жидкость указанного человека.

84. Способ или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 82 или 83, отличающиеся тем, что дистрофинопатия представляет собой МДД, МДБ или X-сцепленную дилатационную кардиомиопатию.

85. Способ или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 82-84, отличающиеся тем, что домен СТ содержит сайт связывания $\alpha 1$ -синтрофина, сайт связывания β -синтрофина и/или сайт связывания дистробревина.

86. Способ или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 85, отличающиеся тем, что домен СТ представляет собой укороченный домен СТ, содержащий сайт связывания $\alpha 1$ -синтрофина.

87. Способ или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 82-86, отличающиеся тем, что H4 содержит сайт связывания β -дистрогликана.

88. Способ получения рекомбинантных AAV, включающий:

(a) культивирование клетки-хозяина, содержащей:

(i) искусственный геном, содержащий цис-кассету экспрессии, при этом цис-кассета экспрессии содержит композицию нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 38-44;

(ii) транс-кассету экспрессии, не содержащую ITR AAV, при этом транс-кассета экспрессии кодирует белок гер и капсида AAV, функционально связанные с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией белков гер и капсида AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивает белки гер и капсида в транс-положении;

(iii) достаточные хелперные функции аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома белками капсида AAV; и

(b) выделение рекомбинантного AAV, инкапсулирующего искусственный геном, из культуры клеток.

89. Клетка-хозяин, содержащая:

a. искусственный геном, содержащий цис-кассету экспрессии, при этом цис-кассета экспрессии содержит композицию нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 38-44;

b. транс-кассету экспрессии, не содержащую ITR AAV, при этом транс-кассета экспрессии кодирует белок гер и белок капсида AAV, функционально связанные с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией белков гер и капсида AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивает белки гер и капсида в транс-положении; и

c. достаточные хелперные функции аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома белками капсида AAV.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0028] **Фиг. 1А-С.** На **Фиг. 1А** показаны кассеты экспрессии векторного гена и конструкции микродистрофина для применения в цис-плазмиде для генной терапии. Для каждой конструкции указаны длина ДНК для каждого компонента и полный трансген. SPc5-12: синтетический специфический для мышц промотор; Mini-SPc: укороченный синтетический специфический для мышц промотор; CT1.5: укороченный/минимальный домен СТ; VH4: интрон варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека; ABD: актинсвязывающий домен; Н: петля; Р: стержень; CR: богатый цистеином домен; СТ: С-концевой домен; smРА: малый поли(А); ABD: актинсвязывающий домен 1 (ABD1). На **Фиг. 1В-С** показаны белковые полосы, полученные при помощи вестерн-блоттинга (антитело (1с7) против дистрофина), демонстрирующие относительный размер белков микродистрофина, экспрессируемых плазмидами RGX-DYS1, RGX-DYS3 и RGX-DYS5.

[0029] На **Фиг. 2А-Г** представлена флуоресцентная микроскопия дифференцированных клеток C2C12 через три дня после инфицирования репортерными векторами AAV AAV8-GFP (**А-С**) и AAV8-VH4-GFP (**Д-Г**) в различных дозах (указанных выше изображений: 5×10^5 гв/клетка (**А, Д**), 1×10^5 гв/клетка (**В, Е**), $0,2 \times 10^5$ гв/клетка (**С, Г**)). Масштабная планка: 200 мкМ. гв: геномы вектора.

[0030] На **Фиг. 3** показана средняя интенсивность флуоресценции (единицы) трансдуцированных клеток C2C12, измеренная через три дня после заражения векторами AAV8-GFP и AAV8-VH4-GFP при трех различных дозах: 5×10^5 гв/клетка, 1×10^5 гв/клетка и $0,2 \times 10^5$ гв/клетка.

[0031] На **Фиг. 4А-С** показана флуоресцентная микроскопия дифференцированных клеток C2C12 через шесть дней после инфицирования AAV8-CAG-GFP. Изображения **А-С** получали ежедневно с использованием микроскопа EVOS™ с каналами проходящего света и GFP при одинаковом увеличении: **А**, микроскопическое изображение, настроенное на канал GFP; **В**, светлое поле (или фазовый контраст) для наблюдения за слиянием клеток; **С**, объединенное изображение **А** и **В**, чтобы увидеть, что количество инфицированных клеток составляет примерно 50%.

[0032] На **Фиг. 5А-Н** показано тестирование активности микродистрофинового вектора (RGX-DYS1-03, **Е-Н**) *in vitro* по сравнению с эталонным контролем (RGX-DYS-RS, **А-Д**) с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания белка дистрофина. Для каждой дозировки было три повторности (указаны над соответствующими изображениями): $1e12$ гв/мл (**А, Е**), $4e11$ гв/мл (**В, Г**), $1,6e11$ гв/мл (**С, Д**) и $6,4e10$ гв/мл (**Е, Н**).

[0033] На **Фиг. 6** представлены данные об инфективности для клеток линии мышечных клеток C2C12 для каждого вектора в качестве показателя эффективности вектора. Показаны нормированные данные (число копий вектора/эталонный контроль) для каждой партии векторов RGX-DYS1-01, RGX-DYS1-02, RGX-DYS2-01, RGX-DYS3-01, RGX-DYS3-02, RGX-DYS4-01, и RGX-DYS1-RS. Вектор внутреннего контроля, основанный на более ранней партии DYS1 (RGX-DYS1-RS), считался эталонным стандартом (1,0).

[0034] На **Фиг. 7** представлены данные о микродистрофине в клетках линии мышечных клеток C2C12 для каждого вектора из разных производственных партий, для каждой из которых используется один и тот же процесс (RGX-DYS1-01, RGX-DYS1-02, RGX-DYS2-01, RGX-DYS3-01, RGX-DYS3-02, RGX-DYS4-01 и RGX-DYS1-RS) в качестве показателя экспрессии мРНК. Для заражения клеток C2C12 использовали две разные дозы вектора ($1e5$ гв/клетка и $5e4$ гв/клетка). Уровень экспрессии мРНК для каждой партии рассчитывали в виде кратности изменения (дельта СТ) в количественной ПЦР между праймером/зондом для

микродистрофина и эндогенной контрольной мышшиной GAPDH из одного и того же образца кДНК. На графике показано кратность увеличения, и RGX-DYS1-RS считался 100% эталонным стандартом и был установлен на 1.

[0035] На **Фиг. 8** показаны еженедельные изменения массы тела (г). Данные представлены как среднее \pm СОС. n = 12 для получавшей RGX-DYS1 группы *mdx*; n = 13 для получавшей носитель группы *mdx*; n = 14 для получавшей носитель группы BL10.

[0036] На **Фиг. 9А-В** показаны измерения массы мышц и органов мышши (нормированные к массе тела, г/кг). Масса квадрицепса и камбаловидной мышши показана на Фиг. 9А, а масса трицепса и ТА показана на Фиг 9В. Данные представлены как среднее \pm СОС. n = 12 для получавшей RGX-DYS1 группы *mdx*; n = 13 для получавшей носитель группы *mdx*; n = 14 для получавшей носитель группы BL10. *** $P \leq 0,001$ (Однофакторный дисперсионный анализ); ### $P \leq 0,001$ (t-критерий).

[0037] На **Фиг. 10** показано измерение силы хвата (кгс/кг). *-Однофакторный дисперсионный анализ (** $P \leq 0,001$); #- t-критерий (### $p \leq 0,001$). Силу хвата мышши предплечья нормировали для каждой мышши по массе мышши. n = 12 для получавшей RGX-DYS1 группы *mdx*; n = 13 для получавшей носитель группы *mdx*; n = 14 для получавшей носитель группы BL10.

[0038] На **Фиг. 11** показан анализ сократительной мышшиной силы *in vitro* через 6 недель после лечения, который продемонстрировал значительное улучшение мышшиной силы у мышши *mdx*, получавших RGX-DYS1, по сравнению с мышши *mdx*, получавшими носитель. Показаны максимальная сила (мН) и удельная сила (кН/м²). ***, $p < 0,001$ согласно однофакторному дисперсионному анализу. ###, $p < 0,001$ согласно t-критерию. n = 12 из получавшей RGX-DYS1 группы *mdx*; n = 13 для получавшей носитель группы *mdx*; n = 14 для получавшей носитель группы BL10.

[0039] На **Фиг. 12** показано число копий вектора (гв/диплоидный геном) в скелетных мышщах, сердечной мышши и печени согласно методу кцПЦР. Использовали систему для цифровой ПЦР Naica Crystal Digital PCR от Stilla Technologies. n = 13 для каждой обрабатываемой ткани. Приведенные числа являются средними \pm станд. откл. Число копий вектора рассчитывали как 2X число копий трансгена микродистрофина/число копий мышшиного глюкогена эндогенного контроля. Нинъекцированные образцы печени *mdx* (n=13) использовали в качестве образцов отрицательного контроля. ТА, передняя большеберцовая мышши; EDL, длинный разгибатель пальцев.

[0040] **Фиг. 13:** Иллюстрация сарколеммы, демонстрирующая взаимодействие между дистрофином дикого типа или микродистрофином, содержащим дистрофин, и сайтами связывания $\alpha 1$ -и $\beta 1$ -синтрофина, например, RGX-DYS1 и белковый комплекс, ассоциированный с дистрофином, (DAPC), с актиновым цитоскелетом. Предполагается, что RGX-DYS1, имеющий сайты связывания дистробревина, $\alpha 1$ -синтрофина и $\beta 1$ -синтрофина, будет частично рекрутировать и закреплять pNOS на сарколемме посредством $\alpha 1$ -синтрофина.

[0041] **Фиг. 14:** Иммунофлуоресцентное окрашивание икроножной мышши в группах *mdx*, получавшей RGX-DYS1, контроль *mdx* и контроль ДТ. Криосрезы окрашивали антителом к α -дистробреину, антителом к дистрогликану, вантителом к pNos, антителом к дистрофину (анти-dys) и антителом к α -синтрофину. Вторичное антитело было помечено CY3, и все срезы были контрастно окрашены DAPI перед монтированием.

[0042] **Фиг. 15:** Вестерн-блоттинг против дистрофина, экстрагированного из тканей икроножной мышши, инъекцированных вектором AAV- μ -дистрофина. Дорожки с 1 по 4 = образцы белка от мышши *mdx*, которым

инъекцировали AAV8-RGX-DYS1, дорожки с 5 по 8 = образцы белка от мышей *mdx*, которым инъекцировали AAV8-RGX-DYS5, и дорожки с 9 по 12 = образцы белка от мышей *mdx*, которым вводили AAV8-RGX-DYS3. α 1-актин служит в качестве контроля для нанесения на каждой дорожке. *Mdx* (дорожка 13) указывает на неинъекцированных мышей *mdx*. Для блоттинга дистрофина использовали мышинные моноклональные антитела к дистрофину (разведение 1:100). Для анти-альфа-1-актинового блоттинга использовали поликлональное антитело в разведении 1:10000, а вторичное (анти-кроличье) антитело использовали в разведении 1:20000.

[0043] На Фиг. 16А-С: Количественное определение полос μ -дистрофина с помощью вестерн-блоттинга (панель А), количество копий вектора AAV- μ -Dys с помощью кцПЦР (панель В) и количественное определение полос μ -дистрофина, нормированное по количеству копий вектора AAV- μ -Dys (панель С). * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

[0044] Фиг. 17А-В: экспрессия мРНК μ -дистрофина и дистрофина дикого типа (ДТ) в скелетных мышцах (икроножных). Общую РНК экстрагировали из скелетных мышц и синтезировали кДНК. Количество копий μ -дистрофина, дистрофина ДТ и эндогенного контроля мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) измеряли с помощью цифровой ПЦР (система Naica Crystal Digital PCR, технологии Stilla). **А.** Относительная экспрессия мРНК μ -дистрофина или дистрофина ДТ, нормированная по GAPDH. Отношение дистрофина ДТ к GAPDH в скелетных мышцах В6-ДТ принимали за 1. **В.** Относительная экспрессия мРНК μ -дистрофина или дистрофина ДТ в отдельной клетке. Количество копий экспрессии мРНК μ -дистрофина или дистрофина ДТ нормировали по количеству копий GAPDH и генома на клетку.

[0045] Фиг. 18. Икроножная мышца, извлеченная из мышей *mdx*, срезы ткани приготовлены и иммунофлуоресцентно (IF) окрашены против дистрофина и ассоциированных с дистрофином белковых комплексов, включая дистрофин, β -дистрогликан и синтрофин. Мышей лечили, как описано: В16 (не получавшие лечение мыши дикого типа); RGX-DYS1 (мышь ID 3553 и мышь ID 3588); RGX-DYS3 (мышь ID 5 и мышь ID 7); и RGX-DYS5 (мышь ID 9 и мышь ID 11). Объектив: 40x.

[0046] Фиг. 19А-С: экспрессия синтрофина в скелетных мышцах. **А.** Икроножная мышца, извлеченная из мышей *mdx*, срезы ткани приготовлены и иммунофлуоресцентно (IF) окрашены против синтрофина. Мышей лечили, как описано: В16 (не получавшие лечение мыши дикого типа); RGX-DYS1 (мышь ID 3553 и мышь ID 3588); RGX-DYS3 (мышь ID 5 и мышь ID 7); и RGX-DYS5 (мышь ID 9 и мышь ID 11). Объектив: 40x. **В.** Вестерн-блоттинг против синтрофина из лизата мышечной ткани. **С.** Количественная оценка полос вестерн-блоттинга. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,0001$. **Д.** Вестерн-блоттинг против синтрофина из общего белка мышечной мембраны. **Е.** Количественная оценка полос вестерн-блоттинга.

[0047] Фиг. 20А-С: экспрессия pNOS в скелетных мышцах. **А.** Иммунофлуоресцентное окрашивание против pNOS. **В.** Вестерн-блоттинг против pNOS. **С.** Количественная оценка полос вестерн-блоттинга.

[0048] Фиг. 21А-Е: Трансдукция сателлитных клеток и улучшение регенерации клеток с помощью вектора AAV, кодирующего ген μ -дистрофина. **А-В.** Изображения RNAScore мышей *mdx*, получавших RGX-DYS1 (панель А), и мышей *mdx*, не получавших лечение (панель В), демонстрирующие коэкспрессию μ -дистрофина (красный) и *rax7*, маркера сателлитных клеток, (зеленый). Мультиплексный флуоресцентный анализ RNAScore трансгена AAV и системы экспрессии мРНК *Rax7* был выполнен в Advanced Cell Diagnostics Inc (Ньюарк, штат Калифорния). **С.** Процент трансдуцированных AAV-DMD сателлитных клеток. **Д.** Общее количество сателлитных клеток на изображениях RNAScore. **Е.** Экспрессия мРНК *Rax7* в скелетных мышцах

разных групп, выявленная с помощью кцПЦР. Праймеры и зонд против μ -дистрофина были такими же, как описано ранее. Отношение rax7 к GAPDH в скелетных мышцах B6-ДТ принимали за 1. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ по сравнению с не получавшими лечение мышцами mdx.

[0049] **Фиг. 22:** Иллюстрация дополнительных модифицированных конструкций μ -дистрофина. CR короткий: домен, богатый цистеином, на 150 п.н. короче, чем у дистрофина дикого типа. R16/R17: дистрофиновые спектриноподобные повторы 16 и 17.

[0050] **Фиг. 23A-C:** *In vitro* заражение миотрубочек C2C12 различными версиями конструкций AAV8- μ -дистрофина. Миобластные клетки C2C12 заражали в среде для дифференцировки, затем инфицировали векторами AAV. Клетки собирали через пять дней после заражения для вестерн-блоттинга или экспрессии мРНК. 1: отрицательный контроль; 2: RGX-DYS8; 3: RGX-DYS7; 4: RGX-DYS6; 5: RGX-DYS3; 6: RGX-DYS5; 7: RGX-DYS1; 8: RGX-DYS1; 9: RGX-DYS1; 10: RGX-DYS1; 11: RGX-DYS1. **A.** Анализ методом вестерн-блоттинга экспрессии μ -дистрофина в клетках C2C12. **B.** Количественный анализ методом вестерн-блоттинга. **C.** Обнаружение экспрессии мРНК μ -дистрофина с помощью кцПЦР.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0051] Предложен белок микродистрофина, например, как показано на **Фиг. 1A** и **Фиг. 22**, и композиции нуклеиновых кислот и векторы гAAV, кодирующие их, а также фармацевтические композиции и связанные с ними способы лечения.

5.1. Определения

[0052] Термин «AAV» или «аденоассоциированный вирус» относится к депендопарвовирусу из рода вирусов Parvoviridae. AAV может представлять собой AAV, полученный из встречающегося в природе вируса «дикого типа», AAV, полученный из генома гAAV, упакованного в капсид, содержащий капсидные белки, кодируемые природным геном *cap*, и/или из генома гAAV, упакованного в капсид, содержащий капсидные белки, кодируемые неприродным геном капсида *cap*. Пример последнего включает гAAV с капсидным белком, имеющим модифицированную последовательность и/или пептидную вставку в аминокислотную последовательность природного капсида.

[0053] Термин «гAAV» относится к «рекомбинантному AAV». В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный AAV имеет геном AAV, в котором часть или все гены *тер* и *сар* заменены гетерологичными последовательностями.

[0054] Термин «хелперная плаزمида *тер-сар*» относится к плазмиде, которая обеспечивает функцию вирусных генов *тер* и *сар* и способствует продукции AAV из геномов гAAV, в которых отсутствуют функциональные последовательности генов *тер* и/или *сар*.

[0055] Термин «ген *сар*» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют капсидные белки, которые формируют или помогают формировать капсидную оболочку вируса. Для AAV капсидный белок может представлять собой VP1, VP2 или VP3.

[0056] Термин «ген *тер*» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют неструктурный белок, необходимый для репликации и продукции вируса.

[0057] Термины «нуклеиновые кислоты» и «нуклеотидные последовательности» включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), комбинации молекул ДНК и РНК или гибридные молекулы ДНК/РНК и аналоги ДНК или РНК. молекулы. Такие аналоги могут быть созданы с использованием, например, аналогов нуклеотидов, которые включают, но не ограничиваются ими,

инозин или тритилированные основания. Такие аналоги могут также включать молекулы ДНК или РНК, содержащие модифицированные скелеты, которые придают молекулам полезные свойства, такие как, например, устойчивость к нуклеазам или повышенная способность проникать через клеточные мембраны. Нуклеиновые кислоты или нуклеотидные последовательности могут быть одноцепочечными, двухцепочечными, могут содержать как одноцепочечные, так и двухцепочечные части и могут содержать трехцепочечные части, но предпочтительно представляют собой двухцепочечную ДНК.

[0058] Аминокислотные остатки, описанные в данном документе, могут быть модифицированы консервативными заменами для сохранения или существенного сохранения общей структуры и/или функции полипептида. Используемый в данном документе термин «консервативная аминокислотная замена» означает, что: гидрофобные аминокислоты (т.е. Ala, Cys, Gly, Pro, Met, Val, Ile и Leu) могут быть заменены другими гидрофобными аминокислотами; гидрофобные аминокислоты с объемными боковыми цепями (например, Phe, Tyr и Trp) могут быть заменены другими гидрофобными аминокислотами с объемными боковыми цепями; аминокислоты с положительно заряженными боковыми цепями (например, Arg, His и Lys) могут быть заменены другими аминокислотами с положительно заряженными боковыми цепями; аминокислоты с отрицательно заряженными боковыми цепями (например, Asp и Glu) могут быть заменены другими аминокислотами с отрицательно заряженными боковыми цепями; а аминокислоты с полярными незаряженными боковыми цепями (например, Ser, Thr, Asn и Gln) могут быть заменены другими аминокислотами с полярными незаряженными боковыми цепями.

[0059] Термины «субъект», «хозяин» и «пациент» используются взаимозаменяемо. Субъект предпочтительно представляет собой млекопитающее, такое как отличный от человека примат (например, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, крысы и т. д.) или приматы (например, обезьяна и человек), наиболее предпочтительно человек.

[0060] Термин «терапевтически функциональный микродистрофин» означает, что микродистрофин проявляет терапевтическую эффективность в одном или более анализах терапевтической полезности, описанных в разделе 5.4 данного документа, или при оценке способов лечения, описанных в разделе 5.5 данного документа.

[0061] Термины «субъект», «хозяин» и «пациент» используются взаимозаменяемо. Субъект предпочтительно представляет собой млекопитающее, такое как отличный от человека примат (например, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, крысы и т. д.) или приматы (например, обезьяна и человек), наиболее предпочтительно человек.

[0062] Термин «терапевтический агент» относится к любому агенту, который можно использовать для лечения, контроля или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, где заболевание или нарушение связано с функцией, которую должен обеспечивать трансген. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству агента (например, количеству продукта, экспрессируемого трансгеном), которое обеспечивает по меньшей мере одно терапевтическое преимущество при лечении или сдерживании целевого заболевания или нарушения при введении субъекту, страдающему этим заболеванием или нарушением. Кроме того, терапевтически эффективное количество в отношении агента по изобретению означает такое количество агента отдельно или в комбинации с другими видами терапии, которое обеспечивает по меньшей мере одно терапевтическое преимущество при лечении или сдерживании заболевания или нарушения.

[0063] Термин «профилактический агент» относится к любому агенту, который может быть использован для предотвращения, снижения вероятности, задержки или замедления прогрессирования заболевания или нарушения, когда заболевание или нарушение связано с функцией, обеспечиваемой трансгеном. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству профилактического агента (например, количеству продукта, экспрессируемого трансгеном), которое обеспечивает по меньшей мере одно профилактическое преимущество в виде предотвращения или задержки развития целевого заболевания или нарушения при введении субъекту, предрасположенному к нему. Профилактически эффективное количество также может относиться к количеству агента, достаточному для предотвращения, снижения вероятности или задержки возникновения целевого заболевания или нарушения; или замедлить прогрессирование целевого заболевания или нарушения; количество, достаточное для задержки или минимизации начала целевого заболевания или нарушения; или количество, достаточное для предотвращения или задержки его рецидива или распространения. Профилактически эффективное количество также может относиться к количеству агента, достаточному для предотвращения или задержки обострения симптомов целевого заболевания или нарушения. Кроме того, профилактически эффективное количество в отношении профилактического агента по данному изобретению означает такое количество профилактического агента отдельно или в комбинации с другими агентами, которое обеспечивает по меньшей мере одно профилактическое преимущество в виде предупреждения или задержки развития заболевания или нарушения.

[0064] Профилактический агент по изобретению можно вводить субъекту, «предрасположенному» к целевому заболеванию или нарушению. Субъект, который «предрасположен» к заболеванию или нарушению, представляет собой субъекта, у которого проявляются симптомы, связанные с развитием заболевания или нарушения, или который имеет генетическую характеристику, воздействие окружающей среды или другой фактор риска для такого заболевания или нарушения, но когда симптомы еще не на том уровне, чтобы диагностировать заболевание или нарушение. Например, пациент с семейным анамнезом заболевания, связанного с отсутствующим геном (должен обеспечиваться трансгеном), может квалифицироваться как предрасположенный к этому. Кроме того, пациента со спящей опухолью, которая сохраняется после удаления первичной опухоли, можно квалифицировать как пациента, предрасположенного к рецидиву опухоли.

[0065] Термин «CpG-островки» означает те отличительные области генома, которые содержат динуклеотид CpG (например, основание C (цитозин), за которым сразу следует основание G (гуанин) (CpG)) с высокой частотой, таким образом, содержание G+C в CpG-островках значительно выше, чем в неостровковых ДНК. CpG-островки можно идентифицировать путем анализа длины нуклеотидов, состава нуклеотидов и частоты динуклеотидов CpG. Содержание CpG-островков в любой конкретной нуклеотидной последовательности или геноме может быть измерено с использованием следующих критериев: размер островка более 100, процент GC более 50,0 % и отношение наблюдаемого количества динуклеотидов CG к ожидаемому количеству более 0,6 на основе количество G и C в сегменте (Набл./Ожид. больше 0,6).

Набл./Ожид. CpG = $\frac{\text{Количество CpG} * N}{(\text{Количество C} * \text{Количество G})}$

[0066] где N = длина последовательности.

[0067] Для таких расчетов доступны различные программные инструменты, такие как world-wide-web.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi, world-wide-web.cpgislands.usc.edu/, world-wide-web.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html и world-wide-web.bioinformatics.org/sms2/cpg_islands.html. (См. также Gardiner-Garden and Frommer, J Mol Biol. 1987 Jul 20;196(2):261-82; Li LC and Dahiya R. MethPrimer:

designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002 Nov;18(11):1427-31.). В одном осуществления алгоритм идентификации CpG-островков можно найти на сайте www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi.

5.2. Трансгены микродистрофина

5.2.1 Микродистрофин

[0068] Варианты осуществления, описанные в данном документе, включают белок микродистрофин, имеющий от amino-конца к карбокси-концу: ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR (например, SEQ ID NO: 2) или ABD1-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR (SEQ ID NO: 93), где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, H1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R3 представляет собой область спектрина 3 дистрофина, H3 представляет собой область шарнира 3 дистрофина, R16 представляет собой область спектрина 16 дистрофина, R17 представляет собой область спектрина 17 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, H4 представляет собой область шарнира 4 дистрофина, CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина.

[0069] Как объяснялось выше, микродистрофины в соответствии с настоящим изобретением включают ABD-H1-R1-R2-R3-R24-H4 или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4. NH₂-конец и область стержневого домена дистрофина напрямую связываются с цитоскелетным актином, но не сшивают его. Стержневой домен дистрофина дикого типа состоит из 24 повторяющихся единиц, которые похожи на тройные спиральные повторы спектрина. Эта повторяющаяся единица составляет большую часть белка дистрофина и, как полагают, придает молекуле гибкую стержнеподобную структуру, подобную β-спектрину. Эти α-спиральные суперспиральные повторы прерваны четырьмя шарнирными областями, богатыми пролином. В конце 24-го повтора находится четвертая шарнирная область, за которой сразу следует домен WW [Blake, D. et al, *Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle*. *Physiol. Rev.* 82: 291–329, 2002]. Микродистрофины, описанные в данном документе, не включают R4-R23 или, альтернативно, не включают R3-R15 (или, в некоторых вариантах осуществления, R4) и R18-R23 (то есть такие, что микродистрофин включает R16 и R17, но может не включать R3, в некоторых вариантах осуществления) и включают только 2 или 3 из 4 шарнирных областей или их частей. Варианты осуществления могут содержать дистрофиновые спектриноподобные повторы 16 и 17, которые, как считается, закрепляют pNOS на сарколемме. В некоторых вариантах осуществления в микродистрофин не вводятся новые аминокислотные остатки или линкеры.

[0070] В некоторых вариантах осуществления микродистрофин содержит H3 (например, SEQ ID NO: 1, 2 или 79). В вариантах осуществления H3 может представлять собой полный эндогенный домен H3 от N-конца до C-конца, например, SEQ ID NO: 11. Другими словами, некоторые варианты осуществления микродистрофина не содержат фрагмент домена H3, но содержат весь домен H3. В некоторых вариантах осуществления C-концевая аминокислота домена R3 связана непосредственно (или ковалентно связана) с N-концевой аминокислотой домена H3. В некоторых вариантах осуществления C-концевая аминокислота домена R3, связанная с N-концевой аминокислотой домена H3, представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления 5'-аминокислота домена H3, связанная с доменом R3, представляет собой Q.

[0071] В других вариантах осуществления микродистрофин содержит H2 вместо H3. H2 может представлять собой полный эндогенный домен H2 (SEQ ID NO: 19). Такие варианты белка микродистрофина имеют от amino-конца к карбокси-концу: ABD-H1-R1-R2-R3-H2-R24-H4-CR. В некоторых вариантах

осуществления С-концевая аминокислота домена R3, связанная с N-концевой аминокислотой шарнирного домена, представляет собой Q. В других вариантах осуществления N-концевая аминокислота домена H2, связанная с доменом R3, представляет собой P. В определенных вариантах осуществления С-концевая аминокислота домена R3 непосредственно связана с N-концевой аминокислотой шарнирного домена, где N-концевая аминокислота шарнирного домена представляет собой P или Q. В других вариантах осуществления С-концевая аминокислота домена R3 напрямую связана с N-концевой аминокислотой домена H2, где N-концевая аминокислота домена H2 представляет собой P.

[0072] Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, полный шарнирный домен может подходить для любой конструкции микродистрофина, чтобы придать полную активность полученному белку микродистрофина. Установлено, что шарнирные сегменты дистрофина по своей природе богаты пролином и поэтому могут придавать гибкость белковому продукту (Koenig and Kunkel, 265(6):4560-4566, 1990). Любая делеция части шарнира, особенно удаление одного или более остатков пролина, может уменьшить его гибкость и, следовательно, уменьшить его эффективность, препятствуя его взаимодействию с другими белками в комплексе DAP.

[0073] Микродистрофины, описанные в данном документе, включают последовательность дистрофина H4 дикого типа (который содержит домен WW) до домена CR включительно (который содержит домен ZZ, представленный одним подчеркиванием (UniProtKB-P11532, АК 3307-3354) в SEQ ID NO: 15). Домен WW представляет собой белок-связывающий модуль, обнаруженный в нескольких сигнальных и регуляторных молекулах. Домен WW связывается с богатыми пролином субстратами аналогично src-гомологическому домену 3 (SH3). Эта область опосредует взаимодействие между β -дистрогликаном и дистрофином, поскольку цитоплазматический домен β -дистрогликана богат пролином. Домен WW находится в шарнире 4 (область H4). Домен CR содержит два мотива «EF-рука», сходные с таковыми в α -актинине и способные связывать внутриклеточный Ca^{2+} . Домен ZZ содержит ряд консервативных остатков цистеина, которые, как предполагается, образуют координационные центры для катионов двухвалентных металлов, таких как Zn^{2+} . Домен ZZ подобен многим типам цинковых пальцев и обнаружен как в ядерных, так и в цитоплазматических белках. Домен ZZ дистрофина связывается с кальмодулином Ca^{2+} -зависимым образом. Таким образом, домен ZZ может представлять собой функциональный сайт связывания кальмодулина и может иметь значение для связывания кальмодулина с другими родственными дистрофину белками.

[0074] Некоторые варианты осуществления включают усеченную часть домена CR, которая содержит домен ZZ. Например, белок микродистрофина включает от amino-конца к карбокси-концу: ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR (короткий)-CT (например, SEQ ID NO: 91, см. RGX-DYS6 на Фиг. 22). В определенных вариантах осуществления домен CR, например, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

[0075] Чтобы преодолеть ограничение упаковывающей способности, типичное для векторов AAV, во многих генах микродистрофина, разработанных для клинического применения, отсутствует домен CT. Некоторые исследователи указывают, что для сборки DAPC даже не требуется С-концевой домен или что С-концевой домен является несущественным [Crawford, et al., J Cell Biol, 2000, 150(6):1399–1409; and Ramos, J.N, et al. *Molecular Therapy* 2019, 27(3):1-13]. Тем не менее, домен CT белка дистрофина может оказывать благотворное влияние на кардиомиопатию. Было показано особое взаимодействие между доменом CT дистрофина и β -дистрогликаном в сердечной мышце, при этом прямое молекулярное взаимодействие существует на границе плазматической мембраны, что указывает на непосредственную роль домена CT в

закреплении комплексов DAP в мембране кардиомиоцитов [Stevenson, S., et al., Spatial relationship of the C-terminal domains of dystrophin and beta-dystroglycan in cardiac muscle support a direct molecular interaction at the plasma membrane interface. *Circ Res*, 1998. 82(1): p. 82-93]. Коррекция генотипа дистрофина и сердечного фенотипа в исследовании 274 пациентов с мышечной дистрофией Дюшенна и Беккера выявила наличие N-концевого актинсвязывающего домена (ABD1) и домена CR с доменом CT, которые снижали риск кардиомиопатии, дополнительно указывая на полезный кардиопротекторный эффект для домена CT белка дистрофина [Tandon, A., et al., Dystrophin genotype-cardiac phenotype correlations in Duchenne and Becker muscular dystrophies using cardiac magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol*, 2015. 115(7): p. 967-71]. Кроме того, сверхэкспрессия гена микродистрофина, содержащего спираль 1 суперспирального мотива домена CT, в скелетных мышцах мышей *mdx* увеличивала рекрутирование $\alpha 1$ -синтрофина и α -дистрофина, которые являются членами комплекса DAP, выступая в качестве модульных адаптеров для сигнальных белков, рекрутированных к мембране сарколеммы [Koo, T., et al., Delivery of AAV2/9-microdystrophin genes incorporating helix 1 of the coiled-coil motif in the C-terminal domain of dystrophin improves muscle pathology and restores the level of $\alpha 1$ -syntrophin and α -dystrobrevin in skeletal muscles of *mdx* mice. *Hum Gene Ther*, 2011. 22(11): p. 1379-88]. Сверхэкспрессия более длинной версии микродистрофина также повысила устойчивость к вызванному эксцентрическим сокращением разрушению мышц у мышей *mdx* по сравнению с короткой версией [Koo, T., et al. 2011, выше].

[0076] Было показано, что у пациентов с МДД сохраняется значительно сниженная функция сердца. Считается, что лечение, которое восстанавливает функцию нейрональной синтазы оксида азота (nNOS), улучшает функцию сердца, что приводит к значительной нормализации систолического АД, укорочению фракции и фракции выброса левого желудочка и, в свою очередь, уменьшению сердечного фиброза. На прогрессирование сердечного фиброза указывают, поскольку у пациентов сначала наблюдается дилатация и гипертрофия левого желудочка (ЛЖ), которые прогрессируют до стадии, известной как дилатационная кардиомиопатия (ДКМП).

[0077] Домен CT дистрофина содержит два участка полипептида, которые, по прогнозам, образуют α -спиральные суперспирали, подобные таковым в стержневом домене (см. H1, обозначенный одиночным подчеркиванием, и H2, указанный двойным подчеркиванием в SEQ ID 16 в таблице 1 ниже). Каждая суперспираль имеет консервативный гептадный повтор (a,b,c,d,e,f,g)_n, подобную тем, которые встречаются в лейциновых застежках, где лейцин преобладает в положении «d». Этот домен был назван доменом CC (суперспираль). Область CC дистрофина образует сайт связывания дистрофина и может модулировать взаимодействие между $\alpha 1$ -синтрофином и другими ассоциированными с дистрофином белками.

[0078] Считается, что обе изоформы синтрофина, $\alpha 1$ -синтрофин и $\beta 1$ -синтрофин, напрямую взаимодействуют с дистрофином через более чем один сайт связывания в экзонах дистрофина 73 и 74 (Yang et al, *JBC* 270(10):4975-8 (1995)). $\alpha 1$ - и $\beta 1$ -синтрофин связываются отдельно с C-концевым доменом дистрофина, а сайт связывания $\alpha 1$ -синтрофина находится по меньшей мере в пределах аминокислотных остатков с 3447 по 3481, в то время как сайт связывания $\beta 1$ -синтрофина находится в пределах аминокислотного остатка с 3495 по 3535 (таблица 1, SEQ ID NO: 16, курсив). Альфа1- ($\alpha 1$ -) синтрофин и альфа-синтрофин используются взаимозаменяемо повсюду.

[0079] Спираль 1 (см. H1, указанная как одиночная подчеркнутая последовательность в SEQ ID NO: 16 в таблице 1 ниже) суперспирального мотива в C-концевом (CT) домене касет гена микродистрофина может

быть полезной для защиты кардиомиоцитов и стабилизации дистрофин-ассоциированных (глико)белковых (DAP) комплексов (DAPC). DAPC может участвовать в важных сигнальных ролях, а также в структурной роли. Безусловно, имеются признаки изменения выработки оксида азота (NO) и возможные изменения других функций, вызванные дестабилизацией и потерей комплекса.

[0080] Неожиданно было обнаружено, что определенные конструкции микродистрофина, описанные в данном документе, связываются и рекрутируют pNOS, а также альфа-синтрофин, альфа-дистрофин и бета-дистрогликан. Связывание с pNOS в контексте конструкции микродистрофина, включающей С-концевой домен дистрофина, связывающегося с pNOS, означает, что конструкция микродистрофина, экспрессируемая в мышечной ткани, была определена путем иммуноокрашивания соответствующими антителами для идентификации каждого из альфа-синтрофина, альфа-дистрофина, и pNOS в или вблизи сарколеммы в срезе трансдуцированной мышечной ткани. См. Примеры 5 и 7 в разделах 6.5 и 6.7 ниже. В определенных вариантах осуществления белок микродистрофина имеет С-концевой домен, который «повышает связывание» с α 1-синтрофином, β -синтрофином и/или дистробревином по сравнению с сопоставимым микродистрофином, который не содержит С-концевой домен (но имеет такую же аминокислотную последовательность, иначе называемую «эталонным белком микродистрофина»), что означает, что DAPC стабилизирован или закреплен на сарколемме в большей степени, чем эталонный микродистрофин, который не имеет С-концевого домена (но имеет такую же аминокислотную последовательность, иначе называемую микродистрофином), что определяется более высокими уровнями одного или более компонентов DAPC в мышечной мембране с помощью иммуноокрашивания мышечных срезов или вестерн-блоттинга лизатов мышечной ткани или препаратов мышечной мембраны для одного из нескольких компонентов DAPC, включая α 1-синтрофин, β -синтрофин, α -дистробревин, β -дистрогликан или pNOS в мышцах мышей с *mdx*, получавших лечение микродистрофином, имеющим С-концевой домен, по сравнению с мышцами мышей с *mdx*, получавших лечение эталонным белком микродистрофином (имеющим ту же последовательность и компоненты дистрофина, за исключением отсутствия С-концевого домена) (см. разделы 6.5 и 6.7 ниже).

[0081] В некоторых вариантах осуществления конструкция микродистрофина, содержащая С-концевой домен дистрофина, содержит сайт связывания синтрофина и/или сайт связывания дистрофина в С-концевом домене. В некоторых вариантах осуществления С-концевой домен, содержащий сайт связывания α 1-синтрофина, представляет собой укороченный С-концевой домен. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность укороченного С-концевого домена представляет собой SEQ ID NO: 83. В определенных вариантах осуществления усеченный С-концевой домен содержит аминокислотную последовательность MENSNGSYLNDISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQ (сайт связывания α 1-синтрофина) (SEQ ID NO: 84). В определенных вариантах осуществления усеченный С-концевой домен содержит сайт связывания α 1-синтрофина, при этом сайт связывания имеет аминокислотную последовательность MENSNGSYLNDISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQ (SEQ ID NO: 84), но не имеет сайта связывания β 1-синтрофина или дистробревина.

[0082] Конструкции микродистрофина по настоящему изобретению могут дополнительно предотвращать прогрессирующий фиброз желудочков, что измеряется снижением концентрации миокардиальных макрофагов, снижением экспрессии молекул адгезии и/или нормированными показателями электрокардиограммы (ЭКГ), например, конечно-систолического объема (левый желудочек), конечно-диастолического объема, систолического объема, фракции выброса левого желудочка, частоты сердечных

сокращений или сердечного выброса после введения конструкций микродистрофина. Конечно-систолический объем и другие показатели сердечной деятельности также можно измерить с помощью МРТ (магнитно-резонансной томографии), КТ сердца (компьютерной томографии) или ОФЭКТ (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии). Улучшение функции сердца после введения конструкций микродистрофина по изобретению можно также тестировать на модели мышей DBA/2J-mdx.

[0083] Соответственно, варианты осуществления, описанные в данном документе, могут дополнительно включать весь или часть домена СТ, содержащего спираль 1 «суперспирального» мотива. Например, белок микродистрофин включает от amino-конца к карбокси-концу: ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT (например, SEQ ID NO: 1, 79 или 91) или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT (например, SEQ ID NO: 92). В некоторых вариантах осуществления СТ представляет собой по меньшей мере часть С-концевого домена дистрофина, содержащую сайт связывания $\alpha 1$ -синтрофина и/или сайт связывания дистрофина, как показано на Фиг. 14. В определенных вариантах осуществления домен СТ содержит сайт связывания $\beta 1$ -синтрофина и не имеет сайта связывания $\beta 1$ -синтрофина или дистробревина, например, он имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, которая частично функционирует для рекрутирования и прикрепляют nNOS к сарколемме через $\alpha 1$ -синтрофин. В некоторых вариантах осуществления СТ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 83.

[0084] Варианты осуществления микродистрофина могут дополнительно содержать линкеры (L1, L2, L3, L4, L4.1 и/или L4.2) или их части, соединяющие домены, как показано ниже: ABD1-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R3-H3-L4-R24-H4-CR-CT (например, SEQ ID NO: 1, 79, или 91), ABD1-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R3-H3-L4-R24-H4-CR (например, SEQ ID NO: 2), ABD1-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R16-L4.1-R17-L4.2-R24-H4-CR (например, SEQ ID NO: 92), или ABD1-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R16-L4.1-R17-L4.2-R24-H4-CR-CT (например, SEQ ID NO: 93). L1 может представлять собой эндогенный линкер L1 (например, SEQ ID NO: 4), который может связывать ABD1 с H1. L2 может представлять собой эндогенный линкер L2 (например, SEQ ID NO: 6), который может связывать H1 с R1. L3 может представлять собой эндогенный линкер L3 (например, SEQ ID NO: 9), который может связывать R2 с R3 или R16.

[0085] L4 также может быть эндогенным линкером, который может связывать H3 и R24. В некоторых вариантах осуществления L4 представляет собой 3 аминокислоты, например, TLE (SEQ ID NO: 12), которые предшествуют R24 в нативной последовательности дистрофина. В других вариантах осуществления L4 может представлять собой 4 аминокислоты, которые предшествуют R24 в нативной последовательности дистрофина (SEQ ID NO: 17), или 2 аминокислоты, которые предшествуют R24 (SEQ ID NO: 18). В других вариантах осуществления между H3 и R24 нет линкера, L4 или иного. На 5'-конце H3, как упоминалось выше, нет линкера, а вместо этого R3 непосредственно соединен с H3 или, альтернативно, с H2.

[0086] L4.1 может быть эндогенным линкером, который может связывать R16 и R17. В некоторых вариантах осуществления L4.1 представляет собой 2 аминокислоты, например, SV (SEQ ID NO: 110), которые предшествуют R17 в нативной последовательности дистрофина. В других вариантах осуществления L4.2 может быть эндогенным линкером или частью эндогенного линкера, который может связывать R17 и R24. В некоторых вариантах осуществления L4.2 представляет собой 4 аминокислоты, например, Q, который следует за R17, и TLE (SEQ ID NO: 12), который предшествует R24 (SEQ ID NO: 89).

[0087] Вышеописанные компоненты микродистрофина других доменов, не описанных специально, могут иметь аминокислотные последовательности, представленные в таблице 1 ниже. Аминокислотные

последовательности для представленных в данном документе доменов соответствуют изоформе дистрофина UniProtKB-P11532 (DMD_HUMAN), которая включена в данный документ посредством ссылки. Другие варианты осуществления могут содержать домены встречающихся в природе функциональных изоформ дистрофина, известных в данной области техники, таких как UniProtKB-A0A075B6G3 (A0A075B6G3_HUMAN) (включенных в данный документ посредством ссылки), где, например, R24 имеет R, замещенный на Q в аминокислоте 3 из SEQ ID NO: 13.

Таблица 1: Аминокислотные последовательности сегмента микродистрофина

Структура	SEQ ID	Последовательность
ABD1	3	MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHLENLFSDLQD GRRLLDLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLV NIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKIL LSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSRDLFDWNSVV CQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLF QVLP
L1	4	QQVSIEAIQEVE
H1	5	MLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYA YTQAAYVTSDPTRSPFPSQHLEAPED
L2	6	KSFGSSLME
R1	7	SEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHE GYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLESEDEETEVEQEQMNLNLSR WECLRVASMEKQSNLHR
R2	8	VLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEEPLGPDLEDLKRQVQQH KVLQEDLEQEQRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDR WANICRWTEDRWVLLQD
L3	9	IL
R3	10	LKWQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAV LKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCW DNLVQKLEKSTAQISQ
H3	11	QPDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTPVVTKETAIKLEMPSSLMLEVP
L4	12	TLE
R16	86	EISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNI KDSLQSSGRIDIHSHKKTAAALQSATPVERVKLQEALSQDFQWEKVN KMYKDRQGRFDR
L4.1	110	SV
R17	87	EKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQD GIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASILQEKLGSNLNRWQEVCKQL SDRKKRLEE

Структура	SEQ ID	Последовательность
R16-R17	88	EISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNI KDSLQSSGRIDIHHSKKTAAALQSATPVERVKLQEALSQDFQWEKVN KMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKQTQIPENW EHAKEYKWYKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQSSKTDASILQEK LGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEE Линкер L4.1, соединяющий R16 и R17, подчеркнут.
L4.2	89	QTLE
R24	13	RLQELQEATDELCLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALR GEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVA VEDRVRQLHE
H4	14	AHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPKNVPYYINHETQTTTCWDHPKM TELYQSLADLNNVRFSAVRTAMKL Домен WW представлен одним подчеркиванием (UniProtKB-P11532, АК 3055-3088)
Богатый цистеином домен (CR)	15	RRLQKALCLDLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMQDILQIINCLTTIYDRL EQEHNNLVNVPLCVDMLNWLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKA HLEDKYRYLQVAVSSTGFCQRRLLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSN IEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLRVAAAET <u>AKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHY</u> PMVEYC Домен ZZ представлен одним подчеркиванием (UniProtKB-P11532, АК 3307-3354)
CR короткий	90	AKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHY PMVEYC
С-концевой домен (CT)	16	TPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNME TPVTLINFWPVDAPASSQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLN DSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGERLER <u>ILADLEENRNLOAEYDRLKQOHEHKGLSPLSPPEMMPTSPQSPR</u> Суперспиральный мотив H1 представлен одним подчеркиванием; мотив H2 представлен двойным подчеркиванием; сторона, связывающая дистробревин, выделена курсивом.
Минимальный/у сеченный С-концевой домен (CT1.5)	83	TPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNME TPVTLINFWPVDAPASSQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLN <i>DSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLES</i> сайт связывания α 1-синтрофина выделен курсивом.
L4	17	ETLE
L4	18	LE

Структура	SEQ ID	Последовательность
H2	19	PSLTQTTVMETVTTVTTREQLVKHAQEELPPPPQKKRQITVD
Минимальный сайт связывания альфа-синтрофина	84	MENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQ

[0088] В настоящем изобретении также рассматриваются варианты этих последовательностей при условии, что функция каждого домена и линкера в основном сохраняется и/или терапевтическая эффективность микродистрофина, включающего такие варианты, в основном сохраняется. Функциональная активность включает (1) связывание с одним, комбинацией или всеми актином, β -дистрогликаном, α 1-синтрофином, α -дистробревином и pNOS; (2) улучшенную мышечную функцию в животной модели (например, в мышечной модели *mdx*, описанной в данном документе) или у субъектов-людей; и/или (3) кардиопротекторное действие или улучшение функции сердечной мышцы в животных моделях или у пациентов-людей. В частности, микродистрофин может содержать ABD, состоящий из SEQ ID NO: 3 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3; H1, состоящей из SEQ ID NO: 5 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5; R1, состоящей из SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7; R2, состоящей из SEQ ID NO: 8 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; H2, состоящей из SEQ ID NO: 19 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19; H3, состоящей из SEQ ID NO: 11 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11; R24, состоящей из SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13; H4, состоящей из SEQ ID NO: 14 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14; CR, состоящей из SEQ ID NO: 15 или 90, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15 или 90; CT, состоящей из SEQ ID NO: 16 или 83 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16 или 83, или CT, содержащей SEQ ID NO: 84. Альтернативный вариант осуществления аналогичен предыдущему, за исключением того, что домен H3 заменен доменом H2, который состоит из SEQ ID NO: 19 или последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 19, также кодирующий микродистрофин, который имеет функциональную активность. В дополнение к вышесказанному, микродистрофин может включать линкеры в описанных выше местах, которые включают или состоят из следующих последовательностей: L1, состоящая из SEQ ID NO: 4 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4; L2, состоящая из SEQ ID NO: 6 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6; L3, состоящая из SEQ ID NO: 9 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 50% идентичности с SEQ ID NO: 9, или вариант с консервативными заменами обоих остатков L3; и L4, состоящая из SEQ ID NO: 12, 17 или 18 или аминокислотной последовательности с по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, 17 или 18.

[0089] В конкретных вариантах осуществления микродистрофин может содержать ABD, состоящий из SEQ ID NO: 3 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3; H1, состоящей из SEQ ID NO: 5 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5; R1, состоящей из SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7; R2, состоящей из SEQ ID NO: 8 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8; R16, состоящей из SEQ ID NO: 86 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 86; R17, состоящей из

SEQ ID NO: 87 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 87; R24, состоящей из SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13; H4, состоящей из SEQ ID NO: 14 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14; CR, состоящей из SEQ ID NO: 15 или 90, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15 или 90; CT, состоящей из SEQ ID NO: 16 или 83 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16 или 83, или CT, содержащей SEQ ID NO: 84. В дополнение к вышеизложенному, микродистрофин может содержать линкеры в местах, описанных выше, которые содержат или состоят из следующих последовательностей: L1, состоящая из SEQ ID NO: 4, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4; L2, состоящая из SEQ ID NO: 6, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6; L3, состоящая из SEQ ID NO: 9, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 50% идентичности с SEQ ID NO: 9, или вариант с консервативными заменами обоих остатков L3; L4.1, состоящая из SEQ ID NO: 110, или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 110; и L4.2, состоящая SEQ ID NO: 89 или аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 89.

[0090] В таблице 2 представлены аминокислотные последовательности вариантов осуществления микродистрофина в соответствии с настоящим изобретением. Также предполагается, что другие варианты осуществления представляют собой замещенный вариант микродистрофина, как определено в SEQ ID NO: 1, 2, 79, 91, 92 или 93. Например, в SEQ ID NO: 1, 2, 79, 91, 92 или 93 могут быть сделаны консервативные замены, которые по существу сохраняют его функциональную активность. В вариантах осуществления микродистрофин может иметь по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, 2, 79, 91, 92 или 93 и может сохранять функциональную активность микродистрофина, как определено, например, при помощи одного или более анализов *in vitro* или анализов *in vivo* на животных моделях, описанных в Разделе 5.4 ниже.

Таблица 2: Аминокислотные последовательности белков RGX-DYS

Структура	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
DYS1, DYS2, и DYS4	1	MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTK WVNAQFSKFGKQH IENLFSDLQDGRRL LDLLEGLTGQKLPKEK GSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIV DGNHKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRN YPQVNVINFTTSSWDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQQSATQRLEHAF NIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQE VEMLP RPPKVTKEEHFQLHHQM HYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYA YTQAAYVTTS DPTRSPFPSQHLEAPEDK SFGSSLM ESEVNLD RYQTAL EE VLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFH THEGYMMDLTAHQGRVGNIL QLGSKLIGTGKLSEDEETE VQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLM DLQNQK LKELNDWLT KTEERTKMEEEPLGPDLEDLKRQVQ QHKVLQEDL EQEQVRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQKVLGDRWANICRW TEDR WVLLQDILLKWQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSL QKLA VLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARC WDNLVQKLEKSTAQISQQPDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAI SKLEMPSSLMLEVPTLERLQELQEATDEL DLKLRQAEVIKGSWQPVGDLL IDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTL EDLNTRWKL LQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISP NKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSA YRTAMKLRRLQK ALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPM DILQIINCLTTIYDRLEQEHNN LVNVPLCVDMCLN WLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTG IISLCKAHLEDKYRY LFKQVASSTGFC DQRRLLGLLLHDSIQIPRQLGEVASF GGSNI EPSVRSCF QFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPV LHRVAAAETAKHQAKCNICK ECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGE DVRDFAKVLKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWP VDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYL NDSISP NESIDD EHL LIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEER GELERILADLEEN RNLQAEYDR LKQQHEHKGLSPLSPPEMMPTSPQSPR
DYS3	2	MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTK WVNAQFSKFGKQH IENLFSDLQDGRRL DLLEGLTGQKLPKEK GSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGN HKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVN VINFTTSSWDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLG IEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP RPPKVTKE EHFQLHHQM HYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTS DPTRSP FPSQHLEAPEDK SFGSSLM ESEVNLD RYQTAL EEVLSWLLSAEDTLQAQGEIS NDVEVVKDQFH THEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETE VQ EQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLM DLQNQK LKELNDWLT KTEERT RKMEEEPLGPDLEDLKRQVQ QHKVLQEDLEEQEQVRVNSLTHMVVVVDESSG

Структура	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
		DHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCLFSA WLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLK QDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQOPDLAPGLT TIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPTLERLQELQEATDELD LKLKRAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLAR QLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFL STSVQGPWERAISPKNVPYYINHETQTTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSA YRTAMKLRRLQKALCLDLLSLAACDALDQHNLKQNDQPMQILQIINCLTTIY DRLEQEHNVLVNVPLCVDMLNWLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIIISLCKAHL EDKYRYLQKQVASTGFCQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRS CFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLRVAAAETAQHQAQKCNIC KECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDV RDFAKVLKKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
DYS5	79	MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTKVVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRLL DLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVKNALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGN HKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVN VINFTTSWSDGLALNALIHSRPLDFDWSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLG IEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLRPPKVTKE EHFQLHHQMHSYQQITVSLAQQYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTSDPTRSP FPSQHLEAPEDKSFSGSSMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEIS NDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSSEDETEVQ EQMNLNLSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMQNLQKLKELNDWLTKTEERT RKMEEEEPLGPDLEDLKRQVQHKVLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVDESSG DHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCLFSA WLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLK QDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQOPDLAPGLT TIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPTLERLQELQEATDELD LKLKRAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLAR QLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFL STSVQGPWERAISPKNVPYYINHETQTTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSA YRTAMKLRRLQKALCLDLLSLAACDALDQHNLKQNDQPMQILQIINCLTTIY DRLEQEHNVLVNVPLCVDMLNWLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIIISLCKAHL EDKYRYLQKQVASTGFCQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRS CFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLRVAAAETAQHQAQKCNIC KECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDV RDFAKVLKKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTINFWPVDSA PASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSSISPNESIDDEHLLIQHYC QSLNQDSPLSQPRSPAQILISLES

Структура	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
DYS6	91	MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDLQDGRRL DLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGN HKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVN VINFTTSWSDGLALNALIHSRDLFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLG IEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLRPPPKVTKE EHFQLHHQMHSYQQITVSLAQQYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTSDPTRSP FPSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALVEEVLWLLSAEDTLQAQGEIS NDVEVVKDQFHTEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSSEDETEVQ EQMNNLSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNQKLENDWLTKEERT RKMEEPLGPDLEDLKRQVQHKVLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVDESSG DHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQLTEEQCLFSA WLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLK QDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDFARCWDNLVQKLEKSTAQISQPDAPGLT TIGASPTQTVTLVTQPVTKETAIKLEMPSSLMLEVPTLERLQELQEATDELD LKLRAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLAR QLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHF STSVQGPWERAISPKNVPYYINHETQTTCDWHPKMTLEYQSLADLNNVRFSA YRTAMKLRRLQKALCLDLSLAAACDALDQHNLKQNDQPMILQIINCLTTIY DRLEQEHNNLVNPLCVDMLNWLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGHSCKAHL EDKYRYLQKQVASTGFCQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGAKHQAKCN ICKECPIIFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTSGED VRDFAKVLKNKFRTRKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVD APASSQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDISPNESIDDEHLLIQHY CQSLNQDSPLSQPRSAQILISLESEERGERILADLEENRNLAQAEYDRLKQQ HEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPR
DYS7	92	MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDLQDGRRL DLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGN HKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVN VINFTTSWSDGLALNALIHSRDLFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLG IEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLRPPPKVTKE EHFQLHHQMHSYQQITVSLAQQYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTSDPTRSP FPSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALVEEVLWLLSAEDTLQAQGEIS NDVEVVKDQFHTEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSSEDETEVQ EQMNNLSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNQKLENDWLTKEERT RKMEEPLGPDLEDLKRQVQHKVLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVDESSG DHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILEISYVPSTYLTEITHVS QALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLQKQESLKNIKDSLQSSGRIDIIHKKATAA LQSATPVERVKLQEALSQDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDI

Структура	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
		<p>KIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYK WYLKELQDGIGQRQTVVRTL NAT GEEIIQQSSKTDASILQEKL GSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQTLE RLQELQE ATDELDLKL RQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSH VNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKL LQVAVEDRVRQLHEAHRDFG PASQHFLSTSVQGPWERAISP NKVPYYINHETQTTCCWDHPKMTELYQSLADLN NVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPM DILQII NCLTTIYDRLEQEHN NLVNVPLCVDMLCNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGII SLCKAHLEDKYRYL FKQVASSTGFCDQRRLG LLLHDSIQIPRQLGEVASFGGS NIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETA KH QAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTP TTSGEDVRDFAKVLKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVT LIN FWPVD SAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLND SISP NESIDDE HLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLES</p>
DSY8	93	<p>MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTK WVNAQFSKFGKQH IENLFSDLQDGRRL DLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGN HKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVN VINFTTSWSDGLALNALIHSRPFDFD WNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLG IEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPRPPKVTKE EHFQLHHQM HYSQQITVSLAQQYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTS DPTRSP FPSQHLEAPEDKSFSGSSMESEVNLD RYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEIS NDVEVVKDQFH THEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGK LSEDEETE VQ EQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRV LMDLQNQKLKELNDWLT KTEERT RKMEEEEPLGPDLEDLKRQVQHKVLQEDLEQEQRVNSLTHM VVVVDESSG DHATAALEEQKVLGDRWANICRWTE DRWVLLQDILEISYVPSTYLTEITHVS QALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDL FKQEESLKNIKDSLQSSGRIDIIH SKKTA LQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEK WRRFH YDI KIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYK WYLKELQDGIGQRQTVVRTL NAT GEEIIQQSSKTDASILQEKL GSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQTLE RLQELQE ATDELDLKL RQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSH VNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKL LQVAVEDRVRQLHEAHRDFG PASQHFLSTSVQGPWERAISP NKVPYYINHETQTTCCWDHPKMTELYQSLADLN NVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPM DILQII NCLTTIYDRLEQEHN NLVNVPLCVDMLCNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGII SLCKAHLEDKYRYL FKQVASSTGFCDQRRLG LLLHDSIQIPRQLGEVASFGGS NIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETA KH QAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTP TTSGEDVRDFAKVLKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET</p>

5.2.2 Композиции нуклеиновых кислот, кодирующие микродистрофин

[0091] Другим аспектом настоящего изобретения являются нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин, как описано в данном документе. Такие нуклеиновые кислоты содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие микродистрофин, домены которого расположены от N-конца к C-концу следующим образом: ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT, ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR, ABD1-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT, или ABD1-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR. Нуклеотидная последовательность может быть любой нуклеотидной последовательностью, которая кодирует домены. Нуклеотидная последовательность может быть кодон-оптимизирована и/или истощена в отношении CpG-островков для экспрессии в соответствующем контексте. В конкретных вариантах осуществления нуклеотидные последовательности кодируют микродистрофин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 79, 91, 92 или 93. Нуклеотидная последовательность может представлять собой любую последовательность, кодирующую микродистрофин, включая микродистрофин SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 93, последовательность которых может варьироваться из-за вырожденности кода. В таблицах 3 и 4 приведены иллюстративные нуклеотидные последовательности, кодирующие домены *DMD*. В таблице 3 представлена нуклеотидная последовательность *DMD* дикого типа для компонента, а в таблице 4 представлена нуклеотидная последовательность для компонента *DMD*, используемого в конструкциях по настоящему документу, включая последовательности, которые были кодон-оптимизированы и/или истощены в отношении CpG-островков, как указано ниже:

Таблица 3: Нуклеотидные последовательности сегмента дистрофина

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
ABD1	22	ATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTTATGAAAGAGAAGATGTT CAAAAGAAAACATTCACAAAATGGGTAATGCACAATTTTCTAAGTTT GGGAAGCAGCATATTGAGAACCTCTTCAGTGACCTACAGGATGGGAG GCGCCTCCTAGACCTCCTCGAAGGCCTGACAGGGCAAAAAGTCCAAA AGAAAAGGATCCACAAGAGTTCATGCCCTGAACAATGTCAACAAGG CACTGCGGGTTTTGCAGAACAATAATGTTGATTTAGTGAATATTGGAA GTAATGACATCGTAGATGGAAATCATAAACTGACTCTTGGTTTTGATTTG GAATATAATCCTCCACTGGCAGGTCAAAAATGTAATGAAAAATATCAT GGCTGGATTGCAACAACAACAGTGAAGAGATTCTCCTGAGCTGGGT CCGACAATCAACTCGTAATTATCCACAGGTTAATGTAATCAACTTCAC CACCAGCTGGTCTGATGGCCTGGCTTTGAATGCTCTCATCCATAGTCAT AGGCCAGACCTATTTGACTGGAATAGTGTGGTTTTGCCAGCAGTCAGCC ACACAACGACTGGAACATGCATTCAACATCGCCAGATATCAATTAGGC ATAGAGAACTACTCGATCCTGAAGATGTTGATACCACCTATCCAGAT AAGAAGTCCATCTTAATGTACATCACATCACTCTTCCAAGTTTTGCCT
L1	23	CAACAAGTGAGCATTGAAGCCATCCAGGAAGTGGAA
H1	24	ATGTTGCCAAGGCCACCTAAAGTGACTAAAGAAGAACATTTTCAGTTA CATCATCAAATGCACTATTCTCAACAGATCACGGTCAGTCTAGCACAG GGATATGAGAGAACTTCTTCCCCTAAGCCTCGATTCAAGAGCTATGCC

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		TACACACAGGCTGCTTATGTCACCACCTCTGACCCTACACGGAGCCCA TTTCCTTCACAGCATTGGAAGCTCCTGAAGAC
L2	25	AAGTCATTTGGCAGTTCATTGATGGAG
R1	26	AGTGAAGTAAACCTGGACCGTTATCAAACAGCTTTAGAAGAAGTATTA TCGTGGCTTCTTTCTGCTGAGGACACATTGCAAGCACAAGGAGAGATT TCTAATGATGTGGAAGTGGTCAAAGACCAGTTTCATACTCATGAGGGG TACATGATGGATTTGACAGCCCATCAGGGCCGGGTTGGTAATATTCTA CAATTGGGAAGTAAGCTGATTGGAACAGGAAAATTATCAGAAGATGA AGAACTGAAGTACAAGAGCAGATGAATCTCTAAATTCAAGATGGG AATGCCTCAGGGTAGCTAGCATGGAAAAACAAAGCAATTTACATAGA
R2	27	GTTTTAATGGATCTCCAGAATCAGAACTGAAAGAGTTGAATGACTGG CTAACAAAAACAGAAGAAAGAACAAGGAAAATGGAGGAAGAGCCTCT TGGACCTGATCTTGAAGACCTAAAACGCCAAGTACAACAACATAAGGT GCTTCAAGAAGATCTAGAACAAGAACAAGTCAGGGTCAATTCTCTCAC TCACATGGTGGTGGTAGTTGATGAATCTAGTGGAGATCACGCAACTGC TGCTTTGGAAGAACAACCTAAGGTATTGGGAGATCGATGGGCAAACAT CTGTAGATGGACAGAAGACCGCTGGGTTCTTTTACAAGAC
L3	28	ATCCTT
R3	29	CTCAAATGGCAACGTCTTACTGAAGAACAGTGCCTTTTTAGTGCATGG CTTTCAGAAAAAGAAGATGCAGTGAACAAGATTCACACAACCTGGCTTT AAAGATCAAATGAAATGTTATCAAGTCTTCAAAAACCTGGCCGTTTTA AAAGCGGATCTAGAAAAGAAAAGCAATCCATGGGCAAACCTGTATTC ACTCAAACAAGATCTTCTTTCAACACTGAAGAATAAGTCAGTGACCCA GAAGACGGAAGCATGGCTGGATAACTTTGCCCGGTGTTGGGATAATTT AGTCCAAAAACTTGAAAAGAGTACAGCACAGATTTACAG
R16	94	gaaattcttatgtgccttctacttatttgactgaaatcactcatgtctcacaagcctattagaagtgaacaacttctcaat gctcctgacctctgtgctaaggactttgaagatctcttaagcaagaggagtctctgaagaatataaaagatagtctaca acaagctcagtcgattgacattatcatagcaagaagacagcagcattgcaaagtgcaacgcctgtggaagg tgaagctacaggaagctctcccagcttgattccaatgggaaaagttaacaaatgtacaaggaccgacaagg cgattgacaga
L4.1	107	TCTGTT
R17	95	gagaaatggcggcgtttcattatgatataaagatattaatcagtggttaacagaagctgaacagtttctcagaagac acaattctgagaattggcaatgctaaatacaatggtatcttaaggaactccaggatggcattggcgagcgga aactgttgtagaacattgaatgcaactggggaagaataattcagcaatcctcaaaaacagatgccagattctacag gaaaattgggaagcctgaatctgcggtggcaggagtctgcaaacagctgtcagacagaaaaagaggtagaa
R16-R17	96	gaaattcttatgtgccttctacttatttgactgaaatcactcatgtctcacaagcctattagaagtgaacaacttctcaat gctcctgacctctgtgctaaggactttgaagatctcttaagcaagaggagtctctgaagaatataaaagatagtctaca acaagctcagtcgattgacattatcatagcaagaagacagcagcattgcaaagtgcaacgcctgtggaagg tgaagctacaggaagctctcccagcttgattccaatgggaaaagttaacaaatgtacaaggaccgacaagg

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		cgatttgacagaTCTGTTgagaaatggcggcgttttcattatgatataaagatattaatcagtggttaacagaagc tgaacagtttctcagaaagacacaaattctgagaattgggaacatgctaaatacaaatggtatcttaaggaactccag gatggcattgggcagcggcaaacgtgtgcagaacattgaatgcaactggggaagaataatcagcaatcctcaaaa acagatgccagattctacaggaaaaattgggaagcctgaatctgcgggtggcaggaggtctgcaaacagctgtcaga cagaaaaaaggctagaa
L4.2	108	CAAACCCTTGAA
H3	30	CAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCCTCTCCTACTC AGACTGTTACTCTGGTGACACAACCTGTGGTTACTAAGGAAACTGCCA TCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAGGTACCT
L4	31	ACCCTTGAA
R24	32	AGACTCCAACCTCAAGAGGCCACGGATGAGCTGGACCTCAAGCTGCGC CAAGCTGAGGTGATCAAGGGATCCTGGCAGCCCGTGGGCGATCTCCTC ATTGACTCTCTCAAGATCACCTCGAGAAAGTCAAGGCACTTCGAGGA GAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACGTGAGCCACGTCAATGACCTTGCT CGCCAGCTTACCACTTTGGGCATTCAGCTCTCACCGTATAACCTCAGCA CTCTGGAAGACCTGAACACCAGATGGAAGCTTCTGCAGGTGGCCGTCG AGGACCGAGTCAGGCAGCTGCATGAA
H4	33	GCCCACAGGGACTTTGGTCCAGCATCTCAGCACTTTCTTTCCACGTCTG TCCAGGGTCCCTGGGAGAGAGCCATCTCGCCAAACAAAGTGCCCTACT ATATCAACCACGAGACTCAAACAACCTTGCTGGGACCATCCCAAATGA CAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGATTCTCAGC TTATAGGACTGCCATGAAACTC
Богатый цистеином домен (CR)	34	CGAAGACTGCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCT GCATGTGATGCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAAATGACCAGCCC ATGGATATCCTGCAGATTATTAATTGTTTGACCACTATTTATGACCGCC TGGAGCAAGAGCACAAACAATTTGGTCAACGTCCCTCTCTGCGTGGATA TGTGTCTGAACTGGCTGCTGAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGA GGATCCGTGTCCTGTCTTTTAAACTGGCATCATTTCCCTGTGTAAAGC ACATTTGGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTC AACAGGATTTTGTGACCAGCGCAGGCTGGGCCTCCTTCTGCATGATTCT ATCCAAATTCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCATCCTTTGGGGCAGT AACATTGAGCCAAGTGTCCGGAGCTGCTTCCAATTTGCTAATAATAAG CCAGAGATCGAAGCGGCCCTCTTCCTAGACTGGATGAGACTGGAACCC CAGTCCATGGTGTGGCTGCCCGTCTGCACAGAGTGGCTGCTGCAGAA ACTGCCAAGCATCAGGCCAAATGTAACATCTGCAAAGAGTGTCCAATC ATTGGATTCAGGTACAGGAGTCTAAAGCACTTTAATTATGACATCTGC CAAAGCTGCTTTTTTTCTGGTCGAGTTGCAAAGGCCATAAAATGCAC TATCCCATGGTGAATATTGC
CR короткий	109	gccaaagcatcaggccaaatgtaacatctgcaagagtgccaatcattggattcaggtacaggagtctaaagcacttta

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		attatgacatctgccaaagctgcttttttctggctgagittgcaaaaggccataaaatgcactatcccatggggaatattg с
С-концевой (СТ) домен	35	ACTCCGACTACATCAGGAGAAGATGTTTCGAGACTTTGCCAAGGTA ACTA AAAAACAAATTTTCGAACCAAAAAGGTATTTTGCGAAGCATCCCCGAATG GGCTACCTGCCAGTGCAGACTGTCTTAGAGGGGGACAACATGGAACT CCCGTTACTCTGATCAACTTCTGGCCAGTAGATTCTGCGCCTGCCTCGT CCCCTCAGCTTTCACACGATGATACTCATTACGCATTGAACATTATGC TAGCAGGCTAGCAGAAATGGAAAACAGCAATGGATCTTATCTAAATG ATAGCATCTCTCCTAATGAGAGCATAGATGATGAACATTTGTAAATCC AGCATTACTGCCAAAGTTTGAACCAGGACTCCCCCTGAGCCAGCCTC GTAGTCCTGCCAGATCTTGATTTCTTAGAGAGTGAGGAAAGAGGGG AGCTAGAGAGAATCCTAGCAGATCTTGAGGAAGAAAACAGGAATCTG CAAGCAGAATATGACCGTCTAAAGCAGCAGCACGAACATAAAGGCCT GTCCCCACTGCCGTCCCCTCCTGAAATGATGCCACCTCTCCCCAGAGT CCCCGG
L4	36	GAGACCCTTGAA
L4	37	CTTGAA
H2	38	CCATCACTAACACAGACA ACTGTAATGGAAACAGTAACTACGGTGACC ACAAGGGAACAGATCCTGGTAAAGCATGCTCAAGAGGAACTTCCACC ACCACCTCCCCAAAAGAAGAGGCAGATTACTGTGGAT

Таблица 4: Нуклеотидные последовательности сегмента RGX-DYS

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
ABD	57	ATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGAT GTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCAATGCCCAGTTCAGCA AGTTTGGCAAGCAGCACATTGAGAACCTGTTTCAGTGACCTGCAGGA TGGCAGAAGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAA GCTGCCTAAAGAGAAGGGCAGCACAAAGAGTGCATGCCCTGAACAA TGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAATGTGGACCT GGTCAATATTGGCAGCACAGACATTGTGGATGGCAACCACAAGCTG ACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTGGCAAGTGAAGA ATGTGATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACCAACTCTGA GAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGAGACAGAGCACCAGAACTACCCT CAAGTGAATGTGATCAACTTACCACCTCTTGGAGTGATGGACTGG CCCTGAATGCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTACTG GAACTCTGTTGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACAT GCCTTCAACATTGCCAGATACCAGCTGGGAATTGAGAACTGCTGG ACCCTGAGGATGTGGACACCACCTATCCTGACAAGAAATCCATCCT

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CATGTACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCC
L1	58	CAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAGGTTGAG
H1	59	ATGCTGCCCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTTCCAGC TGCACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGC CCAGGGATATGAGAGAACAAGCAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAG CTATGCCTACACACAGGCTGCCTATGTGACCACATCTGACCCACA AGAAGCCCATTTCCAAGCCAGCATCTGGAAGCCCCTGAGGAC
L2	60	AAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAA
R1	61	TCTGAAGTGAACCTGGATAGATACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTG CTGTCCTGGCTGCTGTCTGCTGAGGATACTGCAGGCTCAGGGTG AAATCAGCAATGATGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTCACACCCA TGAGGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCACCAGGGCAGAGTGGG AAATATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCACAGGCAAGCTG TCTGAGGATGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACCTGCTG AACAGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAG AGCAACCTGCACAGA
R2	62	GTGCTCATGGACCTGCAGAATCAGAACTGAAAGAAGTGAATGACT GGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAGAGGAA CCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAG CATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAGCAAGAGCAAGTCAGAGTG AACAGCCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATGAGTCCTCTGGGG ATCATGCCACAGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAAGGTGCTGGGAG ACAGATGGGCCAACATCTGTAGGTGGACAGAGGATAGATGGGTGC TGCTCCAGGAC
L3	63	ATTCTG
R3	64	CTGAAGTGGCAGAGACTGACAGAGGAACAGTGCCTGTTTTCTGCCT GGCTCTCTGAGAAAGAGGATGCTGTCAACAAGATCCATACCACAGG CTTCAAGGATCAGAATGAGATGCTCAGCTCCCTGCAGAACTGGCT GTGCTGAAGGCTGACCTGGAAAAGAAAAAGCAGTCCATGGGCAAG CTCTACAGCCTGAAGCAGGACCTGCTGTCTACCCTGAAGAACAAGT CTGTGACCCAGAAAAGTGGGCTGGCTGGACAACCTTTGCTAGATG CTGGGACAACCTGGTGCAGAAGCTGGAAAAGTCTACAGCCCAGAT CAGCCAG
H3	65	CAACCTGATCTTGCCCCTGGCCTGACCACAATTGGAGCCTCTCCAA CACAGACTGTGACCCTGGTTACCCAGCCAGTGGTCACCAAAGAGAC AGCCATCAGCAAAGTGGAAATGCCAGCTCTCTGATGCTGGAAGTC CCC
L4	66	ACACTGGAA

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
R16	97	GAGATCAGCTATGTGCCCAGCACCTACCTGACAGAGATCACCCATG TGTCTCAGGCCCTGCTGGAAGTGGAACAGCTGCTGAATGCCCTGA CCTGTGTGCCAAGGACTTTGAGGACCTGTTCAAGCAAGAGGAAAGC CTGAAGAACATCAAGGACAGCCTGCAGCAGTCCTCTGGCAGAATTG ACATCATCCACAGCAAGAAAACAGCTGCCCTGCAGTCTGCCACACC TGTGGAAAGAGTGAAGCTGCAAGAGGCCCTGAGCCAGCTGGACTT CCAGTGGGAGAAAGTGAACAAGATGTACAAGGACAGGCAGGGCAG ATTTGATAGA
L4.1	125	AGTGTG
R17	98	GAAAAGTGGAGAAGGTTCCACTATGACATCAAGATCTTCAACCAGT GGCTGACAGAGGCTGAGCAGTTCCTGAGAAAGACACAGATCCCTG AGAAGTGGGAGCATGCCAAGTACAAGTGGTATCTGAAAGAACTGC AGGATGGCATTGGCCAGAGACAGACAGTTGTCAGAACCCTGAATG CCACAGGGGAAGAGATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACAGATGCCA GCATCCTGCAAGAGAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGAGATGGCAAG AAGTGTGCAAGCAGCTGTCTGACAGAAAGAAGAGGCTGGAAGAA
R16-R17	99	GAGATCAGCTATGTGCCCAGCACCTACCTGACAGAGATCACCCATG TGTCTCAGGCCCTGCTGGAAGTGGAACAGCTGCTGAATGCCCTGA CCTGTGTGCCAAGGACTTTGAGGACCTGTTCAAGCAAGAGGAAAGC CTGAAGAACATCAAGGACAGCCTGCAGCAGTCCTCTGGCAGAATTG ACATCATCCACAGCAAGAAAACAGCTGCCCTGCAGTCTGCCACACC TGTGGAAAGAGTGAAGCTGCAAGAGGCCCTGAGCCAGCTGGACTT CCAGTGGGAGAAAGTGAACAAGATGTACAAGGACAGGCAGGGCAG ATTTGATAGAAGTGTGGAAAAGTGGAGAAGGTTCCACTATGACATC AAGATCTTCAACCAGTGGCTGACAGAGGCTGAGCAGTTCCTGAGAA AGACACAGATCCCTGAGAAGTGGGAGCATGCCAAGTACAAGTGGT ATCTGAAAGAACTGCAGGATGGCATTGGCCAGAGACAGACAGTTG TCAGAACCCTGAATGCCACAGGGGAAGAGATCATCCAGCAGAGCA GCAAGACAGATGCCAGCATCCTGCAAGAGAAGCTGGGCAGCCTGA ACCTGAGATGGCAAGAAGTGTGCAAGCAGCTGTCTGACAGAAAGA AGAGGCTGGAAGAA
L4.2	126	CAGACACTGGAA
R24	67	AGGCTGCAAGAAGTTCAGAGGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAG CTGAGACAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGG GACCTGCTCATTGATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAAG CCCTGAGGGGAGAGATTGCCCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGT GAATGACCTGGCCAGACAGCTGACCACACTGGGAATCCAGCTGAG CCCCTACAACCTGAGCACCTTGAGGACCTGAACACCAGGTGGAAG

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CTCCTCCAGGTGGCAGTGGAAGATAGAGTCAGGCAGCTGCATGAG
H4	68	GCCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGTCTACCT CTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCCTAACAAGGTGCC CTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTTGGGATCACCCC AAGATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACAATGTCA GATTCAGTGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTC
Богатый цистеином домен (CR)	69	AGAAGGCTCCAGAAAGCTCTGTGCCTGGACCTGCTTTCCCTGAGTG CAGCTTGTGATGCCCTGGACCAGCACAACTGAAGCAGAATGACCA GCCTATGGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTCACCACCATCTATG ATAGGCTGGAACAAGAGCACAACTCTGGTCAATGTGCCCTGTG TGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTATGACACAGGC AGAACAGGCAGGATCAGAGTCTGTCTTCAAGACAGGCATCATCT CCCTGTGCAAAGCCCACTTGGAGGACAAGTACAGATACCTGTTCAA GCAAGTGGCCTCCAGCACAGGCTTTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGC CTGCTCCTGCATGACAGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAG TGGCTTCCTTTGGAGGCAGCAATATTGAGCCATCAGTCAGGTCCTG TTTTAGTTTGCCAACAACAAGCCTGAGATTGAGGCTGCCCTGTTCC TGGACTGGATGAGACTTGGAGCCTCAGAGCATGGTCTGGCTGCCTGT GCTTCATAGAGTGGCTGCTGCTGAGACTGCCAAGCACCAGGCCAAG TGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCATTGGCTTCAGATACAGAT CCCTGAAGCACTTCAACTATGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGT GGCAGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGGA TACTGC
CR короткий (DYS6)	100	GCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATC ATTGGCTTCAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATGATATCT GCCAGAGCTGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCACAAAAT GCACTACCCCATGGTGGAATACTGC
C-концевой домен (DYS1, DYS2, DYS4, DYS6)	70	ACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGGTGC TGAAAAACAAGTTCAGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCCAG AATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACAGTGCTTGAGGGTGACAACATG GAAACCCCTGTGACACTGATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTGCCC CTGCCTCAAGTCCACAGCTGTCCCATGATGACACCCACAGCAGAAT TGAGCACTATGCCTCCAGACTGGCAGAGATGGAAAACAGCAATGG CAGCTACCTGAATGATAGCATCAGCCCCAATGAGAGCATTGATGAT GAGCATCTGCTGATCCAGCACTACTGTCAGTCCCTGAACCAGGACT CTCCACTGAGCCAGCCTAGAAGCCCTGCTCAGATCCTGATCAGCCT TGAGTCTGAGGAAAGGGGAGAGCTGGAAAGAATCCTGGCAGATCT TGAGGAAGAGAACAGAAACCTGCAGGCAGAGTATGACAGGCTCAA

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		ACAGCAGCATGAGCACAAGGGACTGAGCCCTCTGCCTTCTCCTCCT GAAATGATGCCACCTCTCCACAGTCTCCAAGGTGATGA(стоп- кодоны подчеркнуты)
Минимальный C- концевой (CT1.5) Домен (DYS5, DYS7)	80	ACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGGTGC TGAAAACAAGTTCAGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCAG AATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACAGTGCTTGAGGGTGACAACATG GAAACCCCTGTGACACTGATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTGCCC CTGCCTCAAGTCCACAGCTGTCCCATGATGACACCCACAGCAGAAT TGAGCACTATGCCTCCAGACTGGCAGAGATGGAAAACAGCAATGG CAGCTACCTGAATGATAGCATCAGCCCCAATGAGAGCATTGATGAT GAGCATCTGCTGATCCAGCACTACTGTCAGTCCCTGAACCAGGACT CTCCACTGAGCCAGCCTAGAAGCCCTGCTCAGATCCTGATCAGCCT TGAGTCTTGATGA (стоп-кодоны)
L4	71	GAAACACTGGAA или GAGACACTGGAA
L4	72	CTGGAA

[0092] В некоторых вариантах осуществления такие композиции содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ABD1, которая состоит из SEQ ID NO: 22, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 22; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H1, которая состоит из SEQ ID NO: 24, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 24; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R1, которая состоит из SEQ ID NO: 26, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 26; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R2, которая состоит из SEQ ID NO: 27, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 27; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R3, которая состоит из SEQ ID NO: 29, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 29; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H3, которая состоит из SEQ ID NO: 30, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 30; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R24, которая состоит из SEQ ID NO: 32, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере

мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H4, которая состоит из SEQ ID NO: 33, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 33; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CR, которая состоит из SEQ ID NO: 34 или 109, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 34 или 109; и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CT, которая состоит из SEQ ID NO: 35, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 35, которая кодирует микродистрофин, который имеет функциональную активность. Альтернативный вариант осуществления такой же, как и вышеизложенное, за исключением того, что последовательность нуклеиновой кислоты H3 заменяется нуклеиновой кислотой, кодирующей H2, которая состоит из SEQ ID NO: 38 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 38, также кодирующей микродистрофин, который имеет функциональную активность.

[0093] В некоторых вариантах осуществления такие композиции содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ABD1, которая состоит из SEQ ID NO: 22, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 22, и кодирует домен ABD1 с SEQ ID NO: 3; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H1, которая состоит из SEQ ID NO: 24, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 24, и кодирует домен H1 с SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R1, которая состоит из SEQ ID NO: 26, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 26, и кодирует домен R1 с SEQ ID NO: 7; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R2, которая состоит из SEQ ID NO: 27, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 27, и кодирует домен R2 с SEQ ID NO: 8; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R3, которая состоит из SEQ ID NO: 29, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 29, и кодирует домен R3 с SEQ ID NO: 10; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H3, которая состоит из SEQ ID NO: 30, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 30, и кодирует домен H3 с SEQ ID NO: 11; последовательность нуклеиновой

кислоты, кодирующую R24, которая состоит из SEQ ID NO: 32, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32, и кодирует домен R24 с SEQ ID NO: 13; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H4, которая состоит из SEQ ID NO: 33, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 33, и кодирует домен H4 с SEQ ID NO: 14; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CR, которая состоит из SEQ ID NO: 34 или 109, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 34 или 109, и кодирует домена CR с SEQ ID NO: 15 или 90; и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CT, которая состоит из SEQ ID NO: 35 или 80, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 35 или 80, и кодирует домена CT с SEQ ID NO: 16 или 83. Альтернативный вариант осуществления такой же, как и вышеизложенное, за исключением того, что последовательность нуклеиновой кислоты H3 заменяют нуклеиновой кислотой, кодирующей H2, которая состоит из SEQ ID NO: 38 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 38 и кодирует домен H2 с SEQ ID NO: 19.

[0094] В дополнение к вышесказанному, композиции нуклеиновых кислот могут необязательно включать нуклеотидные последовательности, кодирующие линкеры в описанных выше местах, которые включают или состоят из следующих последовательностей: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L1, состоящая из SEQ ID NO: 23 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23 (например, которая кодирует домен L1 с SEQ ID NO: 4); последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L2, состоящая из SEQ ID NO: 25 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 25 (например, которая кодирует домен L2 с SEQ ID NO: 6); последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L3, состоящая из SEQ ID NO: 28 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 50% идентичности с SEQ ID NO: 28, которая кодирует домен L3 с SEQ ID NO: 9 или вариант с консервативными заменами для обоих остатков L3; и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L4, состоящая из SEQ ID NO: 31, 36 или 37 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 31, 36 или 37 (например, которая кодирует домен L4 с SEQ ID NO: 12, 17 или 18 или вариант с консервативными заменами для любого из остатков L4).

[0095] В некоторых вариантах осуществления такие композиции содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ABD1, которая состоит из SEQ ID NO: 22, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 22;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H1, которая состоит из SEQ ID NO: 24, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 24; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R1, которая состоит из SEQ ID NO: 26, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 26; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R2, которая состоит из SEQ ID NO: 27, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 27; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R16, которая состоит из SEQ ID NO: 94, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 94; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R17, которая состоит из SEQ ID NO: 95, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 95; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R24, которая состоит из SEQ ID NO: 32, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H4, которая состоит из SEQ ID NO: 33, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 33; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CR, которая состоит из SEQ ID NO: 34 или 109, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 34 или 109; и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую СТ, которая состоит из SEQ ID NO: 35, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 35, которая кодирует микродистрофин, который имеет функциональную активность. Альтернативный вариант осуществления такой же, как и вышеизложенное, за исключением того, что последовательность нуклеиновой кислоты H3 заменяется нуклеиновой кислотой, кодирующей H2, которая состоит из SEQ ID NO: 38 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 38, также кодирующей микродистрофин, который имеет функциональную активность.

[0096] В некоторых вариантах осуществления такие композиции содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ABD1, которая состоит из SEQ ID NO: 22, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 22, и

кодирует домен ABD1 с SEQ ID NO: 3; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H1, которая состоит из SEQ ID NO: 24, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 24, и кодирует домен H1 с SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R1, которая состоит из SEQ ID NO: 26, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 26, и кодирует домен R1 с SEQ ID NO: 7; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R2, которая состоит из SEQ ID NO: 27, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 27, и кодирует домен R2 с SEQ ID NO: 8; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R16, которая состоит из SEQ ID NO: 94, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 94, и кодирует домен R16 с SEQ ID NO: 86; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R17, который состоит из SEQ ID NO: 95, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 95, и кодирует домен R17 с SEQ ID NO: 87; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую R24, который состоит из SEQ ID NO: 32, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32, и кодирует домен R24 с SEQ ID NO: 13; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую H4, которая состоит из SEQ ID NO: 33, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 33, и кодирует домен H4 с SEQ ID NO: 14; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CR, которая состоит из SEQ ID NO: 34 или 109, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 34 или 109, и кодирует домена CR с SEQ ID NO: 15 или 90; и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CT, которая состоит из SEQ ID NO: 35 или 80, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 35 или 80, и кодирует домена CT с SEQ ID NO: 16 или 83. Альтернативный вариант осуществления такой же, как и вышеизложенное, за исключением того, что последовательность нуклеиновой кислоты H3 заменяется нуклеиновой кислотой, кодирующей H2, которая состоит из SEQ ID NO: 38, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 38, и кодирует домен H2 с SEQ ID NO: 19.

[0097] В дополнение к вышесказанному, композиции нуклеиновых кислот могут необязательно содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие линкеры в описанных выше местах, которые содержат или состоят из следующих последовательностей: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L1,

состоящая из SEQ ID NO: 23, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23 (например, которая кодирует домен L1 с SEQ ID NO: 4); последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L2, состоящая из SEQ ID NO: 25, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 25 (например, которая кодирует домен L2 с SEQ ID NO: 6); последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L3, состоящая из SEQ ID NO: 28, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 50% идентичности с SEQ ID NO: 28, которая кодирует домен L3 с SEQ ID NO: 9 или вариант с консервативными заменами для обоих остатков L3; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L4.1, состоящая из SEQ ID NO: 125 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 125 (например, которая кодирует домен L4.1 с SEQ ID NO: 110 или вариант с консервативными заменами для любого из остатков L4.1); и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L4.2, состоящая из SEQ ID NO: 126 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 126 (например, которая кодирует домен L4.2 с SEQ ID NO: 89 или вариант с консервативными заменами для любого из остатков L4.2).

[0098] В различных вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 93. В вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая представляет собой SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, или SEQ ID NO: 103 (которая кодирует микродистрофины SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, и SEQ ID NO: 93, соответственно). В различных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая микродистрофин, может иметь по меньшей мере 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 20, 21, 83, 101, 102 или 103 (таблица 5) или ее обратной комплементарной цепью и может кодировать терапевтически эффективный микродистрофин.

Таблица 5: Нуклеотидные последовательности конструкции RGX-DYS

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
DYS1, DYS2, и DYS4	20	ATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCA GAAGAAAACCTTACCAAATGGGTCAATGCCAGTTCAGCAAGTTTGGCA AGCAGCACATTGAGAACCTGTTCAGTGACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTG CTGGATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGG CAGCACAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGC TGCAGAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGCAGCACAGACATTGTG GATGGCAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCA

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CTGGCAAGTGAAGAATGTGATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGAC CCAACCTCTGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTCAGACAGAGCACCAGAAAC TACCCTCAAGTGAATGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGTGATGGACT GGCCCTGAATGCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTGACTGGA ACTCTGTTGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCTTC AACATTGCCAGATAACCAGCTGGGAATTGAGAAACTGCTGGACCCTGAGGA TGTGGACACCACCTATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCA GCCTGTTCCAGGTGCTGCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAG GTTGAGATGCTGCCCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTTCCA GCTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGCCC AGGGATATGAGAGAACAAGCAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCC TACACACAGGCTGCCTATGTGACCACATCTGACCCACAAGAAGCCCATT TCCAAGCCAGCATCTGGAAGCCCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCC TGATGGAATCTGAAGTGAACCTGGATAGATACCAGACAGCCCTGGAAGAA GTGCTGTCTGGCTGCTGTCTGCTGAGGATACACTGCAGGCTCAGGGTGA AATCAGCAATGATGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTCACACCCATGAGG GCTACATGATGGACCTGACAGCCCACCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTG CAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCACAGGCAAGCTGTCTGAGGATGAAGA GACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTC TGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGAGCAACCTGCACAGAGTGCTCATG GACCTGCAGAATCAGAAACTGAAAGAACTGAATGACTGGCTGACCAAGAC AGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAGAGGAACCTCTGGGACCAGACCTGG AAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTT GAGCAAGAGCAAGTCAGAGTGAACAGCCTGACACACATGGTGGTGGTTGT GGATGAGTCCTCTGGGGATCATGCCACAGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGA AGGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACATCTGTAGGTGGACAGAGGATAGA TGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGCTGAAGTGGCAGAGACTGACAGAGGA ACAGTGCCTGTTTTCTGCCTGGCTCTCTGAGAAAGAGGATGCTGTCAACA AGATCCATACCACAGGCTTCAAGGATCAGAATGAGATGCTCAGCTCCCTG CAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCTGACCTGGAAAAGAAAAAGCAGTCCAT GGGCAAGCTCTACAGCCTGAAGCAGGACCTGCTGTCTACCCTGAAGAACA AGTCTGTGACCCAGAAAAGTGAAGGCTGGCTGGACAACCTTTGCTAGATGC TGGGACAACCTGGTGCAGAAGCTGGAAAAGTCTACAGCCCAGATCAGCCA GCAACCTGATCTTGCCCCTGGCCTGACCACAATTGGAGCCTCTCCAACAC AGACTGTGACCCTGGTTACCCAGCCAGTGGTCACCAAAGAGACAGCCATC AGCAAACTGGAAATGCCAGCTCTCTGATGCTGGAAGTCCCCACACTGGA AAGGCTGCAAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAGCTGA GACAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGGGACCTGCTC

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>ATTGATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAAGCCCTGAGGGGAGA GATTGCCCCCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGACCTGGCCAGAC AGCTGACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTGAGCACCCCTT GAGGACCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTGGAAGATAG AGTCAGGCAGCTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGC ACTTTCTGTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCCT AACAAAGGTGCCCTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTTGGGA TCACCCCAAGATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACAATG TCAGATTCAGTGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGAAA GCTCTGTGCCTGGACCTGCTTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGA CCAGCACAATCTGAAGCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCA TCAACTGCCTCACCACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAACAAT CTGGTCAATGTGCCCTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAA TGTGTATGACACAGGCAGAACAGGCAGGATCAGAGTCTGTCTTCAAGA CAGGCATCATCTCCCTGTGCAAAGCCCACTTGGAGGACAAGTACAGATAC CTGTTCAAGCAAGTGGCCTCCAGCACAGGCTTTTGTGACCAGAGAAGGCT GGGCCTGCTCCTGCATGACAGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAG TGGCTTCCTTTGGAGGCAGCAATATTGAGCCATCAGTCAGGTCTGTTTT CAGTTTGCCAACAACAAGCCTGAGATTGAGGCTGCCCTGTTCCCTGGACTG GATGAGACTTGAGCCTCAGAGCATGGTCTGGCTGCCTGTGCTTCATAGAG TGGCTGCTGCTGAGACTGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAA GAGTGCCCCATCATTGGCTTCAAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTA TGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCACA AAATGCACTACCCCATGGTGGAAATACTGCACCCCAACAACCTCTGGGGAA GATGTTAGAGACTTTGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTCAGGACCAAGAG ATACTTTGCTAAGCACCCAGAAATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACAGTGC TTGAGGGTGACAACATGGAAACCCCTGTGACACTGATCAATTTCTGGCCA GTGGACTCTGCCCCTGCCTCAAGTCCACAGCTGTCCCATGATGACACCCA CAGCAGAATTGAGCACTATGCCTCCAGACTGGCAGAGATGGAAAAACAGCA ATGGCAGCTACCTGAATGATAGCATCAGCCCAATGAGAGCATTGATGAT GAGCATCTGCTGATCCAGCACTACTGTGAGTCCCTGAACCAGGACTCTCC ACTGAGCCAGCCTAGAAGCCCTGCTCAGATCCTGATCAGCCTTGAGTCTG AGGAAAGGGGAGAGCTGGAAAGAATCCTGGCAGATCTTGAGGAAGAGAAC AGAAACCTGCAGGCAGAGTATGACAGGCTCAAACAGCAGCATGAGCACAA GGGACTGAGCCCTCTGCCTTCTCCTCCTGAAATGATGCCACCTCTCCAC AGTCTCCAAGGTGATGA</p>
DYS3	21	<p>ATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCA GAAGAAAACCTTCACCAATGGGTCAATGCCAGTTCAGCAAGTTTGGCA</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		AGCAGCACATTGAGAACCTGTTTCAGTGACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTG CTGGATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGG CAGCACAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGC TGCAGAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGCAGCACAGACATTGTG GATGGCAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCA CTGGCAAGTGAAGAATGTGATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGA CCAACTCTGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTCAGACAGAGCACCAGAAAC TACCCTCAAGTGAATGTGATCAACTTCAACCACCTCTTGGAGTGATGGACT GGCCCTGAATGCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTACTGGA ACTCTGTTGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCTTC AACATTGCCAGATAACCAGCTGGGAATTGAGAACTGCTGGACCCTGAGGA TGTGGACACCACCTATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCA GCCTGTTCCAGGTGCTGCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAG GTTGAGATGCTGCCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTTCCA GCTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGCCC AGGGATATGAGAGAACAAGCAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCC TACACACAGGCTGCCTATGTGACCACATCTGACCCACAAGAAGCCCATT TCCAAGCCAGCATCTGGAAGCCCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCC TGATGGAATCTGAAGTGAACCTGGATAGATAACCAGACAGCCCTGGAAGAA GTGCTGTCTGGCTGCTGTCTGCTGAGGATACTGCAGGCTCAGGGTGA AATCAGCAATGATGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTACACCCATGAGG GCTACATGATGGACCTGACAGCCCACCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTG CAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCACAGGCAAGCTGTCTGAGGATGAAGA GACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTC TGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGAGCAACCTGCACAGAGTGCTCATG GACCTGCAGAATCAGAACTGAAAGAAGTGAATGACTGGCTGACCAAGAC AGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAGAGGAACCTCTGGGACCAGACCTGG AAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTT GAGCAAGAGCAAGTCAGAGTGAACAGCCTGACACACATGGTGGTGGTTGT GGATGAGTCCTCTGGGGATCATGCCACAGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGA AGGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACATCTGTAGGTGGACAGAGGATAGA TGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGCTGAAGTGGCAGAGACTGACAGAGGA ACAGTGCCTGTTTTCTGCCTGGCTCTCTGAGAAAGAGGATGCTGTCAACA AGATCCATAACACAGGCTTCAAGGATCAGAATGAGATGCTCAGCTCCCTG CAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCTGACCTGGAAAAGAAAAGCAGTCCAT GGGCAAGCTCTACAGCCTGAAGCAGGACCTGCTGTCTACCCTGAAGAACA AGTCTGTGACCCAGAAAAGTGGCCTGGCTGGACAACCTTTGCTAGATGC TGGGACAACCTGGTGCAGAAGCTGGAAAAGTCTACAGCCCAGATCAGCCA

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>GCAACCTGATCTTGCCCTGGCCTGACCACAATTGGAGCCTCTCCAACAC AGACTGTGACCCTGGTTACCCAGCCAGTGGTCACCAAAGAGACAGCCATC AGCAAACCTGGAATGCCAGCTCTCTGATGCTGGAAGTCCCCACACTGGA AAGGCTGCAAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAGCTGA GACAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGGGACCTGCTC ATTGATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAAGCCCTGAGGGGAGA GATTGCCCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGACCTGGCCAGAC AGCTGACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTGAGCACCTT GAGGACCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTGGAAGATAG AGTCAGGCAGCTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGC ACTTTCTGTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCCT ACAAGGTGCCCTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTTGGGA TCACCCCAAGATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACAATG TCAGATTCAGTGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGAAA GCTCTGTGCCTGGACCTGCTTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGA CCAGCACAATCTGAAGCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCA TCAACTGCCTCACCACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAACAAT CTGGTCAATGTGCCCTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAA TGTGTATGACACAGGCAGAACAGGCAGGATCAGAGTCTGTCCTTCAAGA CAGGCATCATCTCCCTGTGCAAAGCCCCTTGGAGGACAAGTACAGATAC CTGTTCAAGCAAGTGGCCTCCAGCACAGGCTTTTGTGACCAGAGAAGGCT GGGCCTGCTCCTGCATGACAGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAG TGGCTTCCTTTGGAGGCAGCAATATTGAGCCATCAGTCAGGTCTGTTTT CAGTTTGCCAACAACAAGCCTGAGATTGAGGCTGCCCTGTTCTTGACTG GATGAGACTTGAGCCTCAGAGCATGGTCTGGCTGCCTGTGCTTCATAGAG TGGCTGCTGCTGAGACTGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAA GAGTGCCCCATCATTGGCTTCAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTA TGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCACA AAATGCACTACCCCATGGTGGAAATACTGCACCCCAACAACCTCTGGGGAA GATGTTAGAGACTTTGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTCAGGACCAAGAG ATACTTTGCTAAGCACCCAGAATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACAGTGC TTGAGGGTGACAACATGGAAACC</p>
DYS5	81	<p>ATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCAG AAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCAATGCCAGTTCAGCAAGTTTGGCAAG CAGCACATTGAGAACCCTGTTTCAAGTACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTGCTG GATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGGCAG CACAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCTGCA GAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGCAGCACAGACATTGTGGATGG</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTGGCA AGTGAAGAATGTGATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACCAACTC TGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGACAGAGCACCAGAAACTACCCTCA AGTGAATGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGTGATGGACTGGCCCTGAAT GCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTACTGGAACCTCTGTTGTGT GCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCTTCAACATTGCCAGAT ACCAGCTGGGAATTGAGAACTGCTGGACCCTGAGGATGTGGACACCACCT ATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCT GCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAGGTTGAGATGCTGCCAG ACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACAATTCCAGCTGCACCACCAGATGCA CTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGCCCAGGGATATGAGAGAACAAG CAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCCTATGT GACCACATCTGACCCCACAAGAAGCCATTTCCAAGCCAGCATCTGGAAGC CCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCTGAAGTGAACCT GGATAGATACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTGTCTGGCTGCTGTCTGC TGAGGATACACTGCAGGCTCAGGGTGAAATCAGCAATGATGTGGAAGTGGT CAAGGACCAGTTTCACACCCATGAGGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCA CCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCAC AGGCAAGCTGTCTGAGGATGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACC TGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAG AGCAACCTGCACAGAGTGTCTCATGGACCTGCAGAATCAGAACTGAAAGA ACTGAATGACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAG AGGAACCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAG CATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAGCAAGAGCAAGTCAGAGTGAACAG CCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATGAGTCCTCTGGGGATCATGCCAC AGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAAGGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACAA TCTGTAGGTGGACAGAGGATAGATGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGCTGA AGTGGCAGAGACTGACAGAGGAACAGTGCCTGTTTTCTGCCTGGCTCTCTG AGAAAGAGGATGCTGTCAACAAGATCCATAACCAGGCTTCAAGGATCAGA ATGAGATGCTCAGCTCCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCTGACCTGG AAAAGAAAAGCAGTCCATGGGCAAGCTCTACAGCCTGAAGCAGGACCTG CTGTCTACCCTGAAGAACAAGTCTGTGACCCAGAAAAGTGGCCTGGCTG GACAACTTTGCTAGATGCTGGGACAACCTGGTGCAGAAGCTGGAAAAGTCT ACAGCCCAGATCAGCCAGCAACCTGATCTTGCCCTGGCCTGACCACAATT GGAGCCTCTCCAACACAGACTGTGACCCTGGTTACCCAGCCAGTGGTCACC AAAGAGACAGCCATCAGCAAAGTGGAAATGCCAGCTCTCTGATGCTGGAA GTCCCCACACTGGAAAGGCTGCAAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTG GACCTGAAGCTGAGACAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTT

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		GGGGACCTGCTCATTGATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAAGCC CTGAGGGGAGAGATTGCCCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGAC CTGGCCAGACAGCTGACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTG AGCACCTTGAGGACCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTG GAAGATAGAGTCAGGCAGCTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCC AGCCAGCACTTTCTGTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCT CTCCTAACAAGGTGCCCTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTT GGGATCACCCCAAGATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACA ATGTCAGATTCAGTGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGA AAGCTCTGTGCCTGGACCTGCTTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGA CCAGCACAATCTGAAGCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCAT CAACTGCCTCACCACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAACAATCT GGTCAATGTGCCCTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTG TATGACACAGGCAGAACAGGCAGGATCAGAGTCCTGTCTTCAAGACAGGC ATCATCTCCCTGTGCAAAGCCCACTTGGAGGACAAGTACAGATACCTGTTC AAGCAAGTGGCCTCCAGCACAGGCTTTTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCTG CTCCTGCATGACAGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTGGCTTCC TTTGGAGGCAGCAATATTGAGCCATCAGTCAGGTCCTGTTTTAGTTTGCCA ACAACAAGCCTGAGATTGAGGCTGCCCTGTTCCCTGGACTGGATGAGACTTG AGCCTCAGAGCATGGTCTGGCTGCCTGTGCTTCATAGAGTGGCTGCTGCTGA GACTGCCAAGCACCCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCAT TGGCTTTCAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATGATATCTGCCAGAGC TGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATG GTGGAATACTGCACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCC AAGGTGCTGAAAAACAAGTTCAGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCC AGAATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACAGTGCTTGGAGGTGACAACATGGAA ACCCCTGTGACACTGATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTGCCCTGCCTCAA GTCCACAGCTGTCCCATGATGACACCCACAGCAGAATTGAGCACTATGCCT CCAGACTGGCAGAGATGGAAAACAGCAATGGCAGCTACCTGAATGATAGC ATCAGCCCCAATGAGAGCATTTGATGATGAGCATCTGCTGATCCAGCACTAC TGTCAGTCCCTGAACCAGGACTCTCCACTGAGCCAGCCTAGAAGCCCTGCTC AGATCCTGATCAGCCTTGAGTCTTGATGA
RGX-DYS6 (кодирующая последовательность п.о.)	101	ATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCAG AAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCAATGCCAGTTCAGCAAGTTTGGCAAG CAGCACATTGAGAACCTGTTTCAGTGACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTGCTG GATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGGCAG CACAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCTGCA GAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGCAGCACAGACATTGTGGATGG

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTGGCA AGTGAAGAATGTGATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACCAACTC TGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGAGACAGAGCACCAGAAACTACCCTCA AGTGAATGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGTGATGGACTGGCCCTGAAT GCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTACTGGAACCTCTGTTGTGT GCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCTTCAACATTGCCAGAT ACCAGCTGGGAATTGAGAACTGCTGGACCCTGAGGATGTGGACACCACCT ATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCT GCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAGGTTGAGATGCTGCCAG ACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTTCCAGCTGCACCACCAGATGCA CTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGCCCAGGGATATGAGAGAACAAG CAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCCTATGT GACCACATCTGACCCCACAAGAAGCCATTTCCAAGCCAGCATCTGGAAGC CCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCTGAAGTGAACCT GGATAGATACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTGTCTGGCTGCTGTCTGC TGAGGATACACTGCAGGCTCAGGGTGAAATCAGCAATGATGTGGAAGTGGT CAAGGACCAGTTTCACACCCATGAGGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCA CCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCAC AGGCAAGCTGTCTGAGGATGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACC TGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAG AGCAACCTGCACAGAGTGTCTCATGGACCTGCAGAATCAGAACTGAAAGA ACTGAATGACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAG AGGAACCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAG CATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAGCAAGAGCAAGTCAGAGTGAACAG CCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATGAGTCCTCTGGGGATCATGCCAC AGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAAGGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACAA TCTGTAGGTGGACAGAGGATAGATGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGCTGA AGTGGCAGAGACTGACAGAGGAACAGTGCCTGTTTTCTGCCTGGCTCTCTG AGAAAGAGGATGCTGTCAACAAGATCCATAACCAGGCTTCAAGGATCAGA ATGAGATGCTCAGCTCCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCTGACCTGG AAAAGAAAAGCAGTCCATGGGCAAGCTCTACAGCCTGAAGCAGGACCTG CTGTCTACCCTGAAGAACAAGTCTGTGACCCAGAAAAGTGGCCTGGCTG GACAACTTTGCTAGATGCTGGGACAACCTGGTGCAGAAGCTGGAAAAGTCT ACAGCCCAGATCAGCCAGCAACCTGATCTTGCCCTGGCCTGACCACAATT GGAGCCTCTCCAACACAGACTGTGACCCTGGTTACCCAGCCAGTGGTCACC AAAGAGACAGCCATCAGCAAAGTGGAAATGCCAGCTCTCTGATGCTGGAA GTCCCCACACTGGAAAGGCTGCAAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTG GACCTGAAGCTGAGACAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTT

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>GGGGACCTGCTCATTGATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAAGCC CTGAGGGGAGAGATTGCCCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGAC CTGGCCAGACAGCTGACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTG AGCACCCCTTGAGGACCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTG GAAGATAGAGTCAGGCAGCTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCC AGCCAGCACTTTCTGTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCT CTCCTAACAAGGTGCCCTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTT GGGATCACCCCAAGATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACA ATGTCAGATTCAGTGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGA AAGCTCTGTGCCTGGACCTGCTTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGA CCAGCACAATCTGAAGCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCAT CAACTGCCTCACCACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAACAATCT GGTCAATGTGCCCTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTG TATGACACAGGCAGAACAGGCAGGATCAGAGTCCTGTCTTCAAGACAGGC ATCATCTCCCTGTGCAAAGCCCACTTGGAGGACAAGTACAGATACCTGTTC AAGCAAGTGGCCTCCAGCACAGGCTTTTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCTG CTCCTGCATGACAGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTGGCTTCC TTTGGAGGCGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCC ATCATTGGCTTCAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATGATATCTGCC AGAGCTGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACC CCATGGTGAATACTGCACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGTTAGAGACT TTGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTTCAGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGC ACCCAGAAATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACAGTGCTTGAGGGTGACAACA TGGAACCCCTGTGACACTGATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTGCCCTGC CTCAAGTCCACAGCTGTCCCATGATGACACCCACAGCAGAATTGAGCACTA TGCCTCCAGACTGGCAGAGATGGAAAACAGCAATGGCAGCTACCTGAATGA TAGCATCAGCCCAATGAGAGCATTGATGATGAGCATCTGCTGATCCAGCA CTACTGTGAGTCCCTGAACCAGGACTCTCCACTGAGCCAGCCTAGAAGCCCT GCTCAGATCCTGATCAGCCTTGAGTCTGAGGAAAGGGGAGAGCTGGAAAGA ATCCTGGCAGATCTTGAGGAAGAGAACAGAAACCTGCAGGCAGAGTATGA CAGGCTCAAACAGCAGCATGAGCACAAGGGACTGAGCCCTCTGCCTTCTCC TCCTGAAATGATGCCACCTCTCCACAGTCTCCAAGGTGATGA</p> <p><u>Стоп-кодоны подчеркнуты</u></p>
RGX-DYS7 (кодирующая последовательность 4041	102	<p>ATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCAG AAGAAAACCTTACCAAATGGGTCAATGCCAGTTCAGCAAGTTTGGCAAG CAGCACATTGAGAACCTGTTTCAGTGACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTGCTG GATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGGCAG</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
п.о.)		<p> CACAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCTGCA GAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGCAGCACAGACATTGTGGATGG CAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTGGCA AGTGAAGAATGTGATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACCAACTC TGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGAGACAGAGCACCAGAAACTACCCTCA AGTGAATGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGTGATGGACTGGCCCTGAAT GCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTACTGGAACCTCTGTTGTGT GCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCTTCAACATTGCCAGAT ACCAGCTGGGAATTGAGAAACTGCTGGACCCTGAGGATGTGGACACCACCT ATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCT GCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAGGTTGAGATGCTGCCAG ACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACAACCTTCCAGCTGCACCACCAGATGCA CTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGCCCAGGGATATGAGAGAACAAG CAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCCTATGT GACCACATCTGACCCCAAGAAGCCATTTCCAAGCCAGCATCTGGAAGC CCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCTGAAGTGAACCT GGATAGATACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTGTCTGGCTGCTGTCTGC TGAGGATACTGCAGGCTCAGGGTGAAATCAGCAATGATGTGGAAGTGGT CAAGGACCAGTTTCACACCCATGAGGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCA CCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCAC AGGCAAGCTGTCTGAGGATGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACC TGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAG AGCAACCTGCACAGAGTGCTCATGGACCTGCAGAATCAGAACTGAAAGA ACTGAATGACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAG AGGAACCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAG CATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAAGCAAGAGCAAGTCAGAGTGAACAG CCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATGAGTCCTCTGGGGATCATGCCAC AGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAAGGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACA TCTGTAGGTGGACAGAGGATAGATGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGGAGA TCAGCTATGTGCCCAGCACCTACCTGACAGAGATCACCCATGTGTCTCAGGC CCTGCTGGAAGTGGAACAGCTGCTGAATGCCCTGACCTGTGTGCCAAGGA CTTTGAGGACCTGTTCAAGCAAGAGGAAAGCCTGAAGAACATCAAGGACA GCCTGCAGCAGTCCTCTGGCAGAATTGACATCATCCACAGCAAGAAAACAG CTGCCCTGCAGTCTGCCACACCTGTGGAAAGAGTGAAGCTGCAAGAGGCC TGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGTGAACAAGATGTACAAGGAC AGGCAGGGCAGATTTGATAGAAGTGTGGAAAAGTGGAGAAGGTTCCACTAT GACATCAAGATCTTCAACCAGTGGCTGACAGAGGCTGAGCAGTTCCTGAGA AAGACACAGATCCCTGAGAACTGGGAGCATGCCAAGTACAAGTGGTATCTG </p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		AAAGAACTGCAGGATGGCATTGGCCAGAGACAGACAGTTGTCAGAACCCTG AATGCCACAGGGGAAGAGATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACAGATGCCAG CATCCTGCAAGAGAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGAGATGGCAAGAAGTGTG CAAGCAGCTGTCTGACAGAAAGAAGAGGCTGGAAGAACAGACACTGGAAA GGCTGCAAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAGCTGAGA CAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGGGACCTGCTCATT GATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAAGCCCTGAGGGGAGAGAT TGCCCCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGACCTGGCCAGACAGCT GACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTGAGCACCCCTGAGGA CCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTGGAAGATAGAGTCAG GCAGCTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCT GTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCTAACAAGGT GCCCTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTTGGGATCACCCCAA GATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACAATGTCAGATTCAG TGCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGAAAGCTCTGTGCCT GGACCTGCTTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGACCAGCACAATCTG AAGCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTCACC ACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAACAATCTGGTCAATGTGCCC CTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTATGACACAGGC AGAACAGGCAGGATCAGAGTCCTGTCCCTCAAGACAGGCATCATCTCCCTG TGCAAAGCCCCTTGGAGGACAAGTACAGATACCTGTTCAAGCAAGTGGCC TCCAGCACAGGCTTTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCTGCTCCTGCATGAC AGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTGGCTTCCTTTGGAGGCAGC AATATTGAGCCATCAGTCAGGTCTGTTTTAGTTTTGCCAACACAAGCCTG AGATTGAGGCTGCCCTGTTCTGGACTGGATGAGACTTGAGCCTCAGAGCA TGGTCTGGCTGCCTGTGCTTCATAGAGTGGCTGCTGCTGAGACTGCCAAGCA CCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCATTGGCTTCAGATA CAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGT GGCAGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGGAAATACTGC ACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGGTGCTGAAA AACAAGTTCAGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCCAAGATGGGCTAC CTGCCTGTCCAGACAGTGCTTGAGGGTGACAACATGGAAACCCCTGTGACA CTGATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTGCCCCTGCCTCAAGTCCACAGCTGT CCCATGATGACACCCACAGCAGAATTGAGCACTATGCCTCCAGACTGGCAG AGATGGAAAACAGCAATGGCAGCTACCTGAATGATAGCATCAGCCCCAATG AGAGCATTGATGATGAGCATCTGCTGATCCAGCACTACTGTCAGTCCCTGA ACCAGGACTCTCCACTGAGCCAGCCTAGAAGCCCTGCTCAGATCCTGATCA GCCTTGAGTCTTGATGA

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<u>Стоп-кодоны подчеркнуты</u>
RGX-DYS8 (кодирующая последовательность 3765 п.о.)	103	ATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCAG AAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCAATGCCCAGTTCAGCAAGTTTGGCAAG CAGCACATTGAGAACCTGTTCAAGTACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTGCTG GATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGGCAG CACAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCTGCA GAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGCAGCACAGACATTGTGGATGG CAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTGGCA AGTGAAGAATGTGATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACCAACTC TGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTCAGACAGAGCACCAGAACTACCCTCA AGTGAATGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGTGATGGACTGGCCCTGAAT GCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTACTGGAACCTCTGTTGTGT GCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCTTCAACATTGCCAGAT ACCAGCTGGGAATTGAGAACTGCTGGACCCTGAGGATGTGGACACCACCT ATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCT GCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAGGTTGAGATGCTGCCAG ACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACAATTCCAGCTGCACCACCAGATGCA CTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGCCCAGGGATATGAGAGAACAAG CAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCCTATGT GACCACATCTGACCCCAAGAAGCCATTTCAGCCAGCATCTGGAAGC CCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCTGAAGTGAACCT GGATAGATAACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTGTCCTGGCTGCTGTCTGC TGAGGATACTGCAGGCTCAGGGTGAAATCAGCAATGATGTGGAAGTGGT CAAGGACCAGTTTCACACCCATGAGGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCA CCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCAC AGGCAAGCTGTCTGAGGATGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACC TGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAGAGCAG AGCAACCTGCACAGAGTGCTCATGGACCTGCAGAATCAGAACTGAAAGA ACTGAATGACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAG AGGAACCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAG CATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAGCAAGAGCAAGTCAGAGTGAACAG CCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATGAGTCCTCTGGGGATCATGCCAC AGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAAGGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACA TCTGTAGGTGGACAGAGGATAGATGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGGAGA TCAGCTATGTGCCCAGCACCTACCTGACAGAGATCACCCATGTGTCTCAGGC CCTGCTGGAAGTGGAACAGCTGCTGAATGCCCTGACCTGTGTGCCAAGGA CTTTGAGGACCTGTTCAAGCAAGAGGAAAGCCTGAAGAACATCAAGGACA

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		GCCTGCAGCAGTCTCTGGCAGAATTGACATCATCCACAGCAAGAAAACAG CTGCCCTGCAGTCTGCCACACCTGTGGAAAGAGTGAAGCTGCAAGAGGCC TGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGTGAACAAGATGTACAAGGAC AGGCAGGGCAGATTTGATAGAAGTGTGGAAAAGTGGAGAAGGTTCCACTAT GACATCAAGATCTTCAACCAGTGGCTGACAGAGGCTGAGCAGTTCTGAGA AAGACACAGATCCCTGAGAACTGGGAGCATGCCAAGTACAAGTGGTATCTG AAAGAACTGCAGGATGGCATTGGCCAGAGACAGACAGTTGTCAGAACCCTG AATGCCACAGGGGAAGAGATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACAGATGCCAG CATCCTGCAAGAGAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGAGATGGCAAGAAGTGTG CAAGCAGCTGTCTGACAGAAAGAAGAGGCTGGAAGAACAGACACTGGAAA GGCTGCAAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAGCTGAGA CAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGGGACCTGCTCATT GATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAGCCCTGAGGGGAGAGAT TGCCCCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGACCTGGCCAGACAGCT GACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTGAGCACCTTGAGGA CCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTGGAAAGATAGAGTCAG GCAGCTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCT GTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCTAACAAGGT GCCCTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTTGGGATCACCCCAA GATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACAATGTCAGATTCAG TGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGAAAGCTCTGTGCCT GGACCTGCTTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGACCAGCACAACTG AAGCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTCACC ACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAACAATCTGGTCAATGTGCCC CTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTATGACACAGGC AGAACAGGCAGGATCAGAGTCCTGTCCCTCAAGACAGGCATCATCTCCCTG TGCAAAGCCCACTTGGAGGACAAGTACAGATACCTGTTCAAGCAAGTGGCC TCCAGCACAGGCTTTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCTGCTCCTGCATGAC AGCATTGAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTGGCTTCTTTGGAGGCAGC AATATTGAGCCATCAGTCAGGTCTGTTTTAGTTTTGCCAACAACAAGCCTG AGATTGAGGCTGCCCTGTTCTGGACTGGATGAGACTTGGCCTCAGAGCA TGGTCTGGCTGCCTGTGCTTCATAGAGTGGCTGCTGCTGAGACTGCCAAGCA CCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCATTGGCTTCAGATA CAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGT GGCAGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGGAAATACTGC ACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGGTGCTGAAA AACAAGTTCAGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCCAAGATGGGCTAC CTGCCTGTCCAGACAGTGCTTGGAGGTGACAACATGGAAACCTGATGA

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		Стоп-кодоны подчеркнуты

5.2.2.1 Оптимизация кодонов и истощение CPG

[0099] В одном аспекте нуклеотидная последовательность, кодирующая кассету микродистрофина, модифицирована с помощью оптимизации кодонов и истощения динуклеотидов CPG и CPG-островков. Иммунный ответ на трансген микродистрофина является проблемой для клинического применения у человека, о чем свидетельствуют первые клинические исследования генной терапии мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) и нескольких видов генной терапии на основе аденоассоциированного вируса (AAV)-мини-дистрофина в собачьих моделях [Mendell, J.R., et al., Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 2010. 363(15): p. 1429-37; и Kornegay, J.N., et al., Widespread muscle expression of an AAV9 human mini-dystrophin vector after intravenous injection in neonatal dystrophin-deficient dogs. *Mol Ther*, 2010. 18(8): p. 1501-8].

[00100] Направленные на AAV иммунные ответы могут быть подавлены путем уменьшения количества динуклеотидов CpG в геноме AAV [Faust, S.M., et al., CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J Clin Invest*, 2013. 123(7): p. 2994-3001]. Истощение трансгенной последовательности мотивов CpG может уменьшить роль TLR9 в активации врожденного иммунитета при распознавании трансгена как чужеродного и, таким образом, обеспечить стабильную и пролонгированную экспрессию трансгена. [См. также Wang, D., P.W.L. Tai, and G. Gao, Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2019. 18(5): p. 358-378.; and Rabinowitz, J., Y.K. Chan, and R.J. Samulski, Adeno-associated Virus (AAV) versus Immune Response. *Viruses*, 2019. 11(2)]. В вариантах осуществления кассета микродистрофина оптимизирована по человеческим кодонам с истощенными CpG. Кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности с истощенными CpG могут быть сконструированы любым методом, известным в данной области техники, в том числе, например, при помощи инструментов для синтеза генов Geneart от Thermo Fisher Scientific с использованием GeneOptimizer (Уолтем, штат Массачусетс, США)). Нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 20, 21, 57-72, 80, 81 и 101-103, описанные в данном документе, представляют собой кодон-оптимизированные последовательности с истощенными CpG.

[00101] Приведены трансгены микродистрофина, которые имеют уменьшенное количество последовательностей динуклеотидов CpG и, как следствие, имеют уменьшенное количество CpG-островков. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность микродистрофина имеет менее двух (2) CpG-островков или один (1) CpG-островок или ноль (0) CpG-островков. В вариантах осуществления приведены трансгены микродистрофина, имеющие менее 2 CpG-островков, или 1 CpG-островок, или 0 CpG-островков, которые имеют сниженную иммуногенность, измеренную по титру антитела к лекарственному средству по сравнению с трансгеном микродистрофина, имеющим более 2 CpG-островков. В определенных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность микродистрофина, состоящая в основном из SEQ ID NO: 20, 21, 81, 101, 102 или 103, имеет ноль (0) CpG-островков. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность трансгена микродистрофина, состоящая в основном из гена микродистрофина, функционально связанного с промотором, причем микродистрофин, состоящий из SEQ ID № 20, 21, 81, 101, 102 или 103, имеет меньше двух (2) CpG-островков. В других вариантах осуществления

нуклеотидная последовательность трансгена микродистрофина, состоящая в основном из гена микродистрофина, функционально связанного с промотором, причем микродистрофин, состоящий из SEQ ID NO: 20, 21, 81, 101, 102 или 103, имеет один (1) CpG-островок.

5.3. Генные кассеты и регуляторные элементы

[00102] Другой аспект настоящего изобретения связан с кассетой экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей регуляторные элементы, предназначенные для обеспечения или усиления экспрессии микродистрофинов. Изобретение также включает сконструированные регуляторные элементы, включая промоторные элементы, а также, дополнительные энхансерные элементы и/или интроны, для усиления или облегчения экспрессии трансгена. В некоторых вариантах осуществления вектор gAAV также включает такие регуляторные элементы контроля, известные специалисту в данной области техники, для влияния на экспрессию РНК и/или белковых продуктов, кодируемых нуклеиновыми кислотами (трансгенами) в клетках-мишенях субъекта. Регуляторные элементы контроля и могут быть специфичными для ткани, то есть активны (или существенно более активны или значительно более активны) только в клетках/ткани-мишени.

5.3.1 Промоторы

5.3.1.1 Тканеспецифические промоторы

[00103] В специфических вариантах осуществления кассета экспрессии вектора AAV содержит регуляторную последовательность, такую как промотор, функционально связанный с трансгеном, который допускает экспрессию в тканях-мишенях. Промотор может быть конститутивным промотором, например промотором CB7. Дополнительные промоторы включают: промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор MMT, промотор EF-1 альфа (SEQ ID NO: 118), промотор UB6, промотор куриного бета-актина, промотор CAG (SEQ ID NO: 116), промотор RPE65, промотор опсина, промотор TBG (тироксинсвязывающего глобулина), промотор APOA2, промотор SERPINA1 (hAAT) или промотор MIR122. В некоторых вариантах осуществления, особенно когда может быть желательно отключить экспрессию трансгена, используют индуцируемый промотор, например, индуцируемый гипоксией или индуцируемый рапамицином промотор.

[00104] В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой специфический для мышц промотор. Фраза «специфический для мышц», «селективный для мышц» или «направленный на мышцы» относится к элементам нуклеиновой кислоты, которые изменили свою активность в мышечных клетках или тканях благодаря взаимодействию таких элементов с внутриклеточной средой мышечных клеток. Такие мышечные клетки могут включать миоциты, мышечные трубки, кардиомиоциты и т.п. Включены специализированные формы миоцитов с различными свойствами, такие как сердечные, скелетные и гладкомышечные клетки. Специфическая для мышц экспрессия трансгена может быть полезна для различных терапевтических средств. В частности, генная терапия, которая обеспечивает лечение различных форм мышечной дистрофии, доставляется и обеспечивает высокую эффективность трансдукции в мышечных клетках, имеет дополнительное преимущество, заключающееся в направлении экспрессии трансгена в клетки, где трансген наиболее необходим. Экспрессия трансгена в мышцах также будет полезной для сердечной ткани. Специфические для мышц промоторы могут быть функционально связаны с трансгенами по изобретению. В некоторых вариантах осуществления специфический для мышц промотор выбран из промотора Spc5-12, промотора мышечной креатинкиназы, промотора легкой цепи миозина (MLC), промотора тяжелой цепи миозина (MHC), промотора десмина (SEQ ID NO: 119), промотора MHC7 (SEQ ID NO: 120),

промотора СК6, промотора СК8 (SEQ ID NO: 115), промотора МСК (или его укороченной формы) (SEQ ID NO: 121), промотора альфа-актина, промотора бета-актина, промотора гамма-актина, промотора E-суп, промотора кардиального тропонина С, промотора тропонина I, промотора семейства генов myoD или селективного для мышц промотора, находящегося в интроне 1 глазной формы Pitx3.

[00105] Синтетический промотор с5-12 (Li, X. et al. Nature Biotechnology Vol. 17, pp. 241-245, MARCH 1999), известный как промотор SPc5-12, как было показано, имеет экспрессию, ограниченную типом клеток, в частности, экспрессию, специфическую для мышечных клеток. Имея длину менее 350 п.о., промотор SPc5-12 меньше по длине, чем большинство эндогенных промоторов, что может быть преимуществом, когда длина нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок, относительно велика. В вариантах осуществления предложены кассеты для генной терапии с промотором SPc5-12 (SEQ ID NO: 39).

[00106] Для дальнейшего уменьшения длины вектора регуляторные элементы могут представлять собой уменьшенную или укороченную версию (упоминаемую в данном документе как «минимальный промотор») любого из промоторов, описанных в данном документе. Минимальный промотор содержит по меньшей мере транскрипционно активный домен полноразмерной версии и, следовательно, все еще способен управлять экспрессией. Например, в некоторых вариантах осуществления вектор AAV может содержать транскрипционно активный домен специфического для мышц промотора, например, минимальный промотор SPc5-12 (например, SEQ ID NO: 40), функционально связанный с трансгеном терапевтического белка. В вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой микродистрофин, как описано в данном документе. Минимальный промотор по настоящему изобретению может содержать или не содержать часть последовательности промотора, которая способствует регуляции экспрессии тканеспецифическим образом.

[00107] Соответственно, в вариантах осуществления предложены кассеты для генной терапии с промотором SPc5-12 (SEQ ID NO: 39). В вариантах осуществления предложены кассеты для генной терапии с минимальными промоторами, которые направляют экспрессию микродистрофина в мышечных клетках. Одним из таких промоторов является минимальный промотор SPc5-12 SEQ ID NO: 40. Последовательности этих промоторов представлены в таблице 6.

Таблица 6: Промоторные последовательности

Промотор	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
SPc5-12	39	GGCCGTCCGCCCTCGGCACCATCCTCACGACACCCAAATA TGGCGACGGGTGAGGAATGGTGGGGAGTTATTTTTAGAGC GGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGTGTTGGCGCTCTA AAAATAACTCCCGGGAGTTATTTTTAGAGCGGAGGAATGG TGGACACCCAAATATGGCGACGGTTCCTCACCCGTCGCCA TATTTGGGTGTCCGCCCTCGGCCGGGGCCGCATTCCTGGG GGCCGGGCGGTGCTCCCGCCCGCCTCGATAAAAGGCTCCG GGGCCGGCGGCGGCCACGAGCTACCCGGAGGAGCGGGA GGCGCCAAGC
minSPc5-12	40	GAATGGTGGACACCCAAATATGGCGACGGTTCCTCACCCG TCGCCATATTTGGGTGTCCGCCCTCGGCCGGGGCCGCATTC CTGGGGGCCGGGCGGTGCTCCCGCCCGCCTCGATAAAAGG

Промотор	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CTCCGGGGCCGGCGGCGGCCACGAGCTACCCGGAGGAGCGGGAGGCGCCAAG
СК8	115	<p>ccactacgggttaggctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacaccgagatgctggtt ataaftaaccagacatgtggctgcccccccccccccaacacctgctgcctctaaaaataaccct gtccctgggtgatccactacgggttaggctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacacc cgagatgctggtfataaftaaccagacatgtggctgcccccccccccccaacacctgctgcc tctaaaaataaccctgtccctgggtgatccactacgggttaggctgcccatgtaaggaggcaa ggcctggggacaccgagatgctggtfataaftaaccagacatgtggctgcccccccccccc ccaacacctgctgcctctaaaaataaccctgtccctgggtgatccctgcatgcgaagatcttga acaaggctgtggggactgagggcaggctgtaacaggctggggggcagggttatactgtgcc tgggactcccaaagtattactgttccatgttcccggcgaaggccagctgtccccgccagctag actcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagccctggggcagccatacaaggccat ggggctgggcaagctgcacgcctgggtccgggtgggcacggctgcccgggcaacgagctga aagctcatctgctcaggggccctcctggggacagccctcctggctagtcacaccctgtag gctcctctataaaccaggggcacagggtgccctcattctaccaccctccacagcacaga cagacactcaggagccagccagcgtcga</p>
CAG	116	<p>gacattgattattgactagttaataagtaatcaattacggggcattagttcatagcccataatgga gttccgcgttacataacttacgtaaatggcccgctgctgaccgccaacgacccccgccc tgactcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaataggactttccattgacgtcaatgggt ggagtatttacggtaaacgcccactggcagtacatcaagtgatcatatgcaagtacgcccc tattgacgtcaatgacgtaaatggcccgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactt cctacttggcagtacatctacgtattatgcatcgtattaccatggcaggtgagccccacgtct gttctactctccccatcccccccccccccccccaattttgatttttttttaattttttgtgc agcgatggggcggggggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcga ggggcggggcggggcggagggcggaggggtgcccggcagccaatcagagcggcgcgtcc gaaagtctctttatggcgaaggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcggc gggggggagtcgctgcccgtgcttcgccccgtccccgctccgccgctcgcggcgc ccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggccctctcct cgggctgtaaltagcgttggttaatgacggcttgttctttctgtggctgctgaaagcctgag gggctccggaggggcccttgtgccccggggagcggcgggggggtgctgctgtgtgtgtg cgtggggagcggcgtgcccgtccgctgcccggcggctgtgagcgtgcccggcggc gcccgggcttgtgctccgagtgctgcgagggggagcggcggcggggcgggtgccccgc ggtgccccggggcgtgaggggaacaaggctgctgctgcccgggtgtgctggtgggggt gagcaggggggtgtggcgcgtcggcggcgtgcaacccccctgacccccctccccgatt gctgagcacggccggcttgggtgccccgctccgtacggggcgtggcggggcgtcggc tgccgggcgggggtggcggcaggtgggggtcccgggcggggcggggcggcctcggggc ggggagggcctgggggagggcggcggcggccccggagcggcggcggctgtcagggcgc ggcagcccgagccattgcctttatgtaatcgtgcgagggggcagggacttctttgcc</p>

Промотор	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>aaatctgtgcggagccgaaatctgggagggcggccggcaccacctctagcgggcgaggggc gaagcgggtgcggcggcggcaggaaggaaatggcggggaggccttcgtgctcggccg ccgccgtccccttccctctccagcctcggggctgtccgcggggggacggctgcctcgggg gggacggggcagggcggggctggcttctggcgtgtgaccggcggctctagacctctgctaa ccatgttcatgccttcttctttctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtcctgtctcatt ttggcaag</p>
mU1a	117	<p>atggagggcggactatgtagatgagaattcaggagcaaacgggaaaagcaactgcttccaat atgtgtatgtttacagtgtatgtttgaaaaactcttagcctaccaattcttaagtgtttaaatgtg ggagccagtacatgaagttatagagtgtttaatgaggcttaaatattaccgtaactatgaaatg ctacgatatcatgctgttcaggctccgtggccacgcaactcatact</p>
EF-1 α	118	<p>gggcagagcgcacatcggccacagtcccgagaagttggggggaggggcggcaattgaac gggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgtgctgtactggctccgctt ttcccagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaac gggttggccgagaacacag</p>
Человеческий десмин	119	<p>ctgcagacatgctgtcctgcctggcgtgcctggcaggcttccctcacaggacccccgctg gctgactcaggggcgaggtcttgcgggggagctggcctcccggccacggccacgggcccctt cctggcagacagcgggacttgcagctgtcagggaggggatgacgggggactgatgtcaggag ggatacaaatagtgccgaacaaggaccggattagatctacc</p>
MHCK7	120	<p>aagcttgcattgtctaagcctgaccctcagattaaaaataactgaggtgaggcctgggt aggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctctatctgcccacggccctttgggga ggaggaatgtgcccaggacataaaaaaggccatggagccagaggggcga gggcaacaga cctttcatgggcaaaccttggggcctgctgtagcatgcccactacg ggtctaggctgcccattgaaaggagcaaggcctgggggacacccagatgcctggtataa ttaaccaga catgtggctgccccccccccaacacctgtgcctcta aaaataacc tgtccctggtgatccccctgcatgcaaga tcttgaacaaggctgtgggggactgaggg caggctgtaa caggcttggggccagggtctatagctgccgggactccc aaagtattac tgttccatgttcccggcgaaggccagctgtcccccgca gctagactca gcaactagtt taggaaccagtgagcaagtcagccctggggcagcccata caaggccatgaggctgggca agctgcacgcctgggtccgggtgggacaggtgcccgggc aacgagctga aagctcatct gctctcaggggcccctcctggggacagccctcctggt agtcacaccgttaggctcc tctatataac ccaggggcagaggggctgccctacttac caccacctccacagcacaga cagacactca ggagcagcca gc</p>
Усеченный MCK	121	<p>ccactacgggcttaggtgc ccatgtaaggaggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct ggttataatt aacccaaca cctgtgccc cccccccc aacacctgct gctgagcct gagcgggttac cccaccccgg tgcctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct cgtctaaaa ataacctgt cctgggtgga tccactacgg gtctatgctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccaac acctgctgcc cccccccc caaacctgc tgcctgagcc tgagcgggta cccccccc gtgcctgggt</p>

Промотор	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa aataaccctg tcctgggtgg accactacgg gtctaggctg cccatgtaag gaggcaagc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccaac acctgctgcc cccccccc aacacctgct gcctgagcct gagcggttac cccaccccgg tgcctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct cgctctaaaa ataacctgt cctggtcct cctggggac agcccctct ggctagtac accctgtagg ctctctata taaccaggg gcacaggggc tccccggg tcac

[00108] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфический для ЦНС. Например, кассета экспрессии может содержать промотор, выбранный из промотора, выделенного из генов нейронспецифической энolahзы (NSE), любого нейронального промотора, например, промотора рецептора дофамина-1 или рецептора дофамина-2, промотора синапсина, промотора СВ7 (промотора куриного β-актина и энхансера CMV), промотора RSV, промотора GFAP (глиального фибриллярного кислого белка), промотора MBP (основного миелинового белка), промотора MMT, промотора EF-1α, промотора U86, промотора RPE65 или промотора опсина, индуцируемого промотора, например, индуцируемого гипоксией промотора, и индуцируемого лекарственным средством промотора, например, промотора, индуцируемого рапамицином и родственными агентами.

[00109] В других вариантах осуществления кассеты экспрессии могут содержать несколько промоторов, которые могут быть помещены в тандеме в кассету экспрессии, содержащую трансген микродистрофина. Как таковые, тандемные или гибридные промоторы можно использовать для усиления экспрессии и/или прямой экспрессии в нескольких типах тканей (см., например, международную публикацию РСТ № WO2019154939A1, опубликованную 15 августа 2019 г., включенную в данный документ посредством ссылки) и, в частности, LMTP6, LMTP13, LMTP14, LMTP15, LMTP18, LMTP19 или LMTP20, как описано в международной заявке РСТ № РСТ/US2020/043578, поданной 24 июля 2020 г., включенной в данный документ посредством ссылки).

5.3.2 Интроны

[00110] Другой аспект настоящего изобретения относится к вектору AAV, содержащему интрон в регуляторной кассете. В примере 2 показано, что интрон VH4 5' кодирующей микродистрофин последовательности усиливает правильный сплайсинг и, таким образом, экспрессию микродистрофина. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления интрон соединен с 5'-концом последовательности, кодирующей белок микродистрофина, например, ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR, ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT. В частности, интрон может быть связан с активсвязывающим доменом. В других вариантах осуществления длина интрона составляет менее 100 нуклеотидов.

[00111] В вариантах осуществления интрон представляет собой интрон VH4. Нуклеиновая кислота интрона VH4 может содержать SEQ ID NO: 41, как показано в Таблице 7 ниже.

Таблица 7: Нуклеотидные последовательности для разных интронов

Структура	SEQ ID	Последовательность
Интрон VH4	41	GTGAGTATCTCAGGGATCCAGACATGGGGATATGGGAGGTGCCTCTG

		ATC CCAGGGCTCACTGTGGGTCTCTCTGTTCACAG
Химерный интрон	75	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACT GGGCTTGTTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTAT TGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG
Интрон SV40	76	GTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTG GTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTACTTCTAG

[00112] В других вариантах осуществления интрон представляет собой химерный интрон, полученный из человеческого β -глобина и тяжелой цепи Ig (также известный как интрон донора сплайсинга β -глобина/акцептора сплайсинга тяжелой цепи иммуноглобулина или химерный интрон β -глобина/IgG) (таблица 7, SEQ ID NO: 75). Могут быть использованы другие интроны, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как интрон β -актина цыпленка, интрон минутного вируса мышей (MVM), интрон фактора IX человека (например, укороченный интрон 1 FIX), донор сплайсинга β -глобина/иммуноглобулин. интрон акцептора сплайсинга тяжелой цепи, интрон донора сплайсинга аденовируса/интрон акцептора сплайсинга иммуноглобулина, интрон сплайсинга/акцептора сплайсинга позднего гена SV40 (19S/16S) (таблица 7, SEQ ID NO: 76).

5.3.3 Другие регуляторные элементы

5.3.3.1 поли(A)

[00113] Другой аспект настоящего изобретения относится к кассетам экспрессии, содержащим сайт полиаденилирования (поли(A)) ниже кодирующей области трансгена микродистрофина. Любой поли(A)-сайт, который сигнализирует об окончании транскрипции и направляет синтез поли(A)-хвоста, подходит для использования в векторах AAV по настоящему изобретению. Примеры поли(A)-сигналов получены из следующих, но не ограничиваются ими: позднего гена SV40, кроличьего гена β -глобина, гена бычьего гормона роста (BPH), гена человеческого гормона роста (hGH) и синтетического поли(A)-сайта (SPA). В одном варианте осуществления поли(A)-сигнал содержит SEQ ID NO: 42, как показано в таблице 8.

Таблица 8: Нуклеотидная последовательность поли(A)-сигнала

Структура	SEQ ID	Последовательность
поли(A)	42	AGGCСТААТААAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTT TTTTG

5.3.4 Вирусные векторы

[00114] Трансген микродистрофина в соответствии с настоящим изобретением может быть включен в вектор AAV для введения генной терапии субъекту-человеку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные векторы AAV (rAAV) могут содержать капсид вируса AAV и вирусный или искусственный геном, содержащий кассету экспрессии, фланкированную инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV, где кассета экспрессии содержит трансген микродистрофина, функционально связанный с одним или более регуляторными последовательностями, которые контролируют экспрессию трансгена в мышцах человека или клетках ЦНС для экспрессии и доставки микродистрофина. Предложенные способы подходят для применения в производстве любых выделенных рекомбинантных частиц AAV для доставки микродистрофинов, описанных в данном документе, в производстве композиции, содержащей любые

выделенные рекомбинантные частицы AAV, кодирующие микродистрофин, или в способе лечения заболевания или нарушения, поддающегося лечению микродистрофином субъекта, нуждающегося в этом, включающем введение любых выделенных рекомбинантных частиц AAV, кодирующих микродистрофин, описанный в данном документе. Как таковой, rAAV может относиться к любому серотипу, варианту, модификации, гибриду или производному, известному в данной области техники, или к любой их комбинации (совместно именуемой «серотип»). В конкретных вариантах осуществления серотип AAV обладает тропизмом к мышечной ткани. В других вариантах осуществления серотип AAV обладает тропизмом к ЦНС. В других вариантах осуществления серотип AAV обладает тропизмом как к мышечной ткани, так и к ЦНС. И в других вариантах осуществления серотип AAV обладает тропизмом к печени, и в этом случае клетки печени, трансдуцированные AAV, образуют депо секретирующих микродистрофин клеток, секретирующих микродистрофин в кровотоке.

[00115] В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV содержат белок капсида серотипа AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16 или его производного, модификации или псевдотипа. В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV содержат белок капсида, который имеет по меньшей мере 80% или более, например 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т.д., т.е. до 100% идентичности, например, с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 серотипа капсида AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 и AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16, или его производного, модификации или псевдотипа.

[00116] Например, популяция частиц rAAV может включать два или более серотипов, например, содержащая два или более из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16, или других частиц rAAV, или комбинаций двух или более из них).

[00117] В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV содержат капсид Anc80 или Anc80L65, как описано в Zinn *et al.*, 2015, Cell Rep. 12(6): 1056-1068, который полностью включен посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV содержат капсид с одной из следующих аминокислотных вставок: LGETTRP или LALGETTRP, как описано в патентах США № 9193956; 9458517; и 9587282 и публикациях заявки на патент США № 2016/0376323, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV содержат капсид

AAV.7m8, как описано в патентах США № 9193956; 9458517; и 9587282 и публикациях заявки на патент США № 2016/0376323, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в патенте США № 9585971, такой как AAVPHR.B. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в патенте США № 9840719 и WO 2015/013313, такой как AAV.Rh74 и RHM4-1, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в WO 2014/172669, такой как AAV rh.74, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид AAV2/5, как описано в Georgiadis *et al.*, 2016, *Gene Therapy* 23: 857-862 и Georgiadis *et al.*, 2018, *Gene Therapy* 25: 450, каждый из которых включен посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в WO 2017/070491, такой как AAV2tYF, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсиды AAVLK03 или AAV3B, как описано в Puzzo *et al.*, 2017, *Sci. Transl. Med.* 29(9): 418, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, раскрытый в патентах США №№ 8628966; US 8927514; US 9923120 и WO 2016/049230, такие как HSC1, HSC2, HSC3, HSC4, HSC5, HSC6, HSC7, HSC8, HSC9, HSC10, HSC11, HSC12, HSC13, HSC14, HSC15 или HSC16, каждый из которых включен посредством ссылки в полном объеме.

[00118] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид AAV, раскрытый в любом из следующих патентов и патентных заявок, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки: патенты США №№ 7282199; 7906111; 8524446; 8999678; 8628966; 8927514; 8734809; US 9284357; 9409953; 9169299; 9193956; 9458517; и 9587282; публикации патентных заявок США №№ 2015/0374803; 2015/0126588; 2017/0067908; 2013/0224836; 2016/0215024; 2017/0051257; и международные патентные заявки № PCT/US2015/034799; PCT/EP2015/053335. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют капсидный белок, который имеет по меньшей мере 80% или более идентичности, например, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т. д., т.е. до 100% идентичности с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 капсида AAV, описанной в любом из следующих патентов и патентных заявок, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки: патенты США № 7282199; 7906111; 8524446; 8999678; 8628966; 8927514; 8734809; US 9284357; 9409953; 9169299; 9193956; 9458517; и 9587282; публикации патентных заявок США №. 2015/0374803; 2015/0126588; 2017/0067908; 2013/0224836; 2016/0215024; 2017/0051257; и международные патентные заявки №№ PCT/US2015/034799; PCT/EP2015/053335.

[00119] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, описанный в Межд. публ. заявки № WO 2003/052051 (см., например, SEQ ID NO: 2 из публикации '051), WO 2005/033321 (см., например, SEQ ID NO: 123 и 88 из публикации '321), WO 03/042397 (см., например, SEQ ID NO: 2, 81, 85, и 97 из публикации '397), WO 2006/068888 (см., например, SEQ ID NO: 1 и 3-6 из публикации '888), WO 2006/110689, (см., например, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '689) WO2009/104964 (см., например, SEQ ID NO: 1-5, 7, 9, 20, 22, 24 и 31 из публикации '964), WO 2010/127097 (см., например, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '097), и WO 2015/191508 (см. например, SEQ ID NO: 80-294 из публикации '508), и публ. заявки США № 20150023924 (см., например, SEQ ID NO: 1, 5-10 из публикации '924), содержание каждого из

которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют капсидный белок, который имеет по меньшей мере 80% или более, например, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т.д., т.е. до 100% идентичности с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 капсида AAV, описанного в межд. публ. заявки № WO 2003/052051 (см., например, SEQ ID NO: 2 из публикации '051), WO 2005/033321 (см. например, SEQ ID NO: 123 и 88 из публикации '321), WO 03/042397 (см., например, SEQ ID NO: 2, 81, 85, и 97 из публикации '397), WO 2006/068888 (см., например, SEQ ID NO: 1 и 3-6 из публикации '888), WO 2006/110689 (см., например, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '689) WO2009/104964 (см., например, SEQ ID NO: 1-5, 7, 9, 20, 22, 24 и 31 из публикации 964), W0 2010/127097 (см., например, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '097), и WO 2015/191508 (см., например, SEQ ID NO: 80-294 из публикации '508), и публ. заявки США № 20150023924 (см., например, SEQ ID NO: 1, 5-10 публикации '924).

[00120] Последовательности нуклеиновых кислот вирусных векторов на основе AAV и способы получения рекомбинантных AAV и капсидов AAV описаны, например, в патентах США №№ 7282199; 7906111; 8524446; 8999678; 8628966; 8927514; 8734809; US 9284357; 9409953; 9169299; 9193956; 9458517; и 9587282; публикации патентных заявок США №№ 2015/0374803; 2015/0126588; 2017/0067908; 2013/0224836; 2016/0215024; 2017/0051257; международные патентные заявки №№ PCT/US2015/034799; PCT/EP2015/053335; WO 2003/052051, WO 2005/033321, WO 03/042397, WO 2006/068888, WO 2006/110689, WO2009/104964, W0 2010/127097, и WO 2015/191508, и публ. заявки США № 20150023924.

[00121] В дополнительных вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид псевдотипированного AAV. В некоторых вариантах осуществления капсиды псевдотипированного AAV представляют собой капсиды псевдотипированного AAV гAAV2/8 или гAAV2/9. Способы получения и использования псевдотипированных частиц гAAV известны в данной области техники (см., например, Duan *et al.*, J. Virol., 75:7662-7671 (2001); Halbert *et al.*, J. Virol., 74:1524-1532 (2000); Zolotukhin *et al.*, Methods 28:158-167 (2002); and Auricchio *et al.*, Hum. Molec. Genet. 10:3075-3081, (2001).

[00122] В некоторых вариантах осуществления можно использовать одноцепочечный AAV (ssAAV). В определенных вариантах осуществления может использоваться самокомплементарный вектор, например, scAAV (см., например, Wu, 2007, Human Gene Therapy, 18(2):171-82, McCarty et al, 2001, Gene Therapy, Vol 8, Number 16, страницы 1248-1254; и патенты США №№ 6596535; 7125717; и 7456683, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки).

[00123] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок из серотипа капсида AAV, выбранного из AAV8 или AAV9. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок из серотипа капсида AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV7, AAV8, AAV9, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu31, AAV.hu32, AAV.hu37, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, и AAV.7m8. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок с высокой степенью гомологии последовательности к AAV8 или AAV9, такой как AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu31, AAV.hu32, и AAV.hu37. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют капсид AAV серотипа AAV1 или его производное, модификацию или псевдотип. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют капсид AAV серотипа AAV4 или его производное, модификацию или псевдотип. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют капсид AAV серотипа AAV5 или его производное, модификацию или псевдотип. В

некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют капсид AAV серотипа AAV8 или его производное, модификацию или псевдотип. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют капсид AAV серотипа AAV9 или его производное, модификацию или псевдотип.

[00124] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, который является производным, модификацией или псевдотипом капсидного белка AAV8 или AAV9. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, который включает капсидный белок AAV8, который имеет по меньшей мере на 80% или более идентичности, например, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т. д., т.е. до 100% идентичности с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 капсидного белка AAV8. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, который является производным, модификацией или псевдотипом капсидного белка AAV9. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, который включает капсидный белок AAV8, который имеет по меньшей мере на 80% или более идентичности, например, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т. д., т.е. до 100% идентичности с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 капсидного белка AAV9.

[00125] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, который имеет по меньшей мере 80% или более идентичности, например, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т. д., т.е. до 100% идентичности с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 капсидного белка AAV7, AAV8, AAV9, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu31, AAV.hu32, AAV.hu37, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, или AAV.7m8. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, который имеет по меньшей мере 80% или более идентичности, например, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, и т. д., т.е. до 100% идентичности с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 капсидного белка AAV с высокой степенью гомологии последовательности к AAV8 или AAV9, такие как AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu31, AAV.hu32 и AAV.hu37.

[00126] В дополнительных вариантах осуществления частицы гAAV содержат мозаичный капсид. Мозаичные частицы AAV состоят из смеси вирусных капсидных белков разных серотипов AAV. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат мозаичный капсид, содержащий капсидные белки серотипа, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 и AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, и AAV.HSC16.

[00127] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат мозаичный капсид, содержащий капсидные белки серотипа, выбранного из AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAVrh.8 и AAVrh.10.

[00128] В дополнительных вариантах осуществления частицы гAAV включают псевдотипированную частицу гAAV. В некоторых вариантах осуществления псевдотипированная частица гAAV содержит (a) вектор нуклеиновой кислоты, содержащий ITR AAV, и (b) капсид, состоящий из капсидных белков, полученных из AAVx (например, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 AAV11, AAV12, AAV13,

AAV14, AAV15 и AAV16). В дополнительных вариантах осуществления частицы гAAV включают псевдотипированную частицу гAAV, состоящую из капсидного белка серотипа AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 и AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu31, AAV.hu32, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, и AAV.HSC16. В дополнительных вариантах осуществления частицы гAAV включают псевдотипированную частицу гAAV, содержащую капсидный белок AAV8. В дополнительных вариантах осуществления частицы гAAV включают псевдотипированную частицу гAAV, состоящую из капсидного белка AAV9. В некоторых вариантах осуществления псевдотипированные частицы гAAV8 или гAAV9 представляют собой псевдотипированные частицы гAAV2/8 или гAAV2/9. Способы получения и применения псевдотипированных частиц гAAV известны в данной области техники (см., например, Duan et al., *J. Virol.*, 75:7662-7671 (2001); Halbert et al., *J. Virol.*, 74:1524-1532 (2000); Zolotukhin et al., *Methods* 28:158-167 (2002); and Auricchio et al., *Hum. Molec. Genet.* 10:3075-3081, (2001).

[00129] В дополнительных вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид, содержащий химерный капсидный белок двух или более серотипов капсида AAV. В дополнительных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой химеру из 2 или более капсидных белков AAV из серотипов AAV, выбранных из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 и AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, и AAV.HSC16. В дополнительных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой химерный белок из 2 или более капсидных белков AAV из серотипов AAV, выбранных из AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAVrh.8 и AAVrh.10.

[00130] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат химерный капсидный белок AAV из капсидного белка AAV8 и одного или более капсидных белков AAV серотипа AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 и AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, и AAV.HSC16. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат химерный капсидный белок AAV из капсидного белка AAV8 и одного или более капсидных белков AAV серотипа AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, AAV10, AAVrh.8, и AAVrh.10.

[00131] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат химерный капсидный белок AAV из капсидного белка AAV9 и капсидного белка одного или более серотипов капсида AAV, выбранных из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 and AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80,

AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, и AAV.HSC16.

[00132] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат химерный капсидный белок AAV из капсидного белка AAV9 и капсидного белка одного или более серотипов капсида AAV, выбранных из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AA6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8 и AAVrh.10.

[00133] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок AAV клад А, В, Е или F. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок AAV кланды F. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок AAV кланды E.

[00134] В таблице 9 ниже приведены примеры аминокислотных последовательностей капсидных белков AAV8, AAV9, AAV.rh74, AAV.hu31, AAV.hu32 и AAV.hu37 и последовательности нуклеиновых кислот 5'- и 3'-ITR AAV2.

Таблица 9:

Структура	SEQ ID	Последовательность
5'-ITR	73	cgcgcgctcgctcgctcactgaggccgccgggcaagccccggcgctggcgacctttggtcgccccggcctcagt <u>gagcga</u> <u>gcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttctc</u> Сайт связывания белка Rep (rps) подчеркнут.
3'-ITR	74	aggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgctcgctcactgaggccgggacaccaaggtcgccccga cgccccgggctttgccggggcgccctcagt <u>gagcgcgagcgcgcgagcgcgcag</u> Сайт связывания белка Rep (rps) подчеркнут.
Капсид AAV8	77	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLQAGDNPY LRYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEGAKTAP GKRPVPEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFGQTGDS ESVPDPQLG EPPAAPSGVG PNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGAT NDNTYFGYST PWGYDFNRF HCHFSPRDWQ RLINNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFQFTYTFED VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQTTGGTANT QTLGFSQGGP NTMANQAKNW LPGPCYRQQR VSTTTGQNNN SNFAWTAGTK YHLNGRNSLA NPGIAMATHK DDEERFFPSN GILIFGKQNA ARDNADYSDV MLTSEEEIKT TNPVATEEYG IVADNLQQQN TAPQIGTVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGP WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTPVPADP PTTFNQSKLN SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNPE IQYTSNYYKS TSVDFAVNTE GUYSEPRPIG TRYLTRNL
Капсид AAV9	78	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF

Структура	SEQ ID	Последовательность
		<p>QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTDGTE SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR LNNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS LIFGKQGTGR DNVDADKVI TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNG ILPGMVWQDR DVYLQGIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSN VFAVNTEGV YSEPRPIGTR YLTRNL</p>
Капсид hu.37	112	<p>MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPENGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPAKK RLNFGQTGDS ESVPDPQPIG EPPAGPSGLG SGTMAAGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYDFNRF HCHFSPRDWQ RLNNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVMIPQYGY LTLNNGSQAQV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYTFED VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQSTGGTQGT QQLFSQAGP ANMSAQAKNW LPGPCYRQR VSTTLSQNNN SNFAWTGATK YHLNGRDSL NPGVAMATHK DDEERFFPSS GVLMTFGKQGA GRDNVDYSSV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQQTN TGPIVGNVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGI WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTPVPADP PTTFSQAKLA SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNPE IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE GTYSEPRPIG TRYLTRNL</p>
Капсид hu.31	113	<p>MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLPKPPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPENGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGSQPAKKK LNFGQTDGTE SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR LNNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGGQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность
		FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG ILPGMVWQDR DVYLQGPWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSN VEFVSTEGV YSEPRPIGTR YLTRNL
hu.32 Капсид	114	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLPGNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGSQPAKKK LNFGQTGDTE SVPDPGQPIG EPPAAPSGVG SLTMASGGGA PVADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSQWLGDRV ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNSTSGGSS NDNAYFGYST PWGYDFNRF HCHFSPRDWQ RLINNNWGRF PKRLNFKLFN IQVKEVTDNN GVKTIANNLT STVQVFTDSD YQLPYVLGSA HEGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNDGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFQFSYEFEN VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSK TINGSGQNQQ TLKFSVAGPS NMAVQGRNYI PGPSYRQQRV STTVTQNNNS EFAWPGASSW ALNGRNSLMN PGPAMASHKE GEDRFFPLSG SLIFGKQGTG RDNVDADKVM ITNEEEIKTT NPVATESYGQ VATNHQSAQA QAQTGWVQNQ GILPGMVWQD RDVYLQGPW AKIPHTDGNF HPSPLMGGFG MKHPPPQILI KNTPVPADPP TAFNKDKLNS FITQYSTGQV SVEIEWELQK ENSKRWNPEI QYTSNYYKSN NVEFAVNTEG VYSEPRPIGT RYLTRNL
Rh.74 версии 1	127	MAADGYLPD WLEDNLSEG IREWDLKP GAPKPKANQ QKQDNGRGL VLPGYKYLK PFNGLDKGE PVNAADAAA LEHDKAYDQ QLQAGDNPY LRYNHADAE FQERLQEDT SFGGNLGRA VFQAKKRVL EPLGLVESP VKTAPGKKR PVEPSPQRS PDSSTGIGK KGQQPAKKR LNFGQTGDS ESVPDPQPI GEPAGPSG LGSPTMAAG GGAPMADNN EGADGVGSS SGNWHCDST WLGDRVITT STRTWALPT YNNHLYKQI SNGTSGGST NDNTYFGYS TPWGYDFN RFHCHFSPR DWQRLINNN WGFPRKRLN FKLFIQVK EVTQNEGK TIANNLTST IQVFTDSEY QLPYVLGSA HQGCLPPFP ADVFMIPQY GYLTLNNGS QAVGRSSFY CLEYFPSQM LRTGNNFEF SYNFEVVPF HSSYAHSQS LDRLMNPLI DQYLYLSR TQSTGGTAG TQQLLSQA GPNNMSAQA KNWLPGPCY RQQRVSTTL SQNNNSNFA WTGATKYHL NGRDSLVP GVAMATHKD DEERFFPSS GVLMFGKQG AGKDNVDYS SVMLTSEEE IKTTNPVAT EQYGVVADN LQQNAAPI VGAVNSQGA LPGMVWQNR DVYLQGPW AKIPHTDGN FHPSPMGG FGLKHPPPQ ILIKNTPVP ADPPTTFNQ AKLASFITQ YSTGQVSVE IEWELQKEN SKRWNPEIQ YTSNYYKST NVDFAVNTE GTYSEPRPI GTRYLTRNL
Rh.74 версии 2	85	MAADGYLPD WLEDNLSEG IREWDLKP GAPKPKANQ QKQDNGRGL VLPGYKYLK PFNGLDKGE PVNAADAAA LEHDKAYDQ QLQAGDNPY

Структура	SEQ ID	Последовательность
		LRYNHADAE FQERLQEDT SFGGNLGRA VFQAKKRVL EPLGLVESP VKTAPGKKR PVEPSPQRS PDSSTGIGK KGQQPAKKR LNFGQTGDS ESVPDPQPI GEPPAAPSG VGPNTMAAG GGAPMADNN EGADGVGSS SGNWHCDST WLGDRVITT STRTWALPT YNNHLYKQI SNGTSGGST NDNTYFGYS TPWGYDFDN RFHCHFSPR DWQRLINNN WGFPRKRLN FKLFIQVK EVTQNEGK TIANNLTST IQVFTDSEY QLPYVLGSA HQGCLPPFP ADVFMIPQY GYLTLNNGS QAVGRSSFY CLEYFPSQM LRTGNNFEF SYNFEDEVF HSSYAHSQS LDRLMNPLI DQYLYLSR TQSTGGTAG TQQLFSQA GPNNMSAQA KNWLPGPCY RQQRVSTTL SQNNNSNFA WTGATKYHL NGRDSLVP GVAMATHKD DEERFFPSS GVLMFGKQG AGKDNVDYS SVMLTSEEE IKTTNPVAT EQYGVVADN LQQQNAAPI VGAVNSQGA LPGMVWQNR DVYLQGPW AKIPHTDGN FHPSPLMGG FGLKHPPPQ ILIKNTPVP ADPPTTFNQ AKLASFITQ YSTGQVSVE IEWELQKEN SKRWNPEIQ YTSNYYKST NVDFAVNTE GTYSEPRPI GTRYLTRNL

[00135] Представленные способы подходят для применения в производстве рекомбинантных AAV, кодирующих трансген. В определенных вариантах осуществления трансген представляет собой микродистрофин, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления геном гAAV содержит вектор, содержащий следующие компоненты: (1) инвертированные концевые повторы AAV, которые фланкируют кассету экспрессии; (2) регуляторные элементы контроля, такие как а) промотор/энхансеры, б) поли(А)-сигнал и с) необязательно интрон; и (3) последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие описанный трансген. В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) инвертированные концевые повторы (ITR) AAV2 или AAV8, которые фланкируют кассету экспрессии; (2) контрольные элементы, которые включают специфический для мышц промотор SPc5.12 и небольшой поли(А)-сигнал; и (3) трансген, обеспечивающий (например, кодирующий) нуклеиновую кислоту, кодирующую микродистрофин, как описано в данном документе. В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) ITR AAV2 или AAV8, которые фланкируют кассету экспрессии; (2) элементы контроля, которые включают а) специфический для мышц промотор SPc5.12, б) небольшой поли(А)-сигнал; и (3) кассета микродистрофина, включающая от N-конца к С-концу, ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR, ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT. В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) ITR AAV2 или AAV8, которые фланкируют кассету экспрессии; (2) элементы контроля, которые включают а) промотор ЦНС, б) небольшой поли(А)-сигнал; и (3) кассета микродистрофина, включающая от N-конца к С-концу, ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR, ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT. В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) ITR AAV2 или AAV8, которые фланкируют кассету экспрессии; (2) контрольные

элементы, которые включают а) специфический для мышц промотор SPc5.12, b) интрон (например, VH4) и с) небольшой поли(А)-сигнал; и (3) кассету микродистрофина, содержащую N-конца к С-концу ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR, ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT, где ABD1 непосредственно соединен с VH4. В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) ITR AAV2 или AAV8, которые фланкируют кассету экспрессии; (2) элементы контроля, которые включают а) промотор ЦНС, b) интрон (например, VH4) и с) небольшой поли(А)-сигнал; и (3) кассету микродистрофина, содержащую от N-конца к С-концу ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR, ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT, где ABD1 непосредственно соединен с VH4. В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) ITR AAV2 или AAV8, которые фланкируют кассету экспрессии; (2) элементы контроля, которые включают а) минимальный промотор SPc для специфической для мышц экспрессии трансгена, b) необязательно, интрон варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека (например, VH4) и с) небольшой поли(А)-сигнал; и (3) кассету микродистрофина, содержащую от N-конца к С-концу: ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR, ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT. В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) ITR AAV2 или AAV8, которые фланкируют кассету экспрессии; (2) элементы контроля, которые включают а) специфический для мышц промотор SPc5.12 или промотор ЦНС, b) интрон (например, VH4) и с) небольшой поли(А)-сигнал; и (3) кассету микродистрофина, содержащую от N-конца к С-концу ABD1-H1-R1-R2-R3-H2-R24-H4-CR, ABD1-H1-R1-R2-R3-H2-R24-H4-CR-CT, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT, где ABD1 непосредственно соединен с VH4. В некоторых вариантах осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержащие ITR AAV, фланкирующие кассету экспрессии микродистрофина, которая включает от N-конца к С-концу ABD1-H1-R1-R2-R3-H2-R24-H4-CR, ABD1-H1-R1-R2-R3-H2-R24-H4-CR-CT, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, или ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT, может иметь длину от 4000 до 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления такие конструкции имеют длину менее 4900 нуклеотидов, 4800 нуклеотидов, 4700 нуклеотидов, 4600 нуклеотидов, 4500 нуклеотидов, 4400 нуклеотидов или 4300 нуклеотидов.

[00136] Некоторые варианты осуществления нуклеиновых кислот по настоящему изобретению содержат векторы гAAV, кодирующие микродистрофин, содержащие или состоящие из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 53, 54, 55, 56 или 82, представленной в таблице 10 ниже. В различных вариантах осуществления вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 53, 54, 55, 56, 82 или ее обратной комплементарной цепью и кодирует вектор гAAV, подходящий для экспрессии терапевтически эффективного микродистрофина в мышечных клетках.

Таблица 10: Нуклеотидные последовательности кассеты RGX-DYS

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
<p>RGX-DYS1 (полная кассета от SPc5-12 до поли(A), включая промежуточные последовательности) 4734 п.о. <i>IIR</i> показаны строчными буквами</p>	53	<p>ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgctcgggcgacctttggtcgcccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgcagagaggagtgcccaactccatcactaggggtcctCATATGcagg gtaatgggatcctCTAGAGGCCGTCCGCCCTCGGCACCATCCTCACGACAC CCAAATATGGCGACGGGTGAGGAATGGTGGGGAGTTATTTTTAGAG CGGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGTGTTGGCGCTCTAAAAAT AACTCCCGGGAGTTATTTTTAGAGCGGAGGAATGGTGGACACCCAA ATATGGCGACGGTTCCTCACCCGTCGCCATATTTGGGTGTCCGCCCT CGGCCGGGGCCGCATTCCTGGGGGCCGGGCGGTGCTCCCGCCCGCC TCGATAAAAGGCTCCGGGGCCGGCGGCCGCCACGAGCTACCCGG AGGAGCGGGAGGCGCAAGCGgAATTCGCCACCATGCTTTGGTGGG AAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCAGAAGAAAA CCTTCACCAAATGGGTCAATGCCCAGTTCAGCAAGTTTGGCAAGCA GCACATTGAGAACCTGTTCAGTGACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTG CTGGATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAG AAGGGCAGCACAAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGCC CTGAGAGTGCTGCAGAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGCA GCACAGACATTGTGGATGGCAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGAT CTGGAACATCATCCTGCACTGGCAAGTGAAGAATGTGATGAAGAAC ATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACCAACTCTGAGAAGATCCTGCTGA GCTGGGTGAGACAGAGCACCAGAACTACCCTCAAGTGAATGTGAT CAACTTCACCACCTCTTGGAGTGATGGACTGGCCCTGAATGCCCTG ATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTGACTGGAACCTCTGTTGTGT GCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCTTCAACATTGC CAGATACCAGCTGGGAATTGAGAACTGCTGGACCCTGAGGATGTG GACACCACCTATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCA GCCTGTTCCAGGTGCTGCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCA AGAGGTTGAGATGCTGCCCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGA ACACTTCAGCTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCACA GTGTCTCTGGCCAGGGATATGAGAGAACAAGCAGCCCCAAGCCTA GGTTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCCTATGTGACCACATC TGACCCCAACAAGAAGCCATTTCCAAGCCAGCATCTGGAAGCCCCT GAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCTGAAGTGAAC CTGGATAGATAACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTGTCTGGCTGC TGTCTGCTGAGGATACTGCAGGCTCAGGGTGAATCAGCAATGA TGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTACACCCATGAGGGCTACATG ATGGACCTGACAGCCCACCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTGCAG CTGGGCTCCAAGCTGATTGGCACAGGCAAGCTGTCTGAGGATGAAG AGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCAGATGGG</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		AGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGAGCAACCTGCACA GAGTGCTCATGGACCTGCAGAATCAGAAACTGAAAGAACTGAATG ACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAGAGG AACCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGC AGCATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAGCAAGAGCAAGTCAGAG TGAACAGCCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATGAGTCCTCTGG GGATCATGCCACAGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAAGGTGCTGGG AGACAGATGGGCCAACATCTGTAGGTGGACAGAGGATAGATGGGT GCTGCTCCAGGACATTCTGCTGAAGTGGCAGAGACTGACAGAGGA ACAGTGCTGTTTTCTGCTGGCTCTCTGAGAAAGAGGATGCTGTC AACAGATCCATAACACAGGCTTCAAGGATCAGAATGAGATGCTCA GCTCCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCTGACCTGGAAGAA AAAGCAGTCCATGGGCAAGCTCTACAGCCTGAAGCAGGACCTGCTG TCTACCCTGAAGAACAGTCTGTGACCCAGAAAAGTGGCCTGGC TGGACAACCTTGTAGATGCTGGGACAACCTGGTGCAGAAGCTGGA AAAGTCTACAGCCCAGATCAGCCAGCAACCTGATCTTGCCCCTGGC CTGACCACAATTGGAGCCTCTCCAACACAGACTGTGACCCTGGTTA CCCAGCCAGTGGTCACCAAAGAGACAGCCATCAGCAAAGTGGAAA TGCCAGCTCTCTGATGCTGGAAGTCCCCACACTGGAAAGGCTGCA AGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAGCTGAGACA GGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGGGACCTGCTC ATTGATAGCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAGCCCTGAGG GGAGAGATTGCCCCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGACC TGGCCAGACAGCTGACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACAA CCTGAGCACCCCTTGAGGACCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCAG GTGGCAGTGAAGATAGAGTCAGGCAGCTGCATGAGGCCACAGA GATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGTCTACCTCTGTGCAAGG CCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCCTAACAAAGGTGCCCTACTACATC AACCATGAGACACAGACCACCTGTTGGGATCACCCCAAGATGACA GAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACAATGTCAGATTCAGTG CCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGAAAGCTCTGTG CCTGGACCTGCTTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGACCAGC ACAATCTGAAGCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCAT CAACTGCCTCACCACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAAAC AATCTGGTCAATGTGCCCTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCT GCTGAATGTGTATGACACAGGCAGAACAGGCAGGATCAGAGTCCT GTCCCTCAAGACAGGCATCATCTCCCTGTGCAAAGCCCCTTGAG GACAAGTACAGATACCTGTTCAAGCAAGTGGCCTCCAGCACAGGCT

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>TTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCTGCTCCTGCATGACAGCATTCA GATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTGGCTTCCTTTGGAGGCAGCAAT ATTGAGCCATCAGTCAGGTCCTGTTTTTCAGTTTTGCCAACAACAAGC CTGAGATTGAGGCTGCCCTGTTCTGGACTGGATGAGACTTGAGCC TCAGAGCATGGTCTGGCTGCCTGTGCTTCATAGAGTGGCTGCTGCT GAGACTGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGC CCCATCATTGGCTTCAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATG ATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCA CAAAATGCACTACCCCATGGTGGAATACTGCACCCCAACAACCTCT GGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTC AGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCCAAGATGGGCTACCTGC CTGTCCAGACAGTGTGAGGGTGACAACATGGAAACCCCTGTGAC ACTGATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTGCCCTGCCTCAAGTCCAC AGCTGTCCCATGATGACACCCACAGCAGAATTGAGCACTATGCCTC CAGACTGGCAGAGATGGAAAACAGCAATGGCAGCTACCTGAATGA TAGCATCAGCCCCAATGAGAGCATTGATGATGAGCATCTGCTGATC CAGCACTACTGTCAGTCCCTGAACCAGGACTCTCCACTGAGCCAGC CTAGAAGCCCTGCTCAGATCCTGATCAGCCTTGAGTCTGAGGAAAG GGGAGAGCTGGAAAGAATCCTGGCAGATCTTGAGGAAGAGAACAG AAACCTGCAGGCAGAGTATGACAGGCTCAAACAGCAGCATGAGCA CAAGGGACTGAGCCCTCTGCCTTCTCCTCCTGAAATGATGCCACCT CTCCACAGTCTCCAAGGTGATGACTCGAGAGGCCTAATAAAGAGCT CAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCAGGGTAAT GGGCTAGCTGCGGCCG Caggaaccctagtgatggagtggccactccctctgcgcgctcgc tcgctcactgaggccggcgaccaaagtcgccgacgccgggctttgccggcgccctcagtgagcga gcgagcgcgcag</p>
<p>RGX-DYS2 (полная кассета от SPc5-12 до поли(A), включая промежуточные последовательно сти) 4814 п.о. <i>ITR</i> <i>показаны</i></p>	54	<p>ctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccgggcaagcccggcgctcggcgacccttggtgcccgccc tcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtggccaactccatcactaggggttctCATATGcagg gtaatggggatcctCTAGAGGCCGTCCGCCCTCGGCACCATCCTCACGACAC CCAAATATGGCGACGGGTGAGGAATGGTGGGGAGTTATTTTTAGAG CGGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGGCTGTTGGCGCTCTAAAAAT AACTCCCGGGAGTTATTTTTAGAGCGGAGGAATGGTGGACACCCAA ATATGGCGACGGTTCCCTACCCGTCGCCATATTTGGGTGTCCGCCCT CGGCCGGGGCCGCATTCCTGGGGGCCGGGCGGTGCTCCC GCCGCC TCGATAAAAGGCTCCGGGGCCGGCGGCCACGAGCTACCCGG AGGAGCGGGAGGCGCCAAGGTGAGTATCTCAGGGATCCAGACATG GGGATATGGGAGGTGCCTCTGATCCCAGGGCTCACTGTGGGTCTCT CTGTTACAGGAATTCGCCACCATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAA</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
<i>строчными буквами</i>		GATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAA TGGGTCAATGCCCAGTTCAGCAAGTTTGGCAAGCAGCACATTGAGA ACCTGTTCAAGTACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTGCTGGATCTGCT GGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGGCAGCAC AAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCT GCAGAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGCAGCACAGACATT GTGGATGGCAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCA TCCTGCACTGGCAAGTGAAGAATGTGATGAAGAATCATGGCTGG CCTGCAGCAGACCAACTCTGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTCAGA CAGAGCACCAGAACTACCTCAAGTGAATGTGATCAACTTCACCA CCTCTTGGAGTGATGGACTGGCCCTGAATGCCCTGATCCACAGCCA CAGACCTGACCTGTTTGACTGGAACCTCTGTTGTGTGCCAGCAGTCTG CCACACAGAGACTGGAACATGCCTTCAACATTGCCAGATAACCAGCT GGGAATTGAGAACTGCTGGACCCTGAGGATGTGGACACCACCTAT CCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCAGCCTGTTCCAGG TGCTGCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAGGTTGAGAT GCTGCCCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTTCCAGCTG CACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGCCC AGGGATATGAGAGAACAAGCAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCT ATGCCTACACACAGGCTGCCTATGTGACCACATCTGACCCCAAG AAGCCCATTTC AAGCCAGCATCTGGAAGCCCCTGAGGACAAGAGC TTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCTGAAGTGAACCTGGATAGATAACC AGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTGTCCTGGCTGCTGTCTGCTGAGGA TACACTGCAGGCTCAGGGTGAAATCAGCAATGATGTGGAAGTGGTC AAGGACCAGTTTCACACCCATGAGGGCTACATGATGGACCTGACAG CCCACCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCT GATTGGCACAGGCAAGCTGTCTGAGGATGAAGAGACAGAGGTGCA AGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGT GGCCAGCATGGA AAAAGCAGAGCAACCTGCACAGAGTGCTCATGGA CCTGCAGAATCAGAACTGAAAGA ACTGAATGACTGGCTGACCAA GACAGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAGAGGAACCTCTGGGACC AGACCTGGAAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCT GCAAGAGGACCTTGAGCAAGAGCAAGTCAGAGTGAACAGCCTGAC ACACATGGTGGTGGTTGTGGATGAGTCCTCTGGGGATCATGCCACA GCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAAGGTGCTGGGAGACAGATGGGCC AACATCTGTAGGTGGACAGAGGATAGATGGGTGCTGCTCCAGGAC ATTCTGCTGAAGTGGCAGAGACTGACAGAGGAACAGTGCCTGTTTT CTGCCTGGCTCTCTGAGAAAGAGGATGCTGTCAACAAGATCCATAC

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CACAGGCTTCAAGGATCAGAATGAGATGCTCAGCTCCCTGCAGAAA CTGGCTGTGCTGAAGGCTGACCTGGAAAAGAAAAAGCAGTCCATG GGCAAGCTCTACAGCCTGAAGCAGGACCTGCTGTCTACCCTGAAGA ACAAGTCTGTGACCCAGAAAAGTGAAGCCTGGCTGGACAACCTTGC TAGATGCTGGGACAACCTGGTGCAGAAGCTGGAAAAGTCTACAGC CCAGATCAGCCAGCAACCTGATCTTGCCCCTGGCCTGACCACAATT GGAGCCTCTCCAACACAGACTGTGACCCTGGTTACCCAGCCAGTGG TCACCAAAGAGACAGCCATCAGCAAAGTGGAAATGCCAGCTCTCT GATGCTGGAAGTCCCCACACTGGAAAGGCTGCAAGAAGTCAAGA GGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAGCTGAGACAGGCTGAAGTGAT CAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGGGACCTGCTCATTGATAGCCTG CAGGACCATCTGGAAAAGTGAAGCCCTGAGGGGAGAGATTGCC CCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGACCTGGCCAGACAGC TGACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTGAGCACCT TGAGGACCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTGGA AGATAGAGTCAGGCAGCTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACC AGCCAGCCAGCACTTTCTGTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAG AGAGCTATCTCTCCTAACAAGGTGCCCTACTACATCAACCATGAGA CACAGACCACCTGTTGGGATCACCCCAAGATGACAGAGCTGTACCA GAGTCTGGCAGACCTCAACAATGTCAGATTCAGTGCCTACAGGACT GCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGAAAGCTCTGTGCCTGGACCTGC TTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGACCAGCACAATCTGAA GCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTC ACCACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAACAATCTGGTCA ATGTGCCCTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGT GTATGACACAGGCAGAACAGGCAGGATCAGAGTCTGTCTTCAAG ACAGGCATCATCTCCCTGTGCAAAGCCCACTTGGAGGACAAGTACA GATACCTGTTCAAGCAAGTGGCCTCCAGCACAGGCTTTTGTGACCA GAGAAGGCTGGGCCTGCTCCTGCATGACAGCATTGAGATCCCTAGA CAGCTGGGAGAAGTGGCTTCCCTTTGGAGGCAGCAATATTGAGCCAT CAGTCAGGTCCTGTTTTAGTTTTGCCAACAACAAGCCTGAGATTGA GGCTGCCCTGTTCCCTGGACTGGATGAGACTTGAGCCTCAGAGCATG GTCTGGCTGCCTGTGCTTCATAGAGTGGCTGCTGCTGAGACTGCCA AGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCATTGG CTTCAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATGATATCTGCCAG AGCTGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACT ACCCCATGGTGGAAATACTGCACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGT TAGAGACTTTGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTCAGGACCAAGAG

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>ATACTTTGCTAAGCACCCCAGAATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACA GTGCTTGAGGGTGACAACATGGAAACCCCTGTGACACTGATCAATT TCTGGCCAGTGGACTCTGCCCCTGCCTCAAGTCCACAGCTGTCCCAT GATGACACCCACAGCAGAATTGAGCACTATGCCTCCAGACTGGCAG AGATGGAAAACAGCAATGGCAGCTACCTGAATGATAGCATCAGCC CCAATGAGAGCATTGATGATGAGCATCTGCTGATCCAGCACTACTG TCAGTCCCTGAACCAGGACTCTCCACTGAGCCAGCCTAGAAGCCCT GCTCAGATCCTGATCAGCCTTGAGTCTGAGGAAAGGGGAGAGCTGG AAAGAATCCTGGCAGATCTTGAGGAAGAGAACAGAAACCTGCAGG CAGAGTATGACAGGCTCAAACAGCAGCATGAGACAAGGGACTGA GCCCTCTGCCTTCTCCTCCTGAAATGATGCCACCTCTCCACAGTCT CCAAGGTGATGACTCGAGAGGCCTAATAAAGAGCTCAGATGCATC GATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG CCAGGGTAATGGGCTAGCTGCGGCCG Caggaaccctagtgatggagtggccactc cctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggacccaaggtcgcccgacgccccgggcttggccggg cggcctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>
<p>RGX-DYS3 (полная кассета от SPc5-12 до поли(A), включая промежуточные последовательно сти) 4364 п.о.) <i>I</i>TR показаны строчными буквами</p>	55	<p>ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgccccgggcaagccccgggctcgggacgaccttggctgccccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatcactaggggtcctCATATGcagg gtaatgggatcctCTAGAGGCCGTCCGCCCTCGGCACCATCCTCACGACAC CCAAATATGGCGACGGGTGAGGAATGGTGGGAGTTATTTTTAGAG CGGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGTGTTGGCGCTCTAAAAAT AACTCCCGGGAGTTATTTTTAGAGCGGAGGAATGGTGGACACCCAA ATATGGCGACGGTTCCTCACCCGTCGCCATATTTGGGTGTCCGCCCT CGGCCGGGCGCATTCCTGGGGGCGGGCGGTGCTCCCCCGCCGCC TCGATAAAAGGCTCCGGGGCCGGCGGCCGCCACGAGCTACCCGG AGGAGCGGGAGGCGCAAGGTGAGTATCTCAGGGATCCAGACATG GGGATATGGGAGGTGCCTCTGATCCCAGGGCTCACTGTGGGTCTCT CTGTTACAGGAATTCGCCACCATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAA GATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAA TGGGTCAATGCCAGTTCAGCAAGTTTGGCAAGCAGCACATTGAGA ACCTGTTCACTGACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTGCTGGATCTGCT GGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGGCAGCAC AAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCT GCAGAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGCAGCACAGACATT GTGGATGGCAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCA TCCTGCACTGGCAAGTGAAGAATGTGATGAAGAACATCATGGCTGG CCTGCAGCAGACCAACTCTGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTCAGA CAGAGCACCAAGAACTACCTCAAGTGAATGTGATCAACTTCACCA</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CCTCTTGGAGTGATGGACTGGCCCTGAATGCCCTGATCCACAGCCA CAGACCTGACCTGTTTACTGGAACCTCTGTTGTGTGCCAGCAGTCTG CCACACAGAGACTGGAACATGCCTTCAACATTGCCAGATAACCAGCT GGGAATTGAGAACTGCTGGACCCTGAGGATGTGGACACCACCTAT CCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCAGCCTGTTCCAGG TGCTGCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAGGTTGAGAT GCTGCCCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTTCCAGCTG CACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGCCC AGGGATATGAGAGAACAAGCAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCT ATGCCTACACACAGGCTGCCTATGTGACCACATCTGACCCACAAG AAGCCATTTCCAAGCCAGCATCTGGAAGCCCCTGAGGACAAGAGC TTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCTGAAGTGAACCTGGATAGATACC AGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTGTCTGGCTGCTGTCTGCTGAGGA TACACTGCAGGCTCAGGGTGAAATCAGCAATGATGTGGAAGTGGTC AAGGACCAGTTTCACACCCATGAGGGCTACATGATGGACCTGACAG CCCACCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCT GATTGGCACAGGCAAGCTGTCTGAGGATGAAGAGACAGAGGTGCA AGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGT GGCCAGCATGGAAGAGCAGAGCAACCTGCACAGAGTGCTCATGGA CCTGCAGAATCAGAACTGAAAGAAGTGAATGACTGGCTGACCAA GACAGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAGAGGAACCTCTGGGACC AGACCTGGAAGATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCT GCAAGAGGACCTTGAGCAAGAGCAAGTCAGAGTGAACAGCCTGAC ACACATGGTGGTGGTTGTGGATGAGTCCTCTGGGGATCATGCCACA GCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAAGGTGCTGGGAGACAGATGGGCC AACATCTGTAGGTGGACAGAGGATAGATGGGTGCTGCTCCAGGAC ATTCTGCTGAAGTGGCAGAGACTGACAGAGGAACAGTGCCTGTTTT CTGCCTGGCTCTCTGAGAAAGAGGATGCTGTCAACAAGATCCATAC CACAGGCTTCAAGGATCAGAATGAGATGCTCAGCTCCCTGCAGAAA CTGGCTGTGCTGAAGGCTGACCTGGAAAAGAAAAAGCAGTCCATG GGCAAGCTCTACAGCCTGAAGCAGGACCTGCTGTCTACCCTGAAGA ACAAGTCTGTGACCCAGAAAAGTGAAGGCTGGCTGGACAACCTTTC TAGATGCTGGGACAACCTGGTGCAGAAGCTGGAAAAGTCTACAGC CCAGATCAGCCAGCAACCTGATCTTGCCCCTGGCCTGACCACAATT GGAGCCTCTCCAACACAGACTGTGACCCTGGTTACCCAGCCAGTGG TCACCAAAGAGACAGCCATCAGCAAACTGGAAATGCCAGCTCTCT GATGCTGGAAGTCCCCACACTGGAAAGGCTGCAAGAAGTCAAGA GGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAGCTGAGACAGGCTGAAGTGAT

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>CAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGGGACCTGCTCATTGATAGCCTG CAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAAGCCCTGAGGGGAGAGATTGCC CCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGACCTGGCCAGACAGC TGACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTGAGCACCCCT TGAGGACCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTGGAA AGATAGAGTCAGGCAGCTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACC AGCCAGCCAGCACTTTCTGTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAG AGAGCTATCTCTCCTAACAAGGTGCCCTACTACATCAACCATGAGA CACAGACCACCTGTTGGGATCACCCCAAGATGACAGAGCTGTACCA GAGTCTGGCAGACCTCAACAATGTCAGATTCAGTGCCTACAGGACT GCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGAAAGCTCTGTGCCTGGACCTGC TTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGACCAGCACAACTGAA GCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTC ACCACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAACAATCTGGTCA ATGTGCCCTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGT GTATGACACAGGCAGAACAGGCAGGATCAGAGTCCTGTCCTTCAAG ACAGGCATCATCTCCCTGTGCAAAGCCCCTTGGAGGACAAGTACA GATACCTGTTCAAGCAAGTGGCCTCCAGCACAGGCTTTTGTGACCA GAGAAGGCTGGGCCTGCTCCTGCATGACAGCATTAGATCCCTAGA CAGCTGGGAGAAGTGGCTTCTTTGGAGGCAGCAATATTGAGCCAT CAGTCAGGTCCTGTTTTAGTTTGCCAACAACAAGCCTGAGATTGA GGCTGCCCTGTTCTGGACTGGATGAGACTTGAGCCTCAGAGCATG GTCTGGCTGCCTGTGCTTCATAGAGTGGCTGCTGCTGAGACTGCCA AGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCATTGG CTTCAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATGATATCTGCCAG AGCTGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACT ACCCCATGGTGAATACTGCACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGT TAGAGACTTTGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTTCAGGACCAAGAG ATACTTTGCTAAGCACCCCAAGATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACA GTGCTTGAGGGTGACAACATGGAAACCTGATGAGTCGACAGGCCTA ATAAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGT G GCTAGCTGCGGCCG Caggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgctcgtcg ctcactgaggccgggacacaaaggtgccccgacgccccgggctttgccccggcggcctcagtgagcgagcg agcgcgag</p>
RGX-DYS4 (полная кассета от mini-SPe5-12)	56	<p>ctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccccgggcaagccccggcgctcggcgacaccttggctgccccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtggccaactccatcactaggggttctCATATGcagg gtaatgggatcctCTAGAGAATGGTGGACACCCAAATATGGCGACGGTTC</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
<p>до поли(А), включая промежуточные последовательно сти)</p> <p>4661 п.о. <i>ITR</i> показаны строчными буквами</p>		<p>CTCACCCGTGCCATATTTGGGTGTCCGCCCTCGGCCGGGGCCGCA TTCCTGGGGGCCGGGCGGTGCTCCCGCCCCGCCTCGATAAAAGGCTC CGGGGCCGGCGGCGGCCACGAGCTACCCGGAGGAGCGGGAGGCG CCAAGGTGAGTATCTCAGGGATCCAGACATGGGGATATGGGAGGT GCCTCTGATCCCAGGGCTCACTGTGGGTCTCTCTGTTACAGGAATT CGCCACCATGCTTTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGG GAAGATGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCAATGCCCAG TTCAGCAAGTTTGGCAAGCAGCACATTGAGAACCTGTTCAAGTACC TGCAGGATGGCAGAAGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGCCTGACAG GCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGGCAGCACAAAGAGTGCATGCC TGAACAATGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAATG TGGACCTGGTCAATATTGGCAGCACAGACATTGTGGATGGCAACCA CAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTGGCAA GTGAAGAATGTGATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACC AACTCTGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGAGACAGAGCACCAGA AACTACCCTCAAGTGAATGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGTG ATGGACTGGCCCTGAATGCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCT GTTTGAAGTGGAACTCTGTTGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGAGA CTGGAACATGCCTTCAACATTGCCAGATAACCAGCTGGGAATTGAGA AACTGCTGGACCCTGAGGATGTGGACACCACCTATCCTGACAAGAA ATCCATCCTCATGTACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCCCAGC AAGTGTCCATTGAGGCCATTCAAGAGGTTGAGATGCTGCCCAGACC TCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTTCCAGCTGCACCACCAGATG CACTACTCTCAGCAGATCACAGTGTCTCTGGCCAGGGATATGAGA GAACAAGCAGCCCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCCTACACACA GGCTGCCTATGTGACCACATCTGACCCCAAGAAGCCCATTTCCA AGCCAGCATCTGGAAGCCCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGC CTGATGGAATCTGAAGTGAACCTGGATAGATAACCAGACAGCCCTGG AAGAAGTGCTGTCCTGGCTGCTGTCTGCTGAGGATACACTGCAGGC TCAGGGTGAAATCAGCAATGATGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTT CACACCCATGAGGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCACCAGGGC AGAGTGGGAAATATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCACAG GCAAGCTGTCTGAGGATGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGA ACCTGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGG AAAAGCAGAGCAACCTGCACAGAGTGCTCATGGACCTGCAGAATC AGAAACTGAAAGAACTGAATGACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAA GGACTAGGAAGATGGAAGAGGAACCTCTGGGACCAGACCTGGAAG ATCTGAAAAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAAGAGGACC</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		TTGAGCAAGAGCAAGTCAGAGTGAACAGCCTGACACACATGGTGG TGGTTGTGGATGAGTCCTCTGGGGATCATGCCACAGCTGCTCTGGA AGAACAGCTGAAGGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACATCTGTAG GTGGACAGAGGATAGATGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGCTGAAG TGGCAGAGACTGACAGAGGAACAGTGCCTGTTTTCTGCCTGGCTCT CTGAGAAAGAGGATGCTGTCAACAAGATCCATACCACAGGCTTCAA GGATCAGAATGAGATGCTCAGCTCCCTGCAGAACTGGCTGTGCTG AAGGCTGACCTGGAAAAGAAAAGCAGTCCATGGGCAAGCTCTAC AGCCTGAAGCAGGACCTGCTGTCTACCCTGAAGAACAAGTCTGTGA CCCAGAAAAGTGAAGCCTGGCTGGACAACCTTTGCTAGATGCTGGGA CAACCTGGTGCAGAAGCTGGAAAAGTCTACAGCCCAGATCAGCCA GCAACCTGATCTTGCCCCTGGCCTGACCACAATTGGAGCCTCTCCA ACACAGACTGTGACCCTGGTTACCCAGCCAGTGGTCACCAAAGAGA CAGCCATCAGCAAAGTGGAAATGCCAGCTCTCTGATGCTGGAAGT CCCCACACTGGAAAGGCTGCAAGAAGTCAAGAGGCCACAGATGA GCTGGACCTGAAGCTGAGACAGGCTGAAGTGAATCAAAGGCAGCTG GCAGCCAGTTGGGGACCTGCTCATTGATAGCCTGCAGGACCATCTG GAAAAAGTGAAAGCCCTGAGGGGAGAGATTGCCCTCTGAAAGAA AATGTGTCCCATGTGAATGACCTGGCCAGACAGCTGACCACACTGG GAATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTGAGCACCCCTTGAGGACCTGAA CACCAGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTGGAAAGATAGAGTCAG GCAGCTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCAC TTTCTGTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCC TAACAAGGTGCCCTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGT TGGGATCACCCCAAGATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACC TCAACAATGTCAGATTCAGTGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAG AAGGCTCCAGAAAGCTCTGTGCCTGGACCTGCTTTCCCTGAGTGCA GCTTGTGATGCCCTGGACCAGCACAACTGAAGCAGAATGACCAGC CTATGGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTCACCACCATCTATGAT AGGCTGGAACAAGAGCACAACTCTGGTCAATGTGCCCTGTGTG TGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTATGACACAGGCAG AACAGGCAGGATCAGAGTCCTGTCCTTCAAGACAGGCATCATCTCC CTGTGCAAAGCCCCTTGGAGGACAAGTACAGATACCTGTTCAAGC AAGTGGCCTCCAGCACAGGCTTTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCT GCTCCTGCATGACAGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTG GCTTCCTTTGGAGGCAGCAATATTGAGCCATCAGTCAGGTCCTGTTT TCAGTTTGCCAAACAACAAGCCTGAGATTGAGGCTGCCCTGTTCTTG GACTGGATGAGACTTGAGCCTCAGAGCATGGTCTGGCTGCCTGTGC

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>TTCATAGAGTGGCTGCTGCTGAGACTGCCAAGCACCAGGCCAAGTG CAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCATTGGCTTCAGATACAGATCC CTGAAGCACTTCAACTATGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGTGG CAGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGAATAC TGCACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGG TGCTGAAAAACAAGTTCAGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCC CAGAATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACAGTGCTTGAGGGTGACAAC ATGGA AACCCCTGTGACTGATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTG CCCCTGCCTCAAGTCCACAGCTGTCCCATGATGACACCCACAGCAG AATTGAGCACTATGCCTCCAGACTGGCAGAGATGAAAAACAGCAA TGGCAGCTACCTGAATGATAGCATCAGCCCCAATGAGAGCATTGAT GATGAGCATCTGCTGATCCAGCACTACTGTCAGTCCCTGAACCAGG ACTCTCCACTGAGCCAGCCTAGAAGCCCTGCTCAGATCCTGATCAG CCTTGAGTCTGAGGAAAGGGGAGAGCTGGAAAGAATCCTGGCAGA TCTTGAGGAAGAGAACAGAAACCTGCAGGCAGAGTATGACAGGCT CAAACAGCAGCATGAGCACAAGGGACTGAGCCCTCTGCCTTCTCCT CCTGAAATGATGCCACCTCTCCACAGTCTCCAAGGTGATGACTCG AGAGGCCTAATAAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGT TTTTTGTGTG</p> <p>CCAGGGTAATGGGCTAGCTGCGGCCG Caggaaccctagtgatggagtggccactc cctctctgcgcgctcgctcactgagggccggcgaccaaggtcgcccgacccccggctttgccccggg cggcctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>
<p>RGX-DYS5 (полная кассета от SPc5-12 до поли(A), включая промежуточные последовательно сти) 4560 п.о. <i>IIR</i> показаны строчными буквами</p>	82	<p>ctgcgcgctcgctcactgagggcccccgggcaagccccgggctcgggacaccttggctgccccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtggccaactccatcactaggggttctCATATGcagg gtaatgggatacctCTAGAGGCCGTCCGCCCTCGGCACCATCCTCACGACAC CCAAATATGGCGACGGGTGAGGAATGGTGGGGAGTTATTTTTAGAG CGGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGTGTTGGCGCTCTAAAAAT AACTCCCGGAGTTATTTTTAGAGCGGAGGAATGGTGGACACCCAA ATATGGCGACGGTTCCTCACCCGTCGCCATATTTGGGTGTCCGCCCT CGGCCGGGGCCGCATTCCTGGGGGCGGGCGGTGCTCCCGCCCGCC TCGATAAAAGGCTCCGGGGCCGGCGGCGGCCACGAGCTACCCGG AGGAGCGGGAGGCGCCAAGCGGAATTCGCCACCATGCTTTGGTGG GAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCAGAAGAAA ACCTTCACCAAATGGGTCAATGCCCAGTTCAGCAAGTTTGGCAAGC AGCACATTGAGAACCTGTTCACTGACCTGCAGGATGGCAGAAGGCT GCTGGATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGA GAAGGGCAGCACAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGAACAAGGC CCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAATGTGGACCTGGTCAATATTGGC</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		AGCACAGACATTGTGGATGGCAACCACAAGCTGACCCTGGGCCTGA TCTGGAACATCATCCTGCACTGGCAAGTGAAGAATGTGATGAAGAA CATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACCAACTCTGAGAAGATCCTGCTG AGCTGGGTCAGACAGAGCACCAGAACTACCCCTCAAGTGAATGTG ATCAACTTCAACCACCTCTTGGAGTGTGACTGGCCCTGAATGCC TGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTACTGGAACCTGTTGT GTGCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCTTCAACATT GCCAGATACCAGCTGGGAATTGAGAACTGCTGGACCCTGAGGAT GTGGACACCACCTATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCA CCAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCCCAGCAAGTGTCCATTGAGGCCAT TCAAGAGGTTGAGATGCTGCCCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAG GAACACTTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCA CAGTGTCTCTGGCCCAGGGATATGAGAGAACAAGCAGCCCCAAGC CTAGGTTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCCTATGTGACCAC ATCTGACCCCACAAGAAGCCATTTCCAAGCCAGCATCTGGAAGCC CCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCTGAAGTGA ACCTGGATAGATACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTGTCCTGGCT GCTGTCTGCTGAGGATACTGCAGGCTCAGGGTGAAATCAGCAAT GATGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTCACACCCATGAGGGCTACA TGATGGACCTGACAGCCCACCAGGGCAGAGTGGGAAATATCCTGC AGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCACAGGCAAGCTGTCTGAGGATGA AGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCAGATG GGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGAGCAACCTGCA CAGAGTGTCTATGGACCTGCAGAATCAGAACTGAAAGAAGTCAA TGACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAGATGGAAGA GGAACCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGACAGGTGCA GCAGCATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAAGCAAGAGCAAGTCAG AGTGAACAGCCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATGAGTCCTCT GGGATCATGCCACAGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAAGGTGCTG GGAGACAGATGGGCCAACATCTGTAGGTGGACAGAGGATAGATGG GTGCTGCTCCAGGACATTCTGCTGAAGTGGCAGAGACTGACAGAGG AACAGTGCCTGTTTTCTGCCTGGCTCTCTGAGAAAGAGGATGCTGT CAACAAGATCCATAACCACAGGCTTCAAGGATCAGAATGAGATGCTC AGCTCCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCTGACCTGGAAAAGA AAAAGCAGTCCATGGGCAAGCTCTACAGCCTGAAGCAGGACCTGCT GTCTACCCTGAAGAACAAGTCTGTGACCCAGAAAAGTGAAGCCTGG CTGGACAACCTTTGCTAGATGCTGGGACAACCTGGTGCAGAAGCTGG AAAAGTCTACAGCCCAGATCAGCCAGCAACCTGATCTTGCCCTGG

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CCTGACCACAATTGGAGCCTCTCCAACACAGACTGTGACCCTGGTT ACCCAGCCAGTGGTCACCAAAGAGACAGCCATCAGCAAAGCTGGAA ATGCCAGCTCTCTGATGCTGGAAGTCCCCACACTGGAAAGGCTGC AAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAGCTGAGAC AGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGGGACCTGC TCATTGATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAAGCCCTGAG GGGAGAGATTGCCCCCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGTGAATGAC CTGGCCAGACAGCTGACCACACTGGGAATCCAGCTGAGCCCCTACA ACCTGAGCACCTTGAGGACCTGAACACCAGGTGGAAGCTCCTCCA GGTGGCAGTGGAAGATAGAGTCAGGCAGCTGCATGAGGCCACAG AGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGTCTACCTCTGTGCAAG GCCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCCTAACAAAGGTGCCCTACTACAT CAACCATGAGACACAGACCACCTGTTGGGATCACCCCAAGATGACA GAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACAATGTCAGATTCAGTG CCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGAAAGCTCTGTG CCTGGACCTGCTTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCCCTGGACCAGC ACAATCTGAAGCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCAT CAACTGCCTCACCACCATCTATGATAGGCTGGAACAAGAGCACAAAC AATCTGGTCAATGTGCCCTGTGTGTGGACATGTGCCTGAATTGGCT GCTGAATGTGTATGACACAGGCAGAACAGGCAGGATCAGAGTCCT GTCCTTCAAGACAGGCATCATCTCCCTGTGCAAAGCCCCTTGGAG GACAAGTACAGATACCTGTTCAAGCAAGTGGCCTCCAGCACAGGCT TTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCTGCTCCTGCATGACAGCATTCA GATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTGGCTTCCTTTGGAGGCAGCAAT ATTGAGCCATCAGTCAGGTCCTGTTTTAGTTTTGCCAACAAACAAGC CTGAGATTGAGGCTGCCCTGTTCTGGACTGGATGAGACTTGAGCC TCAGAGCATGGTCTGGCTGCCTGTGCTTCATAGAGTGGCTGCTGCT GAGACTGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGC CCCATCATTGGCTTCAAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATG ATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCA CAAAATGCACTACCCATGGTGGAATACTGCACCCCAACAACCTCT GGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTC AGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCAGAATGGGCTACCTGC CTGTCCAGACAGTGTGAGGGTGACAACATGGAAACCCCTGTGAC ACTGATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTGCCCTGCCTCAAGTCCAC AGCTGTCCCATGATGACACCCACAGCAGAATTGAGCACTATGCCTC CAGACTGGCAGAGATGGAAAACAGCAATGGCAGCTACCTGAATGA TAGCATCAGCCCAATGAGAGCATTGATGATGAGCATCTGCTGATC

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		CAGCACTACTGTCAGTCCCTGAACCAGGACTCTCCACTGAGCCAGC CTAGAAGCCCTGCTCAGATCCTGATCAGCCTTGAGTCTTGATGAGT CGACAGGCCTAATAAAGAGCTCAGATGCATCGATCAGAGTGTGTTG GTTTTTTGTGTGGCTAGCTGCGGCCGAggaaccctagtgatggagttggcactcc ctctctgcgctcgtcgtcactgaggccggcgaccaaggtcgcccagcccgggctttgccgggc ggctcagtgagcgagcgagcgcgag
RGX-DYS6 (полная кассета, включая фланкирующие ITR, промотор Spc5-12 до поли(А) и промежуточные последовательно сти) 4584 п.о. <i>ITR показаны строчными буквами</i>	104	ctgcgcgctcgctcgtcactgaggccgcccgggcaagcccgggctcgggagaccttggctgcccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtggccaactccatcactaggggttctCATATGCAG GGTAATGGGGATCCTCTAGAGGCCGTCCGCCCTCGGCACCATCCTC ACGACACCCAAATATGGCGACGGGTGAGGAATGGTGGGGAGTTAT TTTTAGAGCGGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGTGTTGGCGCTC TAAAAATAACTCCCGGAGTTATTTTAGAGCGGAGGAATGGTGGGA CACCCAAATATGGCGACGGTTCCTCACCCGTCGCCATATTTGGGTG TCCGCCCTCGGCCGGGGCCGCATTCCTGGGGGCCGGGCGGTGCTCC CGCCCGCTCGATAAAAGGCTCCGGGGCCGGCGGCCGCCACGAG CTACCCGGAGGAGCGGGAGGCGCCAAGCGgAATTCGCCACCATGCT TTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCA GAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCAATGCCAGTTCAGCAAGTTT GGCAAGCAGCACATTGAGAACCTGTTTCAGTGACCTGCAGGATGGCA GAAGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGCTGACAGGCCAGAAGCTGC CTAAGAGAAGGGCAGCACAAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGA ACAAGGCCCTGAGAGTGTGTCAGAACAACAATGTGGACCTGGTCA ATATTGGCAGCACAGACATTGTGGATGGCAACCACAAGCTGACCCT GGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTGGCAAGTGAAGAATGTG ATGAAGAACATCATGGCTGGCTGCAGCAGACCAACTCTGAGAAG ATCCTGCTGAGCTGGGTGAGACAGAGCACCAGAAACTACCTCAAG TGAATGTGATCAACTTCACCACCTCTTGAGTGATGGACTGGCCCT GAATGCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTGACTGGAAC TCTGTTGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCT TCAACATTGCCAGATAACAGCTGGGAATTGAGAACTGCTGGACCC TGAGGATGTGGACACCACCTATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATG TACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCCCAGCAAGTGTCCATTG AGGCCATTCAAGAGGTTGAGATGCTGCCAGACCTCCTAAAGTGAC CAAAGAGGAACACTTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAG CAGATCACAGTGTCTCTGGCCCAGGGATATGAGAGAACAAGCAGC CCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCCTATG TGACCACATCTGACCCCACAAGAAGCCCATTTCCAAGCCAGCATCT GGAAGCCCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCT

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		GAAGTGAACCTGGATAGATACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTG TCCTGGCTGCTGTCTGCTGAGGATACTGCAGGCTCAGGGTGAAA TCAGCAATGATGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTCACACCCATGA GGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCACCAGGGCAGAGTGGGAAA TATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCACAGGCAAGCTGTCT GAGGATGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACCTGCTGAAC AGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGAGC AACCTGCACAGAGTGCTCATGGACCTGCAGAATCAGAACTGAAA GAACTGAATGACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAG ATGGAAGAGGAACCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGA CAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAGCAAGAG CAAGTCAGAGTGAACAGCCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATG AGTCCTCTGGGGATCATGCCACAGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAA GGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACATCTGTAGGTGGACAGAGGA TAGATGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGCTGAAGTGGCAGAGACTG ACAGAGGAACAGTGCCTGTTTTCTGCCTGGCTCTCTGAGAAAGAGG ATGCTGTCAACAAGATCCATACCACAGGCTTCAAGGATCAGAATGA GATGCTCAGCTCCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCTGACCTG GAAAAGAAAAGCAGTCCATGGGCAAGCTCTACAGCCTGAAGCAG GACCTGCTGTCTACCCTGAAGAACAAGTCTGTGACCCAGAAAAGT AGGCCTGGCTGGACAACCTTTGCTAGATGCTGGGACAACCTGGTGCA GAAGCTGGAAAAGTCTACAGCCCAGATCAGCCAGCAACCTGATCTT GCCCCTGGCCTGACCACAATTGGAGCCTCTCCAACACAGACTGTGA CCCTGGTTACCCAGCCAGTGGTCAACAAAGAGACAGCCATCAGCAA ACTGGAAATGCCAGCTCTCTGATGCTGGAAGTCCCCACACTGGAA AGGCTGCAAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTGGACCTGAAG CTGAGACAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTTGGG GACCTGCTCATTGATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAAAAGTGAAG CCCTGAGGGGAGAGATTGCCCTCTGAAAGAAAATGTGTCCCATGT GAATGACCTGGCCAGACAGCTGACCACACTGGGAATCCAGCTGAG CCCCTACAACCTGAGCACCTTGAGGACCTGAACACCAGGTGGAAG CTCCTCCAGGTGGCAGTGGAAAGATAGAGTCAGGCAGCTGCATGAG GCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGTCTACCT CTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCTAACAAGGTGCC CTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTTGGGATCACCCC AAGATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCAACAATGTCA GATTCAGTGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGGCTCCAGAA AGCTCTGTGCCTGGACCTGCTTTCCCTGAGTGCAGCTTGTGATGCC

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>TGGACCAGCACAACTCTGAAGCAGAATGACCAGCCTATGGACATCCT CCAGATCATCAACTGCCTCACCACCATCTATGATAGGCTGGAACAA GAGCACAACAATCTGGTCAATGTGCCCTGTGTGTGGACATGTGCC TGAATTGGCTGCTGAATGTGTATGACACAGGCAGAACAGGCAGGAT CAGAGTCCTGTCCTTCAAGACAGGCATCATCTCCCTGTGCAAAGCC CACTTGGAGGACAAGTACAGATACCTGTTCAAGCAAGTGGCCTCCA GCACAGGCTTTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCTGCTCCTGCATGA CAGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTGGCTTCTTTTGA GGCGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCC ATCATTGGCTTCAGATACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTATGATA TCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGTGGCAGGGTTGCCAAGGGCCACAA AATGCACTACCCCATGGTGAATACTGCACCCCAACAACCTCTGGG GAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGGTGCTGAAAACAAGTTCAGG ACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCCAAGATGGGCTACCTGCCTG TCCAGACAGTGCTTGAGGGTGACAACATGGAAACCCCTGTGACT GATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTGCCCTGCCTCAAGTCCACAG CTGTCCCATGATGACACCCACAGCAGAATTGAGCACTATGCCTCCA GACTGGCAGAGATGGAAAACAGCAATGGCAGCTACCTGAATGATA GCATCAGCCCAATGAGAGCATTGATGATGAGCATCTGCTGATCCA GCACTACTGTCAGTCCCTGAACCAGGACTCTCCACTGAGCCAGCCT AGAAGCCCTGCTCAGATCCTGATCAGCCTTGAGTCTGAGGAAAGGG GAGAGCTGGAAAGAATCCTGGCAGATCTTGAGGAAGAGAACAGAA ACCTGCAGGCAGAGTATGACAGGCTCAAACAGCAGCATGAGCACA AGGGACTGAGCCCTCTGCCTTCTCCTCCTGAAATGATGCCACCTCT CCACAGTCTCCAAGGTGATGACTCGAGAGGCCTAATAAAGAGCTCA GATGCATCGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCAGGGTAATG GGCTAGCTGCGGCCGCaggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgctcgtc gctcactgaggccgggcgaccaaggctcgccgacccccgggctttggccggcggcctcagtgagcgagc gagcgcgag</p>
<p>RGX-DYS7 (полная кассета, включая фланкирующие ITR, промотор Spс5-12 до поли(А) и промежуточные последовательно</p>	105	<p>ctgcgcgctcgcctcactgaggccgcccgggcaagcccgggctcgggacaccttggtcgccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatcactaggggttctCATATGCAG GGTAATGGGGATCCTCTAGAGGCCGTCCGCCCTCGGCACCATCCTC ACGACACCCAAATATGGCGACGGGTGAGGAATGGTGGGGAGTTAT TTTTAGAGCGGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGTGTTGGCGCTC TAAAATAACTCCCGGAGTTATTTTTAGAGCGGAGGAATGGTGGGA CACCCAAATATGGCGACGGTTCCTCACCCGTCGCCATATTTGGGTG TCCGCCCTCGGCCGGGGCCGCATTCCTGGGGGCCGGCGGTGCTCC CGCCCGCTCGATAAAAGGCTCCGGGGCCGGCGGGCCACGAG</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
<p>сти)</p> <p>4746 п.о.</p> <p><i>IIR</i> показаны строчными буквами</p>		<p>CTACCCGGAGGAGCGGGAGGCGCCAAGCGgAATTCGCCACCATGCT TTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCA GAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCAATGCCCAGTTCAGCAAGTTT GGCAAGCAGCACATTGAGAACCTGTTTCAGTGACCTGCAGGATGGCA GAAGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGC CTAAAGAGAAGGGCAGCACAAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGA ACAAGGCCCTGAGAGTGTGTCAGAACAACAATGTGGACCTGGTCA ATATTGGCAGCACAGACATTGTGGATGGCAACCACAAGCTGACCCT GGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTGGCAAGTGAAGAATGTG ATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACCAACTCTGAGAAG ATCCTGCTGAGCTGGGTGAGACAGAGCACCAGAACTACCCTCAAG TGAATGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGTGATGGACTGGCCCT GAATGCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTGACTGGAAC TCTGTTGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCCT TCAACATTGCCAGATAACCAGCTGGGAATTGAGAACTGCTGGACCC TGAGGATGTGGACACCACCTATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATG TACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCCCAGCAAGTGTCCATTG AGGCCATTCAAGAGGTTGAGATGCTGCCAGACCTCCTAAAGTGAC CAAAGAGGAACACTTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAG CAGATCACAGTGTCTCTGGCCCAGGGATATGAGAGAACAAGCAGC CCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCCTATG TGACCACATCTGACCCCACAAGAAGCCCATTTCCAAGCCAGCATCT GGAAGCCCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCT GAAGTGAACCTGGATAGATAACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTG TCCTGGCTGCTGTCTGCTGAGGATACTGCAGGCTCAGGGTGAAA TCAGCAATGATGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTCACACCCATGA GGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCACCAGGGCAGAGTGGGAAA TATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCACAGGCAAGCTGTCT GAGGATGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACCTGCTGAAC AGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGAGC AACCTGCACAGAGTGCTCATGGACCTGCAGAATCAGAACTGAAA GAACTGAATGACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAG ATGGAAGAGGAACCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGA CAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAGCAAGAG CAAGTCAGAGTGAACAGCCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATG AGTCCTCTGGGGATCATGCCACAGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAA GGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACATCTGTAGGTGGACAGAGGA TAGATGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGGAGATCAGCTATGTGCC</p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		AGCACCTACCTGACAGAGATCACCCATGTGTCTCAGGCCCTGCTGG AAGTGGAACAGCTGCTGAATGCCCTGACCTGTGTGCCAAGGACTT TGAGGACCTGTTCAAGCAAGAGGAAAGCCTGAAGAACATCAAGGA CAGCCTGCAGCAGTCCTCTGGCAGAATTGACATCATCCACAGCAAG AAAACAGCTGCCCTGCAGTCTGCCACACCTGTGGAAAGAGTGAAGC TGCAAGAGGCCCTGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGTGA ACAAGATGTACAAGGACAGGCAGGGCAGATTTGATAGAAGTGTGG AAAAGTGGAGAAGGTTCCACTATGACATCAAGATCTTCAACCAGTG GCTGACAGAGGCTGAGCAGTTCCTGAGAAAGACACAGATCCCTGA GAACTGGGAGCATGCCAAGTACAAGTGGTATCTGAAAGAACTGCA GGATGGCATTGGCCAGAGACAGACAGTTGTCAGAACCCTGAATGCC ACAGGGGAAGAGATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACAGATGCCAGC ATCCTGCAAGAGAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGAGATGGCAAGAA GTGTGCAAGCAGCTGTCTGACAGAAAGAAGAGGCTGGAAGAACAG AACTGGAAAGGCTGCAAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTG GACCTGAAGCTGAGACAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAG CCAGTTGGGGACCTGCTCATTGATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAA AAGTGAAAGCCCTGAGGGGAGAGATTGCCCTCTGAAAGAAAATG TGTCCATGTGAATGACCTGGCCAGACAGCTGACCACACTGGGAAT CCAGCTGAGCCCCTACAACCTGAGCACCCCTGAGGACCTGAACACC AGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTGGAAGATAGAGTCAGGCAG CTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTTC TGTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCCTAA CAAGGTGCCCTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTTGG GATCACCCCAAGATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCA ACAATGTCAGATTCAGTGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAG GCTCCAGAAAGCTCTGTGCCTGGACCTGCTTTCCTGAGTGCAGCTT GTGATGCCCTGGACCAGCACAATCTGAAGCAGAATGACCAGCCTAT GGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTCACCACCATCTATGATAGG CTGGAACAAGAGCACAACAATCTGGTCAATGTGCCCTGTGTGTGG ACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTATGACACAGGCAGAAC AGGCAGGATCAGAGTCCTGTCCTTCAAGACAGGCATCATCTCCCTG TGCAAAGCCCCTTGGAGGACAAGTACAGATACCTGTTCAAGCAAG TGGCCTCCAGCACAGGCTTTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCTGCT CCTGCATGACAGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTGGCT TCCTTTGGAGGCAGCAATATTGAGCCATCAGTCAGGTCCTGTTTTCA GTTTGCCAACAACAAGCCTGAGATTGAGGCTGCCCTGTTCTGGAC TGGATGAGACTTGAGCCTCAGAGCATGGTCTGGCTGCCTGTGCTTC

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p> ATAGAGTGGCTGCTGCTGAGACTGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCA ACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCATTGGCTTCAGATACAGATCCCT GAAGCACTTCAACTATGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGTGGC AGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGGAATACT GCACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGGT GCTGAAAAACAAGTTCAGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCC AGAATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACAGTGCTTGAGGGTGACAACA TGGAAACCCCTGTGACACTGATCAATTTCTGGCCAGTGGACTCTGC CCTGCCTCAAGTCCACAGCTGTCCCATGATGACACCCACAGCAGA ATTGAGCACTATGCCTCCAGACTGGCAGAGATGGAAAACAGCAAT GGCAGCTACCTGAATGATAGCATCAGCCCAATGAGAGCATTGATG ATGAGCATCTGCTGATCCAGCACTACTGTCAGTCCCTGAACCAGGA CTCTCCACTGAGCCAGCCTAGAAGCCCTGCTCAGATCCTGATCAGC CTTGAGTCTTGATGAGTCGACAGGCCTAATAAAGAGCTCAGATGCA TCGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGGCTAGCTGCGGCCGCagga acccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgctcgtcactgaggccgggagaccaaggctc cccgacgcccgggcttggccggggcctcagtgagcgagcgagcgcgag </p>
<p> RGX-DYS8 (полная кассета, включая фланкирующие ITR, промотор Spc5-12 до поли(A) и промежуточные последовательно сти) 4470 п.о. <i>ITR показаны строчными буквами</i> </p>	106	<p> ctgcgcgctcgtcgtcactgaggcccccgggcaagccccgggctcgggagaccttggtcgcccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatcactaggggttctCATATGCAG GGTAAATGGGATCCTCTAGAGGCCGTCCGCCCTCGGCACCATCCTC ACGACACCCAAATATGGCGACGGGTGAGGAATGGTGGGGAGTTAT TTTTAGAGCGGTGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGTGTTGGCGCTC TAAAAATAACTCCCGGGAGTTATTTTAGAGCGGAGGAATGGTGGA CACCCAAATATGGCGACGGTTCCTCACCCGTCGCCATATTTGGGTG TCCGCCCTCGGCCGGGGCCGCATTCCTGGGGGCCGGGCGGTGCTCC CGCCCGCTCGATAAAAGGCTCCGGGGCCGGCGGCGGCCACGAG CTACCCGGAGGAGCGGGAGGCGCCAAGCGgAATTCGCCACCATGCT TTGGTGGGAAGAGGTGGAAGATTGCTATGAGAGGGAAGATGTGCA GAAGAAAACCTTCACCAATGGGTCAATGCCAGTTCAGCAAGTTT GGCAAGCAGCACATTGAGAACCTGTTCACTGACCTGCAGGATGGCA GAAGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGC CTAAGAGAAGGGCAGCACAAGAGTGCATGCCCTGAACAATGTGA ACAAGGCCCTGAGAGTGTGTCAGAACAACAATGTGGACCTGGTCA ATATTGGCAGCACAGACATTGTGGATGGCAACCACAAGCTGACCCT GGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTGGCAAGTGAAGAATGTG ATGAAGAACATCATGGCTGGCCTGCAGCAGACCAACTCTGAGAAG ATCCTGCTGAGCTGGGTGAGACAGAGCACCAGAACTACCCCTCAAG TGAATGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGTGATGGACTGGCCCT </p>

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		GAATGCCCTGATCCACAGCCACAGACCTGACCTGTTTGACTGGAAC TCTGTTGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGAGACTGGAACATGCCT TCAACATTGCCAGATAACCAGCTGGGAATTGAGAAACTGCTGGACCC TGAGGATGTGGACACCACCTATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATG TACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCCCAGCAAGTGTCCATTG AGGCCATTCAAGAGGTTGAGATGCTGCCAGACCTCCTAAAGTGAC CAAAGAGGAACACTTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAG CAGATCACAGTGTCTCTGGCCCAGGGATATGAGAGAACAAGCAGC CCCAAGCCTAGGTTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCCTATG TGACCACATCTGACCCCACAAGAAGCCATTTCOAAGCCAGCATCT GGAAGCCCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAATCT GAAGTGAACCTGGATAGATAACCAGACAGCCCTGGAAGAAGTGCTG TCCTGGCTGCTGTCTGCTGAGGATACTGCAGGCTCAGGGTGAAA TCAGCAATGATGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTCACACCCATGA GGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCACCAGGGCAGAGTGGGAAA TATCCTGCAGCTGGGCTCCAAGCTGATTGGCACAGGCAAGCTGTCT GAGGATGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACCTGCTGAAC AGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGAGC AACCTGCACAGAGTGCTCATGGACCTGCAGAATCAGAACTGAAA GAACTGAATGACTGGCTGACCAAGACAGAAGAAAGGACTAGGAAG ATGGAAGAGGAACCTCTGGGACCAGACCTGGAAGATCTGAAAAGA CAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAAGAGGACCTTGAGCAAGAG CAAGTCAGAGTGAACAGCCTGACACACATGGTGGTGGTTGTGGATG AGTCCTCTGGGATCATGCCACAGCTGCTCTGGAAGAACAGCTGAA GGTGCTGGGAGACAGATGGGCCAACATCTGTAGGTGGACAGAGGA TAGATGGGTGCTGCTCCAGGACATTCTGGAGATCAGCTATGTGCC AGCACCTACCTGACAGAGATCACCCATGTGTCTCAGGCCCTGCTGG AAGTGGAACAGCTGCTGAATGCCCTGACCTGTGTGCCAAGGACTT TGAGGACCTGTTCAAGCAAGAGGAAAGCCTGAAGAACATCAAGGA CAGCCTGCAGCAGTCCTCTGGCAGAATTGACATCATCCACAGCAAG AAAACAGCTGCCCTGCAGTCTGCCACACCTGTGGAAAGAGTGAAGC TGCAAGAGGCCCTGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAAGTGA ACAAGATGTACAAGGACAGGCAGGGCAGATTTGATAGAAGTGTGG AAAAGTGGAGAAGGTTCCACTATGACATCAAGATCTTCAACCAGTG GCTGACAGAGGCTGAGCAGTTCCTGAGAAAGACACAGATCCCTGA GAACTGGGAGCATGCCAAGTACAAGTGGTATCTGAAAGAAGTGA GGATGGCATTGGCCAGAGACAGACAGTTGTGAGAACCCTGAATGCC ACAGGGGAAGAGATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACAGATGCCAGC

Структура	SEQ ID	Последовательность нуклеиновых кислот
		<p>ATCCTGCAAGAGAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGAGATGGCAAGAA GTGTGCAAGCAGCTGTCTGACAGAAAGAAGAGGCTGGAAGAACAG ACACTGGAAAGGCTGCAAGAACTTCAAGAGGCCACAGATGAGCTG GACCTGAAGCTGAGACAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAG CCAGTTGGGGACCTGCTCATTGATAGCCTGCAGGACCATCTGGAAA AAGTGAAAGCCCTGAGGGGAGAGATTGCCCTCTGAAAGAAAATG TGTCCCATGTGAATGACCTGGCCAGACAGCTGACCACACTGGGAAT CCAGCTGAGCCCCTACAACCTGAGCACCTTGAGGACCTGAACACC AGGTGGAAGCTCCTCCAGGTGGCAGTGGAAGATAGAGTCAGGCAG CTGCATGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTTC TGTCTACCTCTGTGCAAGGCCCTGGGAGAGAGCTATCTCTCCTAA CAAGGTGCCCTACTACATCAACCATGAGACACAGACCACCTGTTGG GATCACCCCAAGATGACAGAGCTGTACCAGAGTCTGGCAGACCTCA ACAATGTCAGATTCAGTGCCTACAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAG GCTCCAGAAAGCTCTGTGCCTGGACCTGCTTTCCTGAGTGCAGCTT GTGATGCCCTGGACCAGCACAATCTGAAGCAGAATGACCAGCCTAT GGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTCACCACCATCTATGATAGG CTGGAACAAGAGCACAACAATCTGGTCAATGTGCCCTGTGTGTGG ACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTATGACACAGGCAGAAC AGGCAGGATCAGAGTCCTGTCTTCAAGACAGGCATCATCTCCCTG TGCAAAGCCCCTTGAGGACAAGTACAGATACCTGTTCAAGCAAG TGGCCTCCAGCACAGGCTTTTGTGACCAGAGAAGGCTGGGCCTGCT CCTGCATGACAGCATTAGATCCCTAGACAGCTGGGAGAAGTGGCT TCCTTTGGAGGCAGCAATATTGAGCCATCAGTCAGGTCCTGTTTTCA GTTTGCCAACAACAAGCCTGAGATTGAGGCTGCCCTGTTCTGAC TGGATGAGACTTGAGCCTCAGAGCATGGTCTGGCTGCCTGTGCTTC ATAGAGTGGCTGCTGCTGAGACTGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCA ACATCTGCAAAGAGTGCCCATCATTGGCTTCAGATACAGATCCCT GAAGCACTTCAACTATGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTTAGTGGC AGGGTTGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGGAACT GCACCCCAACAACCTCTGGGGAAGATGTTAGAGACTTTGCCAAGGT GCTGAAAAACAAGTTCAGGACCAAGAGATACTTTGCTAAGCACCCC AGAATGGGCTACCTGCCTGTCCAGACAGTGCTTGAGGGTGACAACA TGGAAACCTGATGAGTCGACAGGCCTAATAAAGAGCTCAGATGCAT CGATCAGAGTGTGTTGGTTTTTGTGTGGCTAGCTGCGGCCGCaggaac ccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggagccaaaggtcgcc cgacgcccgggctttgccggggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag</p>

5.3.5 Способы получения частиц гAAV

[00137] Другой аспект настоящего изобретения включает получение описанных в данном документе молекул. В некоторых вариантах осуществления молекулу согласно изобретению получают путем обеспечения нуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из молекул капсидного белка по данному изобретению; и использование системы упаковывающих клеток для получения соответствующих частиц гAAV с капсидными оболочками, состоящими из капсидного белка. Такие капсидные белки описаны в разделе 5.3.4 выше. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты кодирует последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95%, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9%, идентичности с последовательностью молекулы капсидного белка, описанной в данном документе, и сохраняет (или по существу сохраняет) биологическую функцию капсидного белка и встроенного пептида из гетерологичного белка или его домена. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует последовательность, которая имеет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95%, предпочтительно 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичности с последовательностью капсидного белка AAV8 при сохранении (или существенном сохранении) биологической функции капсидного белка AAV8 и встроенного пептида.

[00138] Капсидный белок, оболочка и частицы гAAV могут быть получены способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор, позволяющий упаковать его в вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном дополнительно содержит ген сар и/или ген гер для экспрессии и сплайсинга гена сар. В вариантах осуществления гены сар и гер обеспечиваются упаковывающей клеткой и не присутствуют в вирусном геноме.

[00139] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая сконструированный капсидный белок, клонируется в плазмиду AAV Rep-Cap вместо существующего капсидного гена. При совместном введении в клетки-хозяева эта плазида помогает упаковать геном гAAV в сконструированный капсидный белок в качестве оболочки капсида. Упаковывающие клетки могут быть клетками любого типа, обладающими генами, необходимыми для стимуляции репликации генома AAV, сборки капсида и упаковки.

[00140] В данной области техники известны многочисленные системы на основе культур клеток для получения частиц гAAV, любая из которых может быть использована для практического применения описанного в данном документе способа. Системы на основе культур клеток включают трансфекцию, продукцию стабильных линий клеток и системы продукции инфекционных гибридных вирусов, которые включают, но не ограничиваются ими, гибриды аденовирус-AAV, гибриды герпесвирус-AAV и гибриды бакуловирус-AAV. Для культур-продуцентов гAAV для получения вирусных частиц гAAV необходимы: (1) подходящие клетки-хозяева, включая, например, линии клеток человека, линии клеток млекопитающих или линии клеток насекомых; (2) подходящая функция хелперного вируса, обеспечиваемая аденовирусом дикого типа или мутантным аденовирусом (таким как чувствительный к температуре аденовирус), вирусом герпеса, бакуловирусом или плазмидной конструкцией, обеспечивающей хелперные функции; (3) гены гер и сар AAV и генные продукты; (4) трансген (такой как терапевтический трансген), фланкированный последовательностями ITR AAV и необязательно регуляторными элементами; и (5) подходящие среды и компоненты среды (питательные вещества) для поддержки роста/выживаемости клеток и продукции гAAV.

[00141] Неограничивающие примеры клеток-хозяев включают: A549, WENI, 10T1/2, BHK, MDCK, COS1, COS7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, W138, HeLa, HEK293 и их производные (клетки HEK293T, клетки HEK293F), Saos, C2C12, L, HT1080, HepG2, первичные фибробласты, гепатоциты, миобластные клетки, клетки CHO или клетки, полученные из CHO, или линии клеток, полученные от насекомых, такие как SF-9 (например, в случае систем продукции бакуловируса). Для обзора см. Aronte-Ubillus et al., 2018, Appl. Microbiol. Biotechnol. 102:1045-1054, который полностью включен в данный документ посредством ссылки в отношении производственных технологий.

[00142] В одном аспекте в данном документе предложен способ получения частиц гAAV, включающий (a) получение культуры клеток, содержащей клетку насекомого; (b) введения в клетку одного или нескольких бакуловирусных векторов, кодирующих по меньшей мере один из: i. генома гAAV, подлежащей упаковке, ii. белка гер AAV, достаточного для упаковки, и iii. белка сар AAV, достаточного для упаковки; (c) добавление в культуру клеток достаточного количества питательных веществ и поддержание клеточной культуры в условиях, позволяющих продуцировать частицы гAAV. В некоторых вариантах осуществления способ включает применение первого бакуловирусного вектора, кодирующего гены гер и сар, и второго бакуловирусного вектора, кодирующего геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления способ включает применение бакуловируса, кодирующего геном гAAV, и клетки насекомого, экспрессирующей гены гер и сар. В некоторых вариантах осуществления способ включает применение бакуловирусного вектора, кодирующего гены гер и сар, и геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления клетка насекомого представляет собой клетку Sf-9. В некоторых вариантах осуществления клетка насекомого представляет собой клетку Sf-9, содержащую один или более стабильно интегрированных гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих гены гер и сар.

[00143] В некоторых вариантах осуществления в описанном в данном способе используется система продукции бакуловируса. В некоторых вариантах осуществления в бакуловирусной системе продукции используется первый бакуловирус, кодирующий гены гер и сар, и второй бакуловирус, кодирующий геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления в бакуловирусной системе продукции используется бакуловирус, кодирующий геном гAAV, и клетку-хозяина, экспрессирующую гены гер и сар. В некоторых вариантах осуществления в бакуловирусной системе продукции используется бакуловирус, кодирующий гены гер и сар, и геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления в бакуловирусной системе продукции используются клетки насекомых, такие как клетки Sf-9.

[00144] Специалисту в данной области техники известны многочисленные способы, с помощью которых гены гер и сар AAV, хелперные гены AAV (например, ген аденовируса E1a, ген E1b, ген E4, ген E2a и ген VA) и геномы гAAV (содержащие один или более генов) представляющие интерес, фланкированные инвертированными концевыми повторами (ITR), могут быть введены в клетки для получения или упаковки гAAV. Фраза «хелперные функции аденовируса» относится к ряду генов вируса-хелпера, экспрессируемых в клетке (в виде РНК или белка), так что AAV эффективно растет в клетке. Специалисту в данной области техники понятно, что вирусы-хелперы, включая аденовирус и вирус простого герпеса (HSV), способствуют репликации AAV, и были идентифицированы определенные гены, которые обеспечивают основные функции, например, хелпер может индуцировать изменения в клеточной среде, которые облегчают такую экспрессию и репликацию гена AAV. В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в данном документе, гены гер и сар AAV, хелперные гены и геномы гAAV вводят в клетки путем трансфекции одного или более

плазмидных векторов, кодирующих гены гер и сар AAV, хелперные гены и геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в данном документе, гены гер и сар AAV, хелперные гены и геномы гAAV могут быть введены в клетки путем трансдукции вирусными векторами, например, векторами гHSV, кодирующими гены гер и сар AAV, гены-хелперы и геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в данном документе, один или более генов гер и сар AAV, хелперных генов и геномов гAAV вводят в клетки путем трансдукции вектором гHSV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует гены гер и сар AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует хелперные гены. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует гены гер и сар AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует хелперные гены и геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует хелперные гены и гены гер и сар AAV.

[00145] В одном аспекте в данном документе предложен способ получения частиц гAAV, включающий (a) получение культуры клеток, содержащей клетку-хозяина; (b) введение в клетку одного или более векторов гHSV, кодирующих по меньшей мере один из: i. генома гAAV, подлежащего упаковке, ii. хелперной функции, необходимой для упаковки частиц гAAV, iii. белка гер AAV, достаточного для упаковки, и iv. белка сар AAV, достаточного для упаковки; (c) добавление в культуру клеток достаточного количества питательных веществ и поддержание культуры клеток в условиях, позволяющих продуцировать частицы гAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует гены гер и сар AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует хелперные функции. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV содержит один или более эндогенных генов, кодирующих хелперные функции. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV содержит один или более гетерогенных генов, кодирующих хелперные функции. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует гены гер и сар AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует хелперные функции и геном гAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гHSV кодирует хелперные функции и гены гер и сар AAV. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более стабильно интегрированных гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих гены гер и сар.

[00146] В одном аспекте в данном документе предложен способ получения частиц гAAV, включающий (a) получение культуры клеток, содержащей клетку млекопитающего; (b) введение в клетку одного или более полинуклеотидов, кодирующих по меньшей мере один из: i. генома гAAV, подлежащего упаковке, ii. хелперной функции, необходимой для упаковки частиц гAAV, iii. белка гер AAV, достаточного для упаковки, и iv. белка сар AAV, достаточного для упаковки; (c) добавление в культуру клеток достаточного количества питательных веществ и поддержание культуры клеток в условиях, позволяющих продуцировать частицы гAAV. В некоторых вариантах осуществления хелперные функции кодируются генами аденовируса. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего содержит один или более стабильно интегрированных гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих гены гер и сар.

[00147] Методы молекулярной биологии для разработки плазмидных или вирусных векторов, кодирующих гены гер и сар AAV, хелперные гены и/или геном гAAV, широко известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления гены гер и сар AAV кодируются одним плазмидным вектором. В некоторых вариантах осуществления хелперные гены AAV (например, ген аденовируса E1a, ген E1b, ген E4, ген E2a и ген VA) кодируются одним плазмидным вектором. В некоторых вариантах осуществления ген E1a

или ген E1b стабильно экспрессируется клеткой-хозяином, а остальные хелперные гены AAV вводятся в клетку путем трансфекции одним вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления ген E1a и ген E1b стабильно экспрессируются клеткой-хозяином, а ген E4, ген E2a и ген VA вводят в клетку путем трансфекции одним плазмидным вектором. В некоторых вариантах осуществления один или более хелперных генов стабильно экспрессируются клеткой-хозяином, и один или более хелперных генов вводят в клетку путем трансфекции одним плазмидным вектором. В некоторых вариантах осуществления хелперные гены стабильно экспрессируются клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления гены гер и сар AAV кодируются одним вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления хелперные гены AAV (например, ген аденовируса E1a, ген E1b, ген E4, ген E2a и ген VA) кодируются одним вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления ген E1a или ген E1b стабильно экспрессируется клеткой-хозяином, а остальные хелперные гены AAV вводятся в клетку путем трансфекции одним вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления ген E1a и ген E1b стабильно экспрессируются клеткой-хозяином, а ген E4, ген E2a и ген VA вводят в клетку путем трансфекции одним вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления один или более хелперных генов стабильно экспрессируются клеткой-хозяином, и один или более хелперных генов вводят в клетку путем трансфекции одним вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления гены гер и сар AAV, хелперные функции аденовируса, необходимые для упаковки, и геном гAAV, подлежащий упаковке, вводят в клетки путем трансфекции одним или более полинуклеотидами, например, векторами. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает трансфекцию клеток смесью трех полинуклеотидов: один кодирует гены сар и гер, один кодирует хелперные функции аденовируса, необходимые для упаковки (например, ген аденовируса E1a, ген E1b, ген E4, ген E2a, и ген VA), и один, кодирующий геном гAAV, подлежащий упаковке. В некоторых вариантах осуществления ген сар AAV представляет собой ген сар AAV8 или AAV9. В некоторых вариантах осуществления ген сар AAV представляет собой ген сар AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.PHB или AAV.7m8. В некоторых вариантах осуществления ген сар AAV кодирует капсидный белок с высокой степенью гомологии последовательности к AAV8 или AAV9, такой как AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1 и AAV.hu37. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий геном гAAV, подлежащий упаковке, содержит представляющий интерес ген, фланкированный ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR AAV происходят из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16, или других серотипов AAV.

[00148] Любая комбинация векторов может быть использована для введения генов гер и сар AAV, хелперных генов AAV и генома гAAV в клетку, в которой должны быть получены или упакованы частицы гAAV. В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в данном документе, могут использоваться первый плазмидный вектор, кодирующий геном гAAV, содержащий представляющий интерес ген, фланкированный инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV, второй вектор, кодирующий гены гер и сар AAV, и третий вектор, кодирующий хелперные гены. В некоторых вариантах осуществления смесь трех векторов совместно трансфицируют в клетку. В некоторых вариантах осуществления используется

комбинация трансфекции и инфекции с использованием как плазмидных векторов, так и вирусных векторов.

[00149] В некоторых вариантах осуществления один или более генов *rep* и *cap*, а также хелперных генов AAV конститутивно экспрессируются клетками, и их не нужно трансфицировать или трансдуцировать в клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка конститутивно экспрессирует гены *rep* и/или *cap*. В некоторых вариантах осуществления клетка конститутивно экспрессирует один или более хелперных генов AAV. В некоторых вариантах осуществления клетка конститутивно экспрессирует E1a. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит стабильный трансген, кодирующий геном гAAV.

[00150] В некоторых вариантах осуществления гены *rep*, *cap* и хелперные гены AAV (например, ген E1a, ген E1b, ген E4, ген E2a или ген VA) могут относиться к любому серотипу AAV. Точно так же ITR AAV также могут относиться к любому серотипу AAV. Например, в некоторых вариантах осуществления ITR AAV происходят из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 и AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16 или других серотипов AAV (например, гибридного серотипа, содержащего последовательности более чем одного серотипа). В некоторых вариантах осуществления ген *cap* AAV происходит из гена *cap* AAV8 или AAV9. В некоторых вариантах осуществления ген *cap* AAV происходит из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 и AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, AAV.HSC16, AAV.rh74, AAV.hu31, AAV.hu32, или AAV.hu37 или других серотипов AAV (например, гибридного серотипа, содержащего последовательности более чем одного серотипа). В некоторых вариантах осуществления гены *rep* и *cap* AAV для продукции частицы гAAV происходят из разных серотипов. Например, ген *rep* происходит из AAV2, тогда как ген *cap* происходит из AAV8. В еще одном примере ген *rep* происходит из AAV2, тогда как ген *cap* происходит из AAV9.

[00151] В некоторых вариантах осуществления ген *rep* происходит из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 и AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16 или других серотипов AAV (например, гибридного серотипа, содержащего последовательности более чем одного серотипа). В других вариантах осуществления гены *rep* и *cap* происходят из одного и того же серотипа. В других вариантах осуществления гены *rep* и *cap* происходят из одного и того же серотипа, и ген *rep* содержит по меньшей мере один модифицированный белковый домен или модифицированный промоторный домен. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный домен содержит нуклеотидную последовательность серотипа, отличную от серотипа капсида. Модифицированный домен в пределах гена *rep* может представлять собой гибридную нуклеотидную последовательность, состоящую из фрагментов разных серотипов.

[00152] Гибридные гены *rep* обеспечивают улучшенную эффективность упаковки частиц гAAV, включая упаковку вирусного генома, содержащего трансген микродистрофина размером более 4 т.п.н., более 4,1 т.п.н., более 4,2 т.п.н., более 4,3 т.п.н., более 4,4 т.п.н., более 4,5 т.п.н., или более 4,6 т.п.н. Гены *rep* AAV состоят из последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют неструктурные белки, необходимые для репликации и продукции вируса. Транскрипция гена *rep* инициируется с промоторов p5 или p19 с образованием двух больших (Rep78 и Rep68) и двух малых (Rep52 и Rep40) неструктурных белков Rep, соответственно. Кроме того, домен Rep78/68 содержит ДНК-связывающий домен, который распознает специфические последовательности ITR в пределах ITR. Все четыре белка Rep имеют общие геликазные и АТФазные домены, которые участвуют в репликации генома и/или инкапсуляции (Maurer AC, 2020, DOI: 10.1089/hum.2020.069). Транскрипция гена *cap* инициируется с промотора p40, последовательность которого находится в пределах С-конца гена *rep*, и было высказано предположение, что другие элементы гена *rep* могут индуцировать активность промотора p40. Домен промотора p40 включает элементы связывания факторов транскрипции EF1A, MLTF и ATF, элементы связывания Fos/Jun (AP-1), Sp1-подобные элементы (Sp1 и GGT) и элемент ТАТА (Pereira and Muzyczka, Journal of Virology, June 1997, 71(6):4300–4309). В некоторых вариантах осуществления ген *rep* содержит модифицированный промотор p40. В некоторых вариантах осуществления промотор p40 модифицирован в любом одном или более элементах связывания EF1A, элементе связывания MLTF, элементе связывания ATF, элементах связывания Fos/Jun (AP-1), Sp1-подобных элементах (Sp1 или GGT) или элементе ТАТА. В других вариантах осуществления ген *rep* относится к серотипам 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, rh8, rh10, rh20, rh39, rh.74, RHM4-1, или hu37, и часть или элемент домена промотора p40 модифицированы до серотипа 2. В других вариантах осуществления ген *rep* относится к серотипу 8 или 9, а часть или элемент домена промотора p40 модифицированы до серотипа 2.

[00153] ITR содержат комплементарные последовательности А и А', комплементарные последовательности В и В' и комплементарные последовательности С и С'; а последовательность D граничит с геномом одноцепочечной ДНК. Комплементарные последовательности ITR образуют шпильчатые структуры путем самоотжига (Berns KI. The Unusual Properties of the AAV Inverted Terminal Repeat. *Hum Gene Ther* 2020). Последовательность D содержит элемент связывания Rep (RBE) и сайт концевой разрешения (TRS), которые вместе составляют точку начала репликации AAV. ITR также необходимы в качестве сигналов упаковки для инкапсуляции генома после репликации. В некоторых вариантах осуществления последовательности ITR и гены *cap* происходят из одного и того же серотипа, за исключением того, что одна или более из комплементарных последовательностей А и А', комплементарных последовательностей В и В', комплементарных последовательностей С и С', или последовательности D могут быть модифицированы, чтобы содержать последовательности другого серотипа, отличного от капсида. В некоторых вариантах осуществления модифицированные последовательности ITR происходят из одного и того же серотипа, что и ген *rep*. В других вариантах осуществления последовательности ITR и гены *cap* происходят из разных серотипов, за исключением того, что одна или более последовательностей ITR выбраны из комплементарных последовательностей А и А', комплементарных последовательностей В и В', комплементарных последовательностей С и С' или последовательности D относятся к тому же серотипу, что и капсид (ген *cap*), а одна или более последовательностей ITR происходят из одного и того же серотипа, что и ген *rep*.

[00154] В некоторых вариантах осуществления гены *rep* и *cap* происходят из одного и того же серотипа, а ген *rep* содержит модифицированный домен Rep78, ДНК-связывающий домен, эндонуклеазный домен,

АТФазный домен, геликазный домен, домен промотора p5, домен Rep68, домен промотора p5, домен Rep52, домен промотора p19, домен Rep40 или домен промотора p40. В других вариантах осуществления гены *rep* и *cap* происходят из одного и того же серотипа, а ген *rep* содержит по меньшей мере один белковый домен или домен промотора из другого серотипа. В одном варианте осуществления гААV содержит трансген, фланкированный последовательностями ITR AAV2, *cap* AAV8 и гибридный *rep* AAV2/8. В другом варианте осуществления *rep* AAV2/8 содержит *rep* серотипа 8, за исключением домена промотора p40 или его части, происходящих из *rep* серотипа 2. В других вариантах осуществления *rep* AAV2/8 содержит *rep* серотипа 2, за исключением домена промотора p40 или его части, происходящих из *rep* серотипа 8. В некоторых вариантах осуществления для конструирования гибридной плазмиды *rep/cap* можно использовать более двух серотипов.

[00155] Любой подходящий способ, известный в данной области техники, может быть использован для трансфекции клетки, может быть использован для получения частиц гААV в соответствии с описанным в данном документе способом. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает трансфекцию клетки с использованием метода химической трансфекции. В некоторых вариантах осуществления в методе химической трансфекции используют фосфат кальция, высокоразветвленные органические соединения (дендримеры), катионные полимеры (например, ДЭАЭ-декстран или полиэтиленимин (ПЭИ)), липофекцию. В некоторых вариантах осуществления в методе химической трансфекции используются катионные полимеры (например, ДЭАЭ-декстран или полиэтиленимин (ПЭИ)). В некоторых вариантах осуществления в методе химической трансфекции используется полиэтиленимин (ПЭИ). В некоторых вариантах осуществления в методе химической трансфекции используется ДЭАЭ-декстран. В некоторых вариантах осуществления в методе химической трансфекции используется фосфат кальция.

[00156] Стандартные способы могут применяться для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и тканевой культуры и трансформации (например, электропорация, липофекция). Методики ферментативных реакций и очищения могут осуществляться в соответствии с указаниями производителя или как обычно используется в данной области, или как описано в данном документе. Приведенные выше методики и процедуры могут обычно осуществляться в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области, и как описано в различных общих и более конкретных справочных материалах, которые указаны и обсуждены в данном описании. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2-е изд., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y. (1989)), которая включена в данный документ посредством ссылки для любых целей. Если не указаны конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с лабораторными процедурами и методами аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, описанных в данном документе, хорошо известна и широко используется в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, составления и доставки, а также лечения пациентов можно использовать стандартные методы.

[00157] Последовательности нуклеиновых кислот вирусных векторов на основе ААV и способы получения рекомбинантных ААV и капсидов ААV описаны, например, в US 7282199; US 7790449; US 8318480; US 8962332; и PCT/EP2014/076466, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[00158] В предпочтительных вариантах осуществления гААV обеспечивают векторы доставки трансгена,

которые можно использовать в терапевтических и профилактических целях, как более подробно обсуждается ниже.

5.4. Терапевтическая полезность

[00159] Предложены способы анализа конструкций, включая рекомбинантные векторы для генной терапии, кодирующие микродистрофины, как описано в данном документе, на терапевтическую эффективность. Способы включают тесты как *in vitro*, так и *in vivo* на животных моделях, как описано в данном документе, или с использованием любых других способов, известных в данной области техники, для тестирования активности и эффективности микродистрофинов.

5.4.1 Анализы *in vitro*

5.4.1.1 Инфекционная система *in vitro* для мышечных клеток

[00160] Предложены способы тестирования инфективности рекомбинантного вектора, описанного в данном документе, например, частиц гAAV. Например, инфективность рекомбинантных векторов для генной терапии в мышечных клетках можно тестировать на миобластах C2C12, как описано в **Примере 2** в данном документе. Можно использовать несколько линий клеток мышц или сердца, включая, помимо прочего, T0034 (человек), L6 (крыса), MM14 (мышь), P19 (мышь), G-7 (мышь), G-8 (мышь), QM7 (перепел), H9c2(2-1) (крыса), Hs 74.Ht (человек) и Hs 171.Ht (человек). Количество копий вектора можно оценить с использованием методов полимеразной цепной реакции, а уровень экспрессии микродистрофина можно проверить путем измерения уровней мРНК микродистрофина в клетках.

5.4.2 Животные модели

[00161] Эффективность вирусного вектора, содержащего трансген, кодирующий микродистрофин, как описано в данном документе, можно проверить путем введения животной модели для замены мутировавшего дистрофина, например, с использованием модели мыши *mdx* и/или золотистого ретривера с мышечной дистрофией (GRMD) и для оценки биораспределения, экспрессии и терапевтического эффекта экспрессии трансгена. Терапевтический эффект можно оценить, например, путем оценки изменения мышечной силы у животного, получающего трансген микродистрофина. Животные модели с использованием более крупных млекопитающих, а также позвоночных и беспозвоночных, не относящихся к млекопитающим, также можно использовать для оценки доклинической терапевтической эффективности вектора, описанного в данном документе. Соответственно, предложены композиции и способы для терапевтического введения, включающие дозу кодирующего микродистрофин вектора, описанного в данном документе, в количестве, которое продемонстрировало свою эффективность в соответствии со способами оценки терапевтической эффективности, описанными в данном документе.

5.4.2.1 Мышиные модели

[00162] Эффективность векторов генной терапии можно оценить на мышинных моделях МДД. Модель мыши *mdx* (Yucel, N., et al, Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it, Regenerative Medicine volume 3, Article number: 4 (2018)), несет нонсенс-мутацию в экзоне 23, что приводит к кодону ранней терминации и укороченному белку (*mdx*). У мышей *mdx* уровень активности пируваткиназы в крови в 3 раза выше, чем у контрольных однопометников. Как и при МДД человека, скелетные мышцы с *mdx* демонстрируют активный некроз миофибрилл, клеточную инфильтрацию, широкий диапазон размеров миофибрилл и многочисленные регенерирующие миофибриллы с центральным ядром. Этот фенотип усиливается в диафрагме, которая подвергается прогрессирующей дегенерации и потере миофибрилл, что

приводит к примерно 5-кратному снижению изометрической силы мышц. Пик некроза и регенерации мышц задних конечностей приходится на 3-4-недельный возраст, но после этого наблюдается плато. У мышей *mdx* и мышей *mdx*, скрещенных с другими мышами (например, DBA/2J), наблюдается умеренное, но значительное снижение фракции выброса левого желудочка сердца (Van Westering, *Molecules* 2015, 20, 8823-8855). Таких мышей в модели МДД с функциональными дефектами сердца можно использовать для оценки кардиопротекторных эффектов или улучшения или поддержания сердечной функции, или ослабления сердечной дисфункции при помощи векторов для генной терапии, описанных в данном документе. В **примере 3** подробно описано применение модели мыши *mdx* для оценки векторов генной терапии, кодирующих микродистрофины.

[00163] Дополнительные модели мышей *mdx*: было создано несколько альтернативных версий с разным генетическим фоном, включая линии *mdx2cv*, *mdx3cv*, *mdx4cv*, и *mdx5cv* (генетический фон C57BL/6). Эти модели были созданы путем обработки мышей химическим мутагеном N-этил-N-нитрозомочевины. Каждый штамм несет свою точковую мутацию. В целом, существует несколько различий в представлении фенотипов заболевания у моделей *mdxcv* по сравнению с мышами *mdx*. Дополнительные мышинные модели были созданы путем скрещивания линии *mdx* с различными мышинными моделями с нокаутом (например, *MyoD1^{-/-}*, *α -интегрин^{7^{-/-}}*, *α -дистробревин^{-/-}*, и *атрофин^{-/-}*). Все модели мышей, которые в настоящее время используются для изучения МДД, были подробно описаны Yucel, N., et al, Humanizing the *mdx* mouse model of DMD: the long and the short of it, *nprj Regenerative Medicine*, том 3, номер статьи: 4 (2018), которая включена в данный документ посредством ссылки.

5.4.2.2 Собачьи

[00164] Большинство исследований на собаках проводятся на модели золотистого ретривера с мышечной дистрофией (GRMD) (Korneygay, J.N., et al, The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle*. 2017; 7: 9, которая полностью включена посредством ссылки). Собаки с GRMD страдают прогрессирующим смертельным заболеванием с фенотипами скелетных и сердечных мышц и избирательным поражением мышц - тяжелый фенотип, который более точно отражает фенотип МДД. Собаки GRMD несут изменение одного нуклеотида, которое приводит к пропуску экзона и образованию транскрипта МДД вне рамки считывания. Фенотипические признаки у собак включают повышение уровня СК в сыворотке, CRD на ЭМГ и гистопатологические признаки некроза и регенерации сгруппированных мышечных волокон. Фенотипическая изменчивость часто наблюдается при GRMD, как и у людей. У собак с GRMD развивается парадоксальная мышечная гипертрофия, которая, по-видимому, играет роль в фенотипе больных собак, при этом общими признаками являются скованность при ходьбе, уменьшение амплитуды движения в суставах и тризм. Объективные биомаркеры для оценки прогрессирования заболевания включают тетаническое сокращение, угол большеберцово-тарзального сустава, % уменьшения или ослабления эксцентрического сокращения, максимальный угол сгибания бедра, угол наклона таза, окружность краниальной части портняжной мышцы и вес четырехглавой мышцы бедра.

5.5. Способы лечения

[00165] Предложены способы лечения человека от любого заболевания мышечной дистрофией, которое можно лечить путем введения функционального дистрофина. МДД является наиболее распространенным из таких заболеваний, но векторы генной терапии, которые экспрессируют микродистрофин, представленные в данном документе, можно вводить для лечения мышечной дистрофии Беккера (МДБ), миотонической

мышечной дистрофии (болезни Штейнерта), плече-лопаточно-лицевой дистрофии (ЛЛПД), тазово-плечевой мышечной дистрофии, X-сцепленной дилатационной кардиомиопатии или окулофарингеальной мышечной дистрофии. Микродистрофин по настоящему изобретению может быть любым микродистрофином, описанным в данном документе, включая те, которые имеют домены в порядке от N-конца к C-концу ABD-N1-R1-R2-R3-N3-R24-N4-CR, ABD-N1-R1-R2-R3-N3-R24-N4-CR-CT, ABD-N1-R1-R2-R16-R17-R24-N4-CR, или ABD-N1-R1-R2-R16-R17-R24-N4-CR-CT, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, N1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R3 представляет собой область спектрина 3 дистрофина, N3 представляет собой область шарнира 3, R16 представляет собой область спектрина 16 дистрофина, R17 представляет собой область спектрина 16 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина, а CT представляет собой по меньшей мере часть C-концевой области дистрофина, содержащую сайт связывания $\alpha 1$ -синтрофина и/или сайт связывания α -дистробревина. В вариантах осуществления микродистрофин имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 79, 91, 92, или 93. Векторы, кодирующие микродистрофин, включают векторы, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 20, 21, 81, 101, 102 или 103, в определенных вариантах осуществления, функционально связанные с регуляторными элементами для конститутивной, специфической для мышц (включая скелетные, гладкие мышцы и сердечную мышцу) экспрессии, или специфической для ЦНС экспрессии, и другими регуляторными элементами, такими как поли(A)-сайты. Такие нуклеиновые кислоты могут находиться в контексте генома гAAV, например, фланкированные последовательностями ITR, в частности, последовательностями ITR AAV2. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции включают введение нуждающемуся в этом субъекту гAAV, содержащего конструкцию, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 53, 54, 55, 56, 82, 104, 105 или 106. В вариантах осуществления у пациента был диагностирован и/или имеется симптом(-ы), связанный с МДД. Рекombинантные векторы, используемые для доставки трансгена, кодирующего микродистрофин, описаны в разделе 5.3.4.1. Такие векторы должны обладать тропизмом к мышечным клеткам человека (включая скелетные мышцы, гладкие мышцы и/или сердечную мышцу) и могут включать нереплицирующиеся гAAV, особенно те, которые несут капсид AAV8. Рекombинантные векторы, такие как те, что показаны на **Фиг. 1А** и **Фиг. 22**, можно вводить любым способом, чтобы рекombинантный вектор проникал в мышечную ткань или ЦНС, предпочтительно путем введения рекombинантного вектора в кровотоки.

[00166] Субъекты, которым проводят такую генную терапию, могут быть теми, кто реагирует на опосредованную генной терапией доставку микродистрофина в мышцы. В конкретных вариантах осуществления способы включают лечение пациентов, у которых была диагностирована МДД или другая мышечная дистрофия, такая как мышечная дистрофия Беккера (МДБ), миотоническая мышечная дистрофия (болезнь Штейнерта), плече-лопаточно-лицевой дистрофия (ЛЛПД), тазово-плечевая мышечная дистрофия, X-сцепленная дилатационная кардиомиопатия или окулофарингеальная мышечная дистрофия, или имеют один или более симптомов, связанных с ними, и идентифицированы как чувствительные к лечению микродистрофином, или считаются хорошими кандидатами для терапии с генно-опосредованной доставкой микродистрофина. В конкретных вариантах осуществления пациентов ранее лечили синтетической версией дистрофина, и было обнаружено, что они реагируют на одну или более синтетических версий дистрофина.

Для определения реактивности синтетическая версия дистрофина (например, полученная в культуре клеток человека, в биореакторах и т. д.) может быть введена непосредственно субъекту.

[00167] Терапевтически эффективные дозы любого такого рекомбинантного вектора следует вводить любым способом, чтобы рекомбинантный вектор проникал в мышцу (например, скелетную мышцу или сердечную мышцу), предпочтительно путем введения рекомбинантного вектора в кровоток. В конкретных вариантах осуществления вектор вводят подкожно, внутримышечно или внутривенно. Внутримышечное, подкожное или внутривенное введение должно приводить к экспрессии растворимого продукта трансгена в клетках мышц (включая скелетные мышцы, сердечные мышцы и/или гладкие мышцы) и/или ЦНС. Экспрессия трансгенного продукта приводит к доставке и сохранению трансгенного продукта в мышцах и/или ЦНС. В качестве альтернативы доставка может привести к доставке генной терапии и экспрессии микродистрофина в печени, а затем растворимый продукт микродистрофина переносится кровотоком в мышцы, где он может оказывать свое терапевтическое действие. В других вариантах осуществления рекомбинантный вектор можно вводить таким образом, что он доставляется в ЦНС, например, но не ограничиваясь этим, интратекально, интрацеребровентрикулярно, интраназально или супрахориоидально.

[00168] Фактическое количество дозы, вводимой конкретному субъекту, может определить лечащий врач с учетом таких параметров, как, помимо прочего, физические и физиологические факторы, включая массу тела, степень тяжести патологического состояния, тип заболевания, предшествующие или сопутствующие терапевтические вмешательства, идиопатию субъекта и/или путь введения.

[00169] Дозы могут варьироваться от 1×10^8 векторных геномов на кг (гв/кг) до 1×10^{15} гв/кг. Терапевтически эффективные количества могут быть достигнуты путем введения одной или более доз в течение курса лечения (т.е. дней, недель, месяцев и т.д.).

[00170] Фармацевтические композиции, пригодные для внутривенного, внутримышечного, подкожного или печеночного введения, содержат суспензию рекомбинантного вектора, содержащего трансген, кодирующий микродистрофин, в буфере для состава, содержащем физиологически совместимый водный буфер. Буфер для состава может содержать один или более из полисахаридов, поверхностно-активных веществ, полимеров или масел.

[00171] Предложенные в данном документе векторы для генной терапии можно применять в сочетании с другими препаратами для лечения мышечной дистрофии, включая кортикостероиды, бета-блокаторы и ингибиторы АПФ.

5.5.1 Дегенерация/регенерация мышц

[00172] Удаление дистрофина приводит к механической нестабильности, в результате чего миофибриллы ослабевают и в конечном итоге разрываются во время сокращения. У пациентов с МДД сначала в раннем детстве наблюдается слабость скелетных мышц, которая быстро прогрессирует до потери мышечной массы, искривления позвоночника, известного как кифоз, паралича и, в конечном итоге, смерти от сердечно-дыхательной недостаточности в возрасте до 30 лет. В скелетных мышцах пациентов с МДД также развивается гипертрофия мышц, особенно икроножных, признаки фокального некроза миофибрилл, аномальные изменения диаметра миофибрилл, повышенное отложение жира и фиброз, а также отсутствие окрашивания дистрофина в иммуногистологических срезах.

[00173] Цель лечения генной терапией, предусмотренного в данном документе, состоит в замедлении или остановке прогрессирования МДД или другого заболевания, связанного с мышечной дистрофией, или в

снижении степени тяжести одного или более симптомов, связанных с МДД, или другого заболевания, связанного с мышечной дистрофией. В частности, целью предлагаемой в данном документе генной терапии является уменьшение дегенерации мышц, индукция/улучшение регенерации мышц и/или предотвращение/уменьшение последующих патологий, включая воспаление и фиброз, которые препятствуют регенерации мышц и вызывают потерю подвижности, ортопедические осложнения и, в конечном счете, дыхательная и сердечная недостаточность.

[00174] Эффективность можно контролировать путем измерения изменений общей двигательной функции по сравнению с исходным уровнем с использованием системы оценки подвижности пациента North Star (NSAA) (порядковая шкала с 34 максимальным баллом, указывающим на полностью независимую функцию) или соответствующей возрасту модифицированной оценки путем оценки изменений в амбулаторной функции (например, 6 минут (пройденное расстояние < 300 м, от 300 до 400 м или > 400 м)), выполняя функциональный тест на время для измерения изменений по сравнению с исходным уровнем времени, необходимого для того, чтобы встать из положения лежа (от 1 до 8 с (хорошее), от 8 до 20 с (умеренная) и от 20 до 35 с (плохая)), выполняя оценку времени подъема (4 шага) и времени бега/ходьбы (10 метров), а также миометрию для оценки изменений силы по сравнению с исходным уровнем для верхних и нижних конечностей [Mazzone *et al*, North Star Ambulatory Assessment, 6-minute walk test and timed items in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy, *Neuromuscular Disorders* 20 (2010) 712–716].

[00175] Эффективность также можно контролировать путем измерения изменений (снижения) по сравнению с исходным уровнем уровней креатинкиназы (СК) в сыворотке (норма: 35–175 ЕД/л, МДД: 500–20 000 ЕД/л), фермента, который обнаруживается при аномально высоких уровнях при повреждении мышц уровень креатинина в сыворотке или моче (МДД: 10-25 мкмоль/л, легкая МДБ: 20–30 мкмоль/л, норма > 53 мкмоль/л, МДД) и уровни белка микродистрофина в биоптатах мышц. Магнитно-резонансная томография (МРТ) также может быть выполнена для оценки инфильтрации жировой ткани в скелетных мышцах (фракция жира) (Burakiewicz, J. et al. “Quantifying fat replacement of muscle by quantitative MRI in muscular dystrophy.” *Journal of Neurology* vol. 264,10 (2017): 2053-2067. doi:10.1007/s00415-017-8547-3).

[00176] Соответственно, предложены композиции нуклеиновых кислот и способы введения этих композиций, которые улучшают общую двигательную функцию или замедляют потерю общей двигательной функции, например, при измерении с использованием системы оценки подвижности пациента North Star для оценки амбулаторной функции по сравнению с не получавшим лечение контролем или с субъектом перед лечением композицией нуклеиновой кислоты. Альтернативно, композиции нуклеиновых кислот, описанные в данном документе, и способы введения композиций нуклеиновых кислот приводят к улучшению общей двигательной функции или уменьшению потери общей двигательной функции, что оценивается с помощью функционального теста на время для измерения времени, необходимого для того, чтобы встать из положения лежа, миометрии или по снижению уровня креатининкиназы в сыворотке (СК) или уменьшению инфильтрации жировой ткани. Уровни креатининкиназы в сыворотке можно дополнительно разделить на ее изоферментные фракции: ММ-СРК (скелетные мышцы), ВВ-СРК (мозг) и МВ-СРК (сердце).

[00177] Также предложены композиции, содержащие некоторое количество композиции нуклеиновой кислоты, включая, в частности, векторы, содержащие генные кассеты, вирусные векторы и векторы AAV, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в данном документе микродистрофин, которая эффективна для улучшения общей двигательной функции или замедления потерь

общей двигательной функции, например, измеренная с использованием системы оценки подвижности пациента North Star для оценки амбулаторной функции по сравнению с не получавшим лечение контролем или с субъектом до лечения композицией нуклеиновой кислоты; или по оценке функционального теста на время для измерения времени, необходимого для того, чтобы встать из положения лежа, или для демонстрации улучшения с помощью миометрии или снижения уровня креатининкиназы в сыворотке.

5.5.2 Минутный объем кровообращения

[00178] Хотя симптомы скелетных мышц считаются определяющей характеристикой МДД, пациенты чаще всего умирают от дыхательной или сердечной недостаточности. У пациентов с МДД развивается дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) из-за отсутствия в кардиомиоцитах дистрофина, необходимого для сократительной функции. Это приводит к притоку внеклеточного кальция, вызывая активацию протеазы, гибель кардиомиоцитов, некроз тканей и воспаление, что в конечном итоге приводит к накоплению жира и фиброзу. Этот процесс в первую очередь затрагивает левый желудочек (ЛЖ), который отвечает за перекачку крови к большей части тела, он толще и поэтому испытывает большую нагрузку. Атрофические кардиомиоциты демонстрируют потерю исчерченности, вакуолизацию, фрагментацию и ядерную дегенерацию. Функционально атрофия и рубцевание приводят к структурной нестабильности и гипокинезии ЛЖ, что в конечном итоге приводит к генерализованной ДКМП. МДД может быть связан с различными изменениями ЭКГ, такими как синусовая тахикардия, снижение циркадного индекса, снижение variability сердечного ритма, короткий интервал PR, гипертрофия правого желудочка, депрессия ST-сегмента и удлинение интервала QTc.

[00179] Предусмотренное в данном документе геннотерапевтическое лечение может замедлить или остановить прогрессирование МДД и других дистрофинопатий, в частности, уменьшить прогрессирование или ослабить сердечную дисфункцию и/или сохранить или улучшить сердечную функцию. Эффективность можно контролировать путем периодической оценки признаков и симптомов поражения сердца или сердечной недостаточности, которые соответствуют возрасту и стадии заболевания исследуемой популяции, с использованием серийных электрокардиограмм и серийных неинвазивных визуализирующих исследований (например, эхокардиографии или магнитно-резонансной томографии сердца (МРТ)). МРТ можно использовать для мониторинга изменений по сравнению с исходным уровнем форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), объема форсированного выдоха (ОФВ1), максимального давления на вдохе (МIP), максимального давления на выдохе (MEP), пиковой скорости выдоха (PEF), максимальной скорости выдоха при кашле, фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ), фракции укорочения левого желудочка (ФУЛЖ), воспаление и фиброз. ЭКГ может использоваться для мониторинга нарушений проводимости и аритмий. В частности, ЭКГ можно использовать для оценки нормализации интервала PR, зубцов R в V1, зубцов Q в V6, реполяризации желудочков, зубцов QS в нижней и/или верхней боковой стенке, нарушений проводимости в правой ножке пучка Гиса, QT C и QRS.

[00180] Соответственно, предложены композиции нуклеиновых кислот, включая композиции, содержащие кассеты генной экспрессии и вирусные векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую белок микродистрофин, описанный в данном документе, и способы введения таких композиций, которые улучшают или поддерживают сердечную функцию или замедляют потерю сердечной функции, для например, путем предотвращения снижения ФВ ЛЖ ниже 45% и/или нормализации функции (ФУЛЖ \geq 28%), измеряемой серийными электрокардиограммами и/или серийными неинвазивными визуализирующими исследованиями

(например, эхокардиографией или магнитно-резонансной томографией сердца (МРТ)). Измерения можно сравнить с не получавшим лечение контролем или с субъектом до лечения композицией нуклеиновой кислоты. Альтернативно, композиции нуклеиновых кислот, описанные в данном документе, и способы введения композиций нуклеиновых кислот приводят к улучшению сердечной функции или снижению утраты сердечной функции, что оценивается путем мониторинга изменений по сравнению с исходным уровнем форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), объема форсированного выдоха (ОФВ1), максимального давления на вдохе (MIP), максимального давления на выдохе (MEP), пиковой скорости выдоха (PEF), максимальной скорости выдоха при кашле, фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ), фракции укорочения левого желудочка (ФУЛЖ), воспаление и фиброз. ЭКГ может использоваться для мониторинга нарушений проводимости и аритмий. В частности, ЭКГ можно использовать для оценки нормализации интервала PR, зубцов R в V1, зубцов Q в V6, реполяризации желудочков, зубцов QS в нижней и/или верхней боковой стенке, нарушений проводимости в правой ножке пучка Гиса, QT C и QRS.

5.5.3 Центральная нервная система

[00181] Часть пациентов с МДД также может иметь эпилепсию, нарушение способности к обучению и нарушение когнитивных функций, дислексию, нарушения развития нервной системы, такие как синдром нарушения внимания с гиперактивностью (СДВГ), аутизм и/или психические расстройства, такие как обсессивно-компульсивное расстройство, тревога или нарушения сна.

[00182] Цель лечения генной терапией, описанная в данном документе, может заключаться в улучшении когнитивной функции или облегчении симптомов эпилепсии и/или психических расстройств. Эффективность можно оценить путем периодической оценки поведения и когнитивных функций, соответствующих возрасту и стадии заболевания исследуемой популяции, а также путем количественного определения и квалификации судорожных припадков.

[00183] Соответственно, предложены композиции нуклеиновых кислот и способы введения композиций для генной терапии микродистрофина, которые улучшают когнитивную функцию, уменьшают возникновение или тяжесть судорог, облегчают симптомы СДВГ, обсессивно-компульсивного расстройства, беспокойства и/или нарушений сна.

5.5.4 Первичные конечные точки для пациента

[00184] Эффективность композиций, включая дозировку композиции и способов, описанных в данном документе, можно оценить при клинической оценке субъектов, проходящих лечение. Первичные конечные точки для пациента могут включать мониторинг изменения по сравнению с исходным уровнем форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), объема форсированного выдоха (ОФВ1), максимального давления на вдохе (MIP), максимального давления на выдохе (MEP), пиковой скорости выдоха (PEF), максимальной скорости выдоха при кашле, фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ), фракции укорочения левого желудочка (ФУЛЖ), изменение по сравнению с исходным уровнем по шкале NSAA, изменение показателя работоспособности верхних конечностей (PUL) по сравнению с исходным уровнем, и изменение по сравнению с исходным уровнем по шкале оценки функций верхних конечностей Брука (оценка Брука), изменение по сравнению с исходным уровнем силы захвата, силы щипка, изменение оценки сердечного фиброза по данным МРТ, изменение жира в мышцах плеча (бицепса) и фиброза, оцененные с помощью МРТ, измерение силы ног с помощью динамометра, теста 6-минутной ходьбы, тест 10-минутной ходьбы, анализ ходьбы – 3D-запись ходьбы, изменение окрашивания мембраны атрофина с помощью

количественной визуализации иммуноокрашенных срезов биоптата и изменение в регенерирующих волокнах путем измерения (с помощью мышечной биопсии) как размера волокна, так и положительности в отношении неонатального миозина. См., например, Mazzone E *et al*, North Star Ambulatory Assessment, 6-minute walk test and timed items in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 20 (2010) 712–716.; Abdelrahim Abdrabou Sadek, *et al*, Evaluation of cardiac functions in children with Duchenne Muscular Dystrophy: A prospective case-control study. *Electron Physician* (2017) Nov; 9(11): 5732–5739; Magrath, P. *et al*, Cardiac MRI biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *BIOMARKERS IN MEDICINE* (2018) VOL. 12, NO. 11.; Pane, M. *et al*, Upper limb function in Duchenne muscular dystrophy: 24 month longitudinal data. *PLoS One*. 2018 Jun 20;13(6):e0199223.

6. ПРИМЕРЫ

6.1 Пример 1 – Кассеты для экспрессии гена микродистрофина (DMD) для встраивания в цис-плазмиды.

[00185] Конструкции DMD с аналогичным остовом: 5'- ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-3' (Фиг. 1). Четыре конструкции отличаются длиной промотора: одна без С-конца (RGX-DYS3), одна без интрона (RGX-DYS1) и одна с укороченным специфическим для мышц промотором (RGX-DYS4). Все они были клонированы в цис-плазмиды, фланкированные ITR. Все последовательности ДНК, кодирующие гены *DMD*, кодон-оптимизированы и истощены в отношении CpG.

6.1.1. Рекомбинантная инженерия трансгенов RGX-DYS1 и RGX-DYS2

[00186] Вкратце, кодон-оптимизированная и истощенная в отношении CpG нуклеотидная последовательность конструкции микродистрофина в RGX-DYS1 и RGX-DYS2, приведенная на Фиг. 1А, кодирующая N-конец-ABD1-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT-С-конец, была синтезирована с использованием GeneArt Gene Synthesis (Invitrogen, Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс). Желаемый С-конец получали сайт-направленным мутагенезом с использованием следующих двух праймеров: 5': TGA CTC GAG AGG CCT AAT AAA GAG C (SEQ ID NO: 43), 3': CCT TGG AGA CTG TGG AGA GGT G (SEQ ID NO: 44). Для создания RGX-DYS2, имеющего последовательность интрона VH4 (см. раздел 6.1.4 ниже), фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин, когезионно лигировали с основной плазмидой, содержащей ITR AAV, точку начала репликации и ген устойчивости к антибиотикам, чтобы получить конструкцию плазмиды RGX-DYS2. Анализ последовательности выявил дополнительный цитозин (С) в 5'-сайте сплайсинга интрона, поэтому лишний нуклеотид С был удален методом сайт-направленного мутагенеза, и полученная конструкция RGX-DYS2 содержит интрон VH4. Точно так же сайт-направленный мутагенез был использован для удаления интрона VH4, в результате чего был получен RGX-DYS1.

6.1.2. Рекомбинантная инженерия трансгенов RGX-DYS3 и RGX-DYS4

[00187] Была сконструирована конструкция RGX-DYS3 (Фиг. 1А), кодирующая микродистрофин конструкций RGX-DYS1 и RGX-DYS2, подробно описанных выше, без домена СТ. Эта конструкция включает интрон VH4 на 5'-конце конструкции.

[00188] RGX-DYS4 (Фиг. 1А) содержит кассету, кодирующую микродистрофин и интрон VH4, как и в RGX-DYS2, связанную с минимальным промотором SPc5-12 (SEQ ID NO: 40; см. раздел 6.1.3), а не полноразмерный промотор SPc5-12.

6.1.3. Рекомбинантная инженерия RGX-DYS5

[00189] Была сконструирована конструкция RGX-DYS5 (**Фиг. 1А**), кодирующая микродистрофин, названный DYS5 (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 79), имеющий С-концевой домен длиной 140 аминокислот (усеченный С-концевой домен, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83) и содержащий сайт связывания α 1-синтрофина, но не сайт связывания дистробревина. Плазмида кодирует кодон-оптимизированную и истощенную в отношении CpG версию транскрипта микродистрофина DYS5 человека, синтетический мышечный промотор (например, spc5-12) и небольшую поли(А)-сигнальную последовательность, и фланкирована ITR (нуклеотидная последовательность SEQ ID NO 82).

[00190] Плазмида RGX-DYS5 была создана путем замены С-конца DYS1 длинной версии в плазмиде RGX-DYS1 версией С-конца хвоста средней длины. Вкратце, хвост gBlock-DMD-1.5 был синтезирован с помощью технологий интегрированной ДНК, содержащих промежуточную версию С-конца, фланкированную сайтами EcoRV и NheI, и 17 п.о. перекрывающейся последовательности плазмиды RGX-DYS1. Исходную плазмиду RGX-DYS1 расщепляли рестрикционными ферментами NheI и EcoRV (New England Biolabs), а затем путем соединения лигазой с хвостом gBlock-DMD1.5. Конечная плазмида RGX-DYS5 была подтверждена ферментативным расщеплением и последующим секвенированием.

[00191] Длину и экспрессию белка подтверждали с помощью вестерн-блоттинга. С этой целью различные плазмиды трансфицировали в клетки линии миобластов C2C12. Через четыре дня после дифференцировки клетки собирали в буфере для лизиса. 20 мкг лизиса клеток из каждого образца плазмиды наносили на ДСН-ПААГ гель. Антитело (1с7) против дистрофина (MANEX1011В, банк гибридом для исследований развития) использовали для обнаружения полосы белка микродистрофина. Полоса белка микродистрофина, полученная из плазмиды RGX-DYS5 (экспрессирующей DYS5), была значительно короче, чем у RGX-DYS1 (экспрессирующей DYS1), и длиннее, чем у DYS3 (**Фиг. 1В** и **С**). Транскрипт DYS3 управлялся универсальным промотором CB, тогда как экспрессия транскрипта DYS1 и DYS5 управлялась специфическим для мышц промотором в эксперименте, показанном на **Фиг. 1В**. Контроль белка α -актина использовали в качестве показателя последовательного восстановления общего белка (**Фиг. 1С**).

[00192] Чтобы проверить эффективность упаковки RGX-DYS5, RGX-DYS5 упаковывали в вектор AAV8 с использованием клеток HEK293, и определяли титр вектора RGX-DYS5 после культивирования во встряхиваемой колбе и аффинной очистки. Средний титр был выше, чем RGX-DYS1 в упаковке AAV8, и сравним с RGX-DYS3 в упаковке AAV8 в этих лабораторных производственных циклах. (Данные не показаны.)

6.1.4. Интрон VH4 и промотор minSPc5-12

[00193] Интрон VH4 в RGX-DYS2, RGX-DYS3 и RGX-DYS4 получен из варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека (SEQ ID NO: 41; номер доступа GenBank AB019438.1). Эффективность сплайсинга и точность интрона VH4 тестировали *in vitro* в клетках C2C12. Сначала проводили секвенирование продукта ПЦР с обратной транскрипцией, чтобы проверить, произошло ли правильное событие сплайсинга. Плазмиду RGX-DYS2 трансфицировали в миобласты C2C12 и клетки культивировали в среде для дифференцировки в течение трех дней. Затем клетки подвергали экстракции РНК, синтезу кДНК и ПЦР. Для ПЦР использовали следующие праймеры: Праймер 1: GGC CCA CGA GCT ACC CGG AG (SEQ ID NO: 45), Праймер 2: CTT CCA GCA GAT CCA GCA GCC (SEQ ID NO: 46). Ожидаемый продукт ПЦР подвергали очистке в геле и секвенированию по Сэнгеру. Результаты секвенирования продемонстрировали, что происходили точные события сплайсинга. Затем функцию интрона VH4 тестировали в конструкции, в

которой последовательность, кодирующая микродистрофин, была заменена последовательностью, кодирующей репортерный белок GFP. Также были протестированы векторы AAV8, содержащие ген GFP, управляемый промотором SPc5-12 с интроном VN4 или без него в дифференцированных клетках C2C12 в различных дозах. Были получены изображения и проведен количественный анализ с использованием мультимодального ридера клеточного имиджинга Cytation 5. Все данные количественного анализа и изображения продемонстрировали, что интрон VN4 увеличивал экспрессию GFP почти в 5 раз (Фиг. 2А-Г и Фиг. 3).

6.2 Пример 2 – Анализ активности *in vitro* для векторов микродистрофина с использованием дифференцированных клеток C2C12

[00194] Анализ *in vitro* для проверки активности векторов микродистрофина был разработан путем анализа инфективности вектора AAV8-CAG-GFP на клетках HEK293. Через три дня после инфицирования (1×10^5 гв/клетка) наблюдалось несколько GFP-положительных клеток HEK293 (данные не показаны), что указывает на низкую инфективность клеток HEK293 вектором AAV8. Затем аналогичным образом тестировали способность вектора AAV8-CAG-GFP трансдуцировать миобласты C2C12. Недифференцированные миобласты C2C12 инфицировали вектором AAV8-CAG-GFP (1×10^6 гв/клетка), затем дифференцировали в течение трех дней. Подобно клеткам HEK293, наблюдалось очень мало GFP-положительных клеток, демонстрируя, что недифференцированные клетки миобластов C2C12 демонстрируют низкую инфективность гAAV8 (данные не показаны). Инфективность тестировали в дифференцированных клетках C2C12 путем культивирования клеток C2C12 в среде для дифференцировки (DMEM+2% лошадиной сыворотки) в течение 3 дней с последующим инфицированием их AAV8-CAG-GFP. Изображения были получены через три дня после заражения и через три дня после дифференцировки. Было видно много GFP-положительных клеток, что позволяет предположить, что дифференцированные мышечные трубки восприимчивы к трансдукции вектором AAV8 (Фиг. 4А-С).

[00195] После успешного создания системы заражения мышечных клеток *in vitro* была проанализирована активность векторов микродистрофина. Например, активность двух партий векторов (RGX-DYS1-RS и RGX-DYS1-03), полученных с разницей в несколько месяцев с использованием одного и того же производственного процесса, тестировали на дифференцированных клетках C2C12. Используемое первичное антитело представляло собой моноклональное антитело против дистрофина человека (кат. номер DSHB MANHINGE1A(6F11)). Программное обеспечение JMP использовали для анализа данных. Относительная активность тестируемого вектора (RGX-DYS1-03) составляла 81,47% от эталонного контроля (RGX-DYS1-RS, 100%), что указывает на то, что инфективность этих двух векторов была очень похожей (Фиг. 5А-Н).

[00196] Были получены партии упаковывающих рекомбинантных векторов AAV DYS1, DYS2, DYS3 или DYS4, и их относительная инфективность сравнивалась с клетками дифференцированной линии мышечных клеток C2C12 в качестве показателя активности вектора (Фиг. 6). Вкратце, клетки линии C2C12 мышечных клеток мышцы высевали в количестве 2×10^5 клеток/лунку в 6-луночные планшеты, культивированные с 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM). Затем на вторые сутки клетки меняли на среду для дифференцировки (DMEM с 2% лошадиной сывороткой, дополненной инсулином (1 мкг/мл)). Через три дня дифференцировки клетки инфицировали различными векторами DMD в дозе $2,5 \times 10^4$ гв/клетка. Через три дня после инфицирования инфицированные клетки собирали и подвергали экстракции ДНК с последующей количественной ПЦР. Для выделения ДНК

использовали набор DNeasy Blood and Tissue (кат. №: 69504, Qiagen). Анализ Taqman использовали как для эндогенного контроля (ген глюкогона), так и для векторов AAV. Ген глюкогона мышцы в качестве эндогенного контроля позволил нормировать число копий вектора. Последовательности для праймеров и зондов глюкогона мышцы были следующими: Глюкогон-real-F (мышь): AAGGGACSTTTACCAGTGATGTG (SEQ ID NO: 47); Глюкогон-real-R (мышь): ACTTACTCTCGCCTTCCTCGG (SEQ ID NO: 48); зонд мышечного глюкогона Taqman: FAM-CAGCAAAGGAATTCA-MGB (SEQ ID NO: 49). Для целевых векторов AAV были разработаны следующие праймеры и зонды для распознавания последовательности микродистрофина: Dys-C-F: TGG GCC TGC TCC TGC ATG (SEQ ID NO: 50); Dys-C-R: ATC TCA GGC TTG GCA AAC (SEQ ID NO: 51); Dys-C-зонд: FAM-CAA TAT TGA GCC ATC AGT C-MGB (SEQ ID NO: 52). Количество копий на диплоидную клетку рассчитывали как:

$$\frac{\text{количество копий вектора}}{\text{эндогенный контроль}} \times 2.$$

[00197] Партию DYS1-RS рассматривали как эталонный контроль (значение устанавливали на 1,0), и все другие векторы сравнивали с ним (количество копий вектора/эталонный контроль (кратность изменения)). Как показано на **Фиг. 6**, инфективность всех векторов AAV8 была сопоставима (приемлема инфективность в диапазоне от 50 до 150%), демонстрируя векторы хорошего качества.

[00198] Уровень экспрессии РНК гена микродистрофина определяли после инфицирования дифференцированных клеток C2C12 различными векторами AAV8 в двух различных дозах (1e5 гв/клетка и 5e4 гв/клетка). Клетки, трансфицированные векторами RGX-DYS3, имели в 2-3 раза более высокие уровни мРНК микродистрофина по сравнению с уровнями мРНК микродистрофина в клетках, трансфицированных векторами RGX-DYS1 (**Фиг. 7**). Это различие, вероятно, связано с наличием интрона VN4 в мРНК, стабилизирующей RGX-DYS3.

6.3 Пример 3 – Применение генной терапии на модели мышцы *mdx*

6.3.1. Методы исследования

[00199] RGX-DYS1 упаковывали в вектор AAV8 с использованием клеток HEK293, и титр вектора RGX-DYS1 составлял 4,6E13 гв/мл. Вкратце, вектор RGX-DYS1 AAV8 систематически вводили 5-недельным самцам мышей *mdx* путем инъекции в хвостовую вену в дозе 2E14 гв/кг (n = 13). Мышей периодически взвешивали. Мышечную силу хвата измеряли через 5 недель после лечения, а анализ сократительной функции мышц *in vitro* проводили через 6 недель после инъекции. Результаты представлены в **таблице 11**.

Таблица 11: Схема анализа модели мышцы *mdx*

	Недели лечения (возраст в неделях)					
	1(5)	2(6)	3(7)	4(8)	5(9)	6(10)
Масса тела	+	+	+	+	+	+
Клинические наблюдения	+	+	+	+	+	+
Введение лекарственного средства	+	-	-	-	-	-
Сила хвата передней конечности	-	-	-	+	+	-
Сила In Vitro, Коллекция тканей	-	-	-	-	-	+

6.3.2. Масса тела и масса тканей

[00200] Из-за патогенеза дегенерации и регенерации скелетных мышц мышцы *mdx* обычно тяжелее мышей

дикого типа. Как показано на **Фиг. 8**, обработка вектором RGX-DYS1 значительно снижала массу тела. Фактически масса тела получавших лечение мышей была аналогична таковой у мышей дикого типа через 2 недели после лечения.

[00201] Всех мышей подвергали эвтаназии через 6 недель после инъекции и взвешивали различные органы и мышцы. У мышей, получавших RGX-DYS1, наблюдалось значительное снижение массы органов и мышц, включая камбаловидную, четырехглавую и трехглавую мышцы, а также переднюю большеберцовую мышцу (ТА) (**Фиг. 9А и 9В**).

6.3.3. Сила хвата

[00202] Для измерения силы хвата мышей акклиматизировали в лаборатории примерно за 10 минут до начала процедуры. Экспериментатор не знал о лечении, и мышь, подлежащая исследованию, была передана экспериментатору другим человеком. Мышь осторожно помещали поверх проволочной сетки для передних конечностей так, чтобы только ее передние лапы могли захватить один из горизонтальных проволок. Убедившись, что обе передние лапы захватывают одну и ту же проволоку, а туловище находится горизонтально по отношению к земле и параллельно проволоке, мышь с равномерным усилием тянули назад по всей длине сетки до тех пор, пока хват не разжимался. 5 хороших потягиваний для каждого животного в течение пяти дней подряд для акклиматизации и тестирования. Для анализа максимальной силы отдельных мышей рассчитывали единственное лучшее зарегистрированное значение (максимальная сила). Нормализованную силу (кгс/кг) рассчитывали исходя из массы тела.

[00203] Измерение силы хвата через 5 недель после лечения показало, что лечение значительно увеличило мышечную силу мышей, получавших RGX-DYS1, по сравнению с больными контролями, получавшими носитель, ($p \leq 0,001$) (**Фиг. 10**).

6.3.4. Сила in vitro

[00204] Мышей подвергали анестезии кетамином и ксилазином. Мышцу EDL правой задней конечности удаляли у каждой мыши и погружали в оксигенированную ванну (95% O₂, 5% CO₂), содержащую раствор Рингера (pH 7,4) при 25°C. С помощью неутоняющих подергиваний мышцу доводили до оптимальной длины для создания силы. Мышцы стимулировали электродом, чтобы вызвать тетанические сокращения, которые были разделены 2-минутными интервалами отдыха. При каждом последующем тетаническом сокращении частота стимуляции увеличивалась с шагом 20, 30 или 50 Гц до тех пор, пока сила не достигала плато, которое обычно происходило при около 250 Гц. Площадь поперечного сечения мышц измеряли на основе мышечной массы, длины волокон и плотности ткани. Наконец, удельную силу мышц (кН/м²) рассчитывали на основе площади поперечного сечения мышцы.

[00205] Получавшие носитель мыши *mdx* (n=13) показали значительное снижение максимальной и удельной силы по сравнению со здоровыми мышами BL10 (ранее полученные данные, n=14). Лечение мышей *mdx* RGX-DYS1 приводило к значительному улучшению как максимальной, так и удельной силы через 6 недель по сравнению с контролем, получавшим носитель (**Фиг. 11**).

6.3.5. Сердечная функция

[00206] Для измерения артериального давления (АД) мышам проводят седацию 1,5% изофлураном при постоянном контроле плана анестезии и поддержании температуры тела на уровне 36,5–37,58°C. ЧСС поддерживают на уровне 450–550 уд/мин. На хвост надевается манжета для измерения АД, а затем хвост помещается в узел датчика для неинвазивного мониторинга АД во время анестезии. Проводят десять

последовательных измерений АД. Качественные и количественные измерения АД в хвосте, включая систолическое давление, диастолическое давление и среднее давление, выполняются в автономном режиме с использованием аналитического программного обеспечения. См., например, Wehling-Henricks et al, Human Molecular Genetics, 2005, Vol. 14, No. 14; Uaesoontrachoon et al, Human Molecular Genetics, 2014, Vol. 23, No. 12.

[00207] Для мониторинга амплитуды волны и длительности интервала ЭКГ у бодрствующих свободно перемещающихся мышей используют устройства радиотелеметрии. Блоки передатчика имплантируют в брюшную полость анестезированных мышей, а два электрических отведения закрепляют рядом с верхушкой сердца и правым акромионом в ориентации отведения II. Мышей размещают поодиночке в клетках над антенными приемниками, подключенными к компьютерной системе для записи данных. Нефильтрованные данные ЭКГ собираются в течение 10 секунд каждый час в течение 35 дней. Данные за первые 7 дней не учитываются, чтобы позволить восстановиться после хирургической процедуры и убедиться, что любые эффекты анестезии прошли. Кривые данных и параметры анализируются с помощью пакетов для анализа DSI (ART 3.01 и Physiostat 4.01), а измерения компилируются и усредняются для определения частоты сердечных сокращений, амплитуды волн и продолжительности интервалов ЭКГ. Необработанные кривые ЭКГ проверяются на наличие аритмий двумя независимыми наблюдателями.

[00208] Окрашивание пикросириусом красным проводят для измерения степени фиброза в сердце подопытных мышей. Короче говоря, в конце исследования, сразу после эвтаназии, сердечная мышца извлекается и фиксируется в 10% формалине для последующей обработки. Выполняют срезы сердца, а парафиновые срезы депарафинизируют в ксилоле с последующим окрашиванием ядер гематоксилином Вейгерта в течение 8 мин. Затем их промывают и окрашивают пикросириусом красным (0,5 г сириуса красного F3B, насыщенного водного раствора пикриновой кислоты) в течение еще 30 мин. Срезы очищают тремя сменами ксилола и монтируют в Permount. С помощью микроскопа Eclipse E800 (Nikon, Япония) получают пять случайных цифровых изображений, а слепой анализ проводят с использованием изображения J (NH).

[00209] Образцы крови берутся путем пункции сердца после эвтаназии животных, а собранная сыворотка используется для измерения уровней СК в мышцах.

6.4 Пример 4 Биораспределение вектора

[00210] Мышей *mdx*, получавших носитель и RGX-DYS1, умерщвляли через 6 недель после лечения, и количество копий вектора оценивали в различных тканях, включая скелетные мышцы, сердечную мышцу и клетки печени, с использованием цифровой системы для цифровой ПЦР Naica Crystal Digital PCR от Stilla Technologies.

[00211] Вектор RGX-DYS1 вводили четырехнедельным самцам мышей *mdx* с мышечной дистрофией посредством инъекции в хвостовую вену. Через шесть недель после инъекции мышей умерщвляли, а ткани подвергали экстракции общей ДНК и анализу количества копий вектора методом кЦПЦР.

[00212] Общую ДНК из собранных тканей экстрагировали с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit, а концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop. Для определения количества копий векторов в тканях проводили цифровую ПЦР с использованием системы Naica Crystal Digital PCR (Stilla Technologies). В данном случае была применена двухцветная система мультиплексирования для одновременного измерения трансгена дистрофина и эндогенного контрольного гена. Вкратце, зонд

дистрофина был помечен красителем FAM (6-карбоксифлуоресцеин), в то время как эндогенный контрольный зонд глюкогона был помечен флуоресцентным красителем VIC. Последовательности праймеров и зондов мышинового глюкогона были следующими: Глюкогон-real-F (мышь): AAG GGA CCT TTA CCA GTG ATG TG (SEQ ID NO: X); Глюкогон-real-R (мышь): ACT TAC TCT CGC CTT CCT CGG; зонд мышинового глюкогона *Taqman*: VIC-CAG CAA AGG AAT TCA-MGB. Для векторов AAV были разработаны праймеры и зонды для распознавания С-конца гена дистрофина: Dys-dd-F2: ACA GAT ACC TGT TCA AGC AAG TGG C (SEQ ID NO: 122); Dys-dd-R2: TCA ATC TCA GGC TTG GC (SEQ ID NO: 123); Dys-C-зонд: FAM-CAA TAT TGA GCC ATC AGT C-MGB (SEQ ID NO: 124). Количество копий доставленного вектора в конкретной ткани на диплоидную клетку рассчитывали как: $\frac{\text{количество копий вектора}}{\text{эндогенный контроль}} \times 2$.

[00213] Введение RGX-DYS1 приводило к максимальному числу копий вектора в ткани печени (437±78 копий/клетка, n=13). Сердечная мышца (23±9, n=13) и скелетные мышцы (передняя большеберцовая мышца (ТА) 28±10 копий/клетка, длинный разгибатель пальцев (EDL) 23±11 копий/клетка, мышца диафрагмы 28±29 копий/клетка, трехглавая мышца 49±22 копии/клетка), все они демонстрировали значительное распределение векторов (Фиг. 12).

6.5 Пример 5 - Восстановление DAPC, включая nNOS

[00214] Ассоциированные с дистрофином белки вместе с дистрофином образуют комплекс, известный как ассоциированный с дистрофином комплекс белков (DAPC), который, действуя как мостик, соединяет актин внутриклеточного цитоскелета с базальной мембраной через внеклеточный матрикс. Sadoulet-Puccio, H.M., et al, Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:12413-8. DAPC состоит из нескольких субкомплексов: дистрогликан, сакрогликан и синтрофин/дистробревин, которые в совокупности связаны с поддержанием целостности волокон во время повторяющихся циклов сокращения и расслабления и в передаче сигналов клетками. Там же (Фиг. 13). В дистрофине дикого типа сайт связывания β-дистрогликана расположен в шарнире 4 и богатом цистеином (CR) домене. Для взаимодействия с бета-дистрогликаном домену WW дистрофина необходима область «EF-руки» (Rentschler, S., et al. 1999, Biol Chem 380:431-42). RGX-DYS1 включает часть С-конца (SEQ ID NO: 16), которая содержит домены связывания дистробревина и синтрофина (см. таблицу 1). Одной из важных функций синтрофина является прикрепление к сарколемме сигнальных белков, таких как нейрональная синтаза оксида азота (nNOS). Adams, M.E., et al, 2000. Absence of α1-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. J Cell Biol 150:1385-98. Следовательно, можно ожидать, что экспрессия микродистрофина из RGX-DYS1 в мышцах мышей *mdx* восстанавливает дистробревин, синтрофины и nNOS в мышечной мембране.

[00215] Иммунофлуоресцентное окрашивание дистрофина, nNOS, α1-синтрофина, α-дистробревина проводили на криосрезах икроножной мышцы получавших лечение и контрольных мышей. Реагенты и антитела, используемые для экспериментальной процедуры, перечислены в таблицах 12 и 13.

Таблица 12: Окрашивающие реагенты

Описание	Номер каталога	Поставщик/продавец
Краситель нуклеиновых кислот DAPI, чистоты FluoroPure	D21490	Thermo Fisher/Invitrogen

Описание	Номер каталога	Поставщик/продавец
Лошадиная сыворотка (New Zealand Origin)	16050-130	Thermo Fisher/Gibco
Блокирующий реагент Mouse on Mouse (M.O.M)	Каталог VWR 101098-256, Каталог Vector Labs MKB-2213	VWR/Vector Laboratories
Предметные стекла с адгезивным покрытием Apex Superior	Каталог VWR 10015-146, Каталог Leica 3800080	VWR/Leica
Среда для заключения SlowFade Gold Antifade	S36937	Thermo Fisher/Invitrogen
Покровное стекло	Каталог VWR 75810-254, Каталог Leica 3800150ACS	VWR/Leica
Гидрофобный барьерный карандаш-маркер PAP Pen, маленький	Каталог VWR 100502-806, Каталог Electron Microscopy Service 71312	VWR/Electron Microscopy Service
PBS	20012-027	Thermo Fisher/ Gibco
Ультрарачистая дистиллированная вода	10977-015	Thermo Fisher/Invitrogen

[00216] Свежевыделенную ткань мыши быстро замораживали путем немедленного погружения в двойную ванну с изопентаном/жидким азотом и затем хранили при -80°C . Ткань прикрепляли к блоку для резки, добавляя несколько капель состава OCT (оптимальная температура резки), а затем помещали ткань на блок в желаемой ориентации среза. OCT и ткань замораживали на месте в криостате (удерживали ткань в желаемой ориентации до тех пор, пока OCT не станет твердой), и из ткани делали срезы по 10 мкм (допустимо 8-10 мкм). На каждом предметном стекле располагали от четырех до шести срезов и хранили при температуре -80 градусов.

[00217] Предметные стекла криосрезов мышц извлекали из хранилища при температуре -80 градусов и сушили на воздухе в течение 10 минут при комнатной температуре (КТ). Затем делают метки вокруг области разреза ткани с помощью карандаша-маркера PAP Pen. Если первичное антитело получено из мышинового моноклонального антитела, требуется две стадии блокирования. Сначала образец блокируют, добавляя соответствующий объем 1x M.O.M, чтобы покрыть всю площадь, ограниченную карандашом-маркером PAP, с помощью пипетки и инкубируют в течение 1,5 часов при комнатной температуре. M.O.M. удаляют аспирацией и затем блокируют 10% лошадиной сывороткой (в PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре. Если первичное антитело не мышинового происхождения, образцы непосредственно блокируют 10% лошадиной сывороткой (в PBS) с помощью пипетки для добавления соответствующего объема PBS, чтобы покрыть всю площадь, ограниченную карандашом-маркером PAP, и затем инкубируют в течение 1 часа при КТ.

[00218] Первичные антитела разводили в 2% лошадиной сыворотке (в PBS) и образцы инкубировали в течение 1-2 часов при комнатной температуре. Затем предметные стекла промывали 1X PBS, добавляя соответствующий объем PBS, чтобы покрыть всю площадь, ограниченную карандашом-маркером PAP, с

последующей инкубацией в течение 3 минут при комнатной температуре и аспирацией. Повторяли в общей сложности 3-4 раза. Вторичное антитело (Cy3, эквивалентное, например, конъюгированное с Alexa Fluor 594 или 488 антитело) разводили в 2% лошадиной сыворотке в PBS и предметные стекла инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Предметные стекла промывали 3-4 раза 1X PBS в течение 3 минут при комнатной температуре.

Контрастное окрашивание проводили с DAPI для отображения ядер путем инкубации предметных стекол с 1x DAPI, разведенным в PBS, в течение 5–8 минут при комнатной температуре. Предметные стекла промывали 1x PBS в течение 3 минут при комнатной температуре после окрашивания DAPI, а затем наносили 1–2 капли на предметное стекло монтирующей среды для предотвращения выцветанию при комнатной температуре. Предметные стекла сушили на воздухе при комнатной температуре после монтирования и предохраняли от света. Флуоресценцию анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа и получали изображения.

Таблица 13: Первичные и вторичные антитела, используемые для анализа DAPC

Описание	Номер каталога	Поставщик/продавец	Рекомендуемые разведения
Мышиное моноклональное антитело к дистрофину	MANEX1011B (1C7) Супернатант	Банк гибридом для исследований развития / Университет Айовы	1:100
Мышиное моноклональное антитело к бета-дистрогликану	MANDAG2 (7D11) Супернатант	Банк гибридом для исследований развития (Университет Айовы)	1:3000
Мышиное моноклональное антитело к NOS1	SC-5302	Santa Cruz Biotechnology	1:50
Кроличье поликлональное антитело к синтрофину альфа 1	Ab11187	Abcam	1:3000
Мышиное моноклональное антитело к дистробревину	610766	BD Biosciences	1:100
Козье поликлональное антитело к мышинному IgG, конъюгат Cy3	AP124C	Millipore Sigma	1:500
Козье поликлональное антитело к кроличьему IgG (H+L), конъюгат Cy3	A10520	Thermo Fisher/Invitrogen	1:500

[00219] Как показано на **Фиг. 14**, за исключением нескольких ревертантных волокон, белок дистрофин и исследованные белки DAPC отсутствовали в мышцах мышей *mdx*, не получавших RGX-DYS1. Системная доставка RGX-DYS1 эффективно восстанавливала экспрессию дистрофина, а также закрепляла α 1-синтрофин, α -дистрофин, β -дистрогликан и pNOS в сарколемме (**таблица 14**). Следует отметить, что для окрашивания pNOS использовали два коммерческих антитела. В обоих случаях экспрессия pNOS была значительно восстановлена в мышечной мембране по сравнению с не получавшей лечение контрольной группой. В заключение, микродистрофин RGX-DYS1 был способен восстанавливать связанные с

дистрофином белковые комплексы, включая pNOS, в сарколемме *in vivo*.

Таблица 14. Закрепление членов DAPC

	β -Дистрогликан	α -Дистробревин	α 1-Синтрофин	pNOS
Дистрофин дикого типа	+++	+++	+++	+++
DYS1	+++	+++	+++	++
DYS3	+++	+	+	-
DYS5	+++	+	+++	++

6.6 Пример 6 – Применение генной терапии на модели мыши *mdx*

[00220] Тестирование векторов AAV8-RGX-DYS3 и AAV8-RGX-DYS5 *in vivo* проводили на 13 самцах мышей C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J (*mdx*). Все векторы системно вводили 5-недельным мышам с *mdx* путем инъекции в хвостовую вену в дозе 2E14 гв/кг (n=5 для группы 1, AAV8-RGX-DYS3; n=5 для группы 2, AAV8-RGX-DYS5; n=3, отрицательный по *mdx* (без дозирования) контроль). Масса животных варьировалась от 15,9 г до 22,0 г в день введения дозы. Через 6 недель после введения вектора собирали кровь для получения сыворотки, животных усыпляли и подвергали некропсии для сбора тканей. Основные скелетные мышцы, включая икроножную (Gas), переднюю большеберцовую мышцу (TA), диафрагму, трехглавую и четырехглавую мышцы, сердце, печень и основные органы, собирали и мгновенно замораживали в двойной ванне с изопентаном/жидким азотом и помещали в предварительно охлажденные криобрирки.

[00221] Массу тела каждого животного регистрировали два раза в неделю и рассчитывали среднее изменение массы для каждой группы. Все животные прибавили в весе, как и ожидалось, в течение 7-недельного периода, за исключением животного № 12 (R13-135-012).

[00222] **Таблица 15:** Изменение массы тела отдельных особей и группы с 0-го по 42-й день

Номер животного	Группа	Изменение массы (г)	Среднее изменение массы группы (г)
R13-135-001	1	9,5	5,9
R13-135-002	1	7,7	
R13-135-005	1	1,7	
R13-135-006	1	5,2	
R13-135-007	1	5,4	
R13-135-008	2	9,7	7,3
R13-135-009	2	3,8	
R13-135-011	2	8,0	

Номер животного	Группа	Изменение массы (г)	Среднее изменение массы группы (г)
R13-135-012	2	Больное животное	
R13-135-013	2	7,7	
R13-135-003	Отрицательный контроль	13,8	13,2
R13-135-004	Отрицательный контроль	12,7	
R13-135-010	Отрицательный контроль	13,0	

[00223] Патогенез дегенерации и регенерации скелетных мышц у мышей *mdx* обычно приводит к тому, что они становятся тяжелее, чем мышцы дикого типа. Как видно из таблицы 15, у мышей *mdx*, получавших лечение вектором RGX-DYS3 или RGX-DYS5, наблюдались значительно меньшие изменения массы тела по сравнению с мышами *mdx*, не получавшими лечения.

6.7 Пример 7 - Оценка экспрессии белка микродистрофина (μ -Dys) у получавших лечение мышей *mdx*

6.7.1 Сравнение экспрессии μ -Dys с помощью вестерн-блоттинга, экспрессии мРНК и количества копий ДНК-вектора.

[00224] Данные и образцы, описанные в этом примере, относящиеся к экспериментам с RGX-DYS1, собирали после проведения лечения, как описано в Разделе 6.3 ниже (n=13 мышей, которым вводили дозу AAV8-RGX-DYS1). Данные и образцы, описанные ниже, относящиеся к экспериментам с животными, которым вводили AAV8-RGX-DYS3 и AAV8-RGX-DYS5, собирали после проведения лечения, как описано в разделе 6.6 выше (n=5 в каждой группе получавших лечение мышей *mdx*). Эксперименты проводились на разном оборудовании.

[00225] Экспрессию белка микродистрофина из икроножной мышцы, собранной у получавших лечение мышей *mdx*, исследовали с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, от 20 до 30 мг тканей гомогенизировали в буфере для лизиса белка (15% SDS, 75 mM Tris-HCl pH 6,8, ингибитор протеиназы, 20% глицерин, 5% бета-меркаптоэтанол) (гомогенизатор Bead Mill Bead Ruptor 12, SKU: 19050A, OMNI International). После гомогенизации образцы центрифугировали в течение 5 минут на максимальной скорости при комнатной температуре, а супернатанты подвергали количественному определению белка. Супернатанты исходного белка количественно определяли с использованием набора для анализа белка Qubit (кат. номер Q33211, ThermoFisher Scientific). Рассчитывали общую концентрацию белка на исходный раствор, затем 20 мкг супернатанта исходного белкового раствора наносили на ДСН-ПААГ гель. Вестерн-блоттинг проводили с использованием первичных антител против дистрофина (MANEX1011B(1C7), банк гибридом для исследований развития) в разведении 1:1000, а в качестве вторичных антител использовали козье антитело к мышечному IgG2a, конъюгированное с пероксидазой хрена (ПХ) (Thermo Fisher Scientific, кат. № 62-6520). α 1-актин служит в качестве контроля для нанесения в каждой дорожке геля. Для анти-альфа-1-актинового

блоттинга использовали кроличье поликлональное антитело к α 1-актину (PA5-78715, Thermo Fisher) с коэффициентом разведения 1:10000, а вторичное козье антитело к Ig кролика (Thermo Fisher Scientific, кат. № 31460) использовали в разведении 1:20000. Белковый сигнал определяли с использованием реагента для обнаружения для вестерн-блоттинга ECL Prime (в соответствии с инструкциями производителя; AMERSHAM, RPN2232) и количественно определяли с помощью денситометрии с использованием программного обеспечения Image Lab (Bio-Rad).

[00226] При помощи вестерн-блоттинга (**Фиг. 15**) получены некоторые сведения: во-первых, предполагаемый размер каждого белка μ -дистрофина хорошо соответствует его наблюдаемой миграции в геле, т.е. белок μ -дистрофин RGX-DYS1 составлял 148 кДа, тогда как размер белков RGX-DYS5 и RGX-DYS3 составлял 142 кДа и 132 кДа, соответственно. Во-вторых, интенсивность полос была различной для каждого белка, присутствующего в ткани икроножной мышцы. Более длинная версия μ -дистрофина, вектор RGX-DYS1, демонстрировала самую сильную экспрессию трансгена, за ней следовала промежуточная версия RGX-DYS5 и более короткая версия RGX-DYS3 (**Фиг. 15** и **Фиг. 16А**). Различие в уровне экспрессии μ -дистрофина среди этих трех конструкций может быть связано либо с изменением уровня генома вектора AAV, либо со стабильностью белка различных длин конструкций μ -дистрофина.

[00227] Для выяснения количества копий генома на клетку была проведена кцПЦР для изучения числа копий генома вектора AAV- μ -dys в этих тканях с использованием метода, описанного ранее в разделе 6.4 (Пример 4). Как показано на **Фиг. 16В**, ткани, в которые доставлялся вектор RGX-DYS1, действительно имели более высокие числа копий векторного генома (50 ± 14 гв/клетка), чем ткани, в которые доставлялся вектор RGX-DYS5 (17 ± 4 гв/клетка) и RGX-DYS3 (16 ± 5 гв/клетка) (значения нормированы на копии генома глюкогона). Затем относительную экспрессию μ -дистрофина сравнивали с количеством копий вектора. Как показано на **Фиг. 16С**, экспрессия относительного μ -дистрофина в мышцах, получавших лечение RGX-DYS1 ($1,33 \pm 0,39$), и мышцах, получавших лечение RGX-DYS5 ($1,774 \pm 0,40$), была значительно выше, чем в мышцах, получавших лечение RGX-DYS3 ($0,77 \pm 0,22$, $p < 0,05$, $n =$ от 3 до 5). Эти данные демонстрируют, что более длинные версии μ -дистрофина (имеющие С-конец), генерируемые векторами RGX-DYS1 и RGX-DYS3, обеспечивают лучшую стабильность белка μ -дистрофина в мышечных клетках *in vivo*.

[00228] Кроме того, с помощью кцПЦР измеряли экспрессию мРНК μ -дистрофина и дистрофина дикого типа (ДТ) в скелетных мышцах у необработанных мышей В6 дикого типа и мышей *mdx* по сравнению с получавшими лечение мышами. Общую РНК экстрагировали из мышечной ткани с использованием мини-набора RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (REF 74704, Qiagen). кДНК синтезировали с использованием набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit с ингибитором РНКазы (кат. 4374966, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop. Количество копий μ -дистрофина, дистрофина ДТ и эндогенного контроля мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) измеряли с помощью цифровой ПЦР (система Naica Crystal Digital PCR, Stilla Technologies). Праймеры и зонд против мышинового дистрофина ДТ (mm01216951_m1, Thermo Fisher Scientific) (также описанного в исследовании биораспределения выше в разделе 6.4 (пример 4)) и мышинового GAPDH (mm99999915_g1, Thermo Fisher Scientific) были коммерчески доступны. Как показано на **Фиг. 17А**, относительный транскрипт дистрофина дикого типа у наивных мышей В6 составлял $1 \pm 0,64$, а экспрессия мРНК дистрофина дикого типа у мышей *mdx* составляла $1,55 \pm 0,77$ ($p = 0,15$, $n = 4$). Относительная мРНК μ -дистрофина у получавших лечение животных была следующей: мышца, получавшая RGX-DYS1, $22,66 \pm 11,6$

($p < 0,01$, $n = 5$); получавшая RGX-DYS5, $16,83 \pm 11,07$ ($p = 0,06$, $n = 3$) и получавшая RGX-DYS3 мышца, $11,87 \pm 7,90$ ($p < 0,05$, $n = 4$). Эти данные демонстрировали, что доставка векторов μ -дистрофина в группах RGX-DYS1, RGX-DYS5 и RGX-DYS3 генерировала намного более высокий уровень транскриптов μ -дистрофина, чем уровень транскриптов дистрофина дикого типа. Кроме того, количество копий мРНК μ -дистрофина нормировали к количеству копий генома вектора AAV на клетку, а мРНК дистрофина ДТ нормировали к количеству копий генома на клетку (2 копии на клетку) в дополнение к нормализации GAPDH. Как показано на **Фиг. 17В**, все группы демонстрировали по существу одинаковые уровни экспрессии мРНК в расчете на геном ($n=3-5$, $p>0,05$). Это указывало на то, что специфичный для мышц промотор Spc5-12, управляющий экспрессией трансгенов AAV- μ -дистрофина, был столь же мощным, как и нативный промотор дистрофина в клетках скелетных мышц мыши.

6.7.2. Экспрессия μ -дистрофина по иммунофлуоресцентному (IF) окрашиванию и ассоциации белкового комплекса, ассоциированного с дистрофином (DAPC)

[00229] Затем было проведено иммунофлуоресцентное (IF) окрашивание для изучения экспрессии дистрофина и ассоциированных с дистрофином белковых комплексов, включая дистробревин, β -дистрогликан, синтрофин и nNos, на икроножных мышцах из разных групп. Протокол IF окрашивания и применяемые антитела были такими же, как описано ранее в разделе 6.5 данного документа (Пример 5). Как показано на **Фиг. 18**, белок дистрофин и исследованные белки DAPC отсутствовали в необработанной мышце *mdx*, в то время как они сильно присутствовали на мышечной мембране В6 дикого типа. Для всех трех получавших лечение групп белок μ -дистрофин экспрессировался почти на 100% мышечных волокон, и они были неразличимы среди различных групп лечения. В трех группах лечения наблюдалось восстановление экспрессии дистробревина на мышечных мембранах с очень похожим наблюдаемым профилем. Что касается окрашивания β -дистрогликана, мышцы в группе, получавшей RGX-DYS1, демонстрировали более равномерное и более интенсивное окрашивание β -дистрогликана (экспрессию).

[00230] Более резкое различие между группами лечения наблюдалось в окрашивании синтрофина. Экспрессия синтрофина на мышечной мембране была значительно повышена в группе RGX-DYS1, которая содержит более длинный μ -дистрофин, за которой следуют RGX-DYS5 и RGX-DYS3 (**Фиг. 18** и **Фиг. 19А**). Та же тенденция была дополнительно подтверждена анализом методом вестерн-блоттинга мышечных лизатов (**Фиг. 19В**). Вестерн-блоттинг против синтрофина проводили на лизате ткани скелетных мышц (ткань икроножной мышцы от 3 каждой из получавших и не получавших лечение групп *mdx* и одна икроножная мышца и два трехглавой мышцы были от группы мышцей В6). Использовали поликлональное антитело к синтрофину (Abcam, ab11187) в соотношении 1:10000, инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. Кроличьи моноклональные антитела к α -актину (ab68167, Abcam) применяли в разведении 1:5000. Наносили вторичное козье антитело к Ig кролика (Thermo Fisher Scientific, кат. № A-10685). Отношение экспрессии синтрофина к экспрессии эндогенного контрольного актина в мышцах ДТ составляло $4,56 \pm 0,76$ ($n = 3$, $p < 0,001$ по однофакторному дисперсионному анализу) по сравнению с группой *mdx* ($0,84 \pm 0,22$). Соотношение в группах RGX-DYS1 и RGX-DYS5 составляло $2,72 \pm 0,97$ ($n = 3$, $p < 0,05$ по сравнению с группой *mdx*) и $1,35 \pm 0,03$, соответственно, (**Фиг. 19С**). Уровень экспрессии синтрофина в скелетных мышцах дополнительно исследовали на общих экстрактах мышечной мембраны с помощью вестерн-блоттинга. Общий белок скелетных мышц экстрагировали с использованием набора для экстракции мембранного белка Mem-Per Plus (кат. № 89842, Thermo Fisher) (ткань икроножной мышцы из каждой группы

mdx, получавшей и не получавшей лечение, и четырехглавую мышцу бедра из группы мышцей В6). В каждую дорожку загружали 20 мкг общего мембранного белка (Фиг. 19D). Поликлональное антитело к синтрофину (Abscam, ab11187) использовали при инкубации 1:10000 при 4°C в течение ночи. Поликлональное антитело к актину для контроля для нанесения (PA5-78715, Thermo Fisher) применяли в разведении 1:10000 для инкубации в течение ночи при 4 °C. Немного отличаясь от экспериментов с целым лизатом с применением вестерн-блоттинга, где мышца ДТ демонстрировала самый высокий уровень экспрессии синтрофина, вестерн-блоттинг общего мембранного белка продемонстрировал самую высокую относительную экспрессию синтрофина в группе RGX-DYS1 ($0,81 \pm 0,26$, $n = 3$), за которой следовала группа В6_ДТ ($0,6623 \pm 0,05$, $n=3$), группа RGX-DYS3 ($0,59 \pm 0,08$) и группа *mdx* ($0,32 \pm 0,07$, $n=3$), как показано на Фиг. 19E. Эти результаты ясно продемонстрировали, что μ -дистрофины, генерируемые векторами μ -дистрофина, были способны восстанавливать экспрессию синтрофина мышечной мембраны, а более длинная версия RGX-DYS1 обладает более высокой способностью закреплять синтрофин на мышечной мембране, чем короткая версия RGX-DYS3.

[00231] Вестерн-блоттинг pNOS проводили аналогичным образом с использованием мышечных мембран (группы ткани икроножной мышцы/*mdx*, и четырехглавой мышцы/В6). Общий белок мышечной мембраны экстрагировали с использованием набора для экстракции мембранного белка Mem-Pep Plus (кат. № 89842, Thermo Fisher). 20 мкг общего мембранного белка загружали в каждую дорожку ДСН-ПААГ геля. Первичное антитело против pNOS (SC-5302, Santa Cruz Biotechnology) использовали в разведении 1:500, а поликлональное антитело к актину (PA5-78715, Thermo Fisher) применяли в разведении 1:10000. Наносили вторичное козье антитело к IgG мыши, HRP (62-6520, ThermoFisher). Что касается экспрессии pNOS, мы наблюдали заметную разницу между изображениями для групп RGX-DYS1 и RGX-DYS3 после окрашивания IF (Фиг. 20A). Однако результаты вестерн-блоттинга не выявили каких-либо существенных различий между RGX-DYS1, RGX-DYS3 и не получавшей лечение группой *mdx* (Фиг. 20B-C), что указывает на низкое восстановление pNOS с помощью вектора RGX-DYS1.

[00232] В целом, доставка векторов RGX-DYS1, RGX-DYS3 и RGX-DYS5 мышцам *mdx* приводила к надежной экспрессии μ -дистрофина и восстановлению ассоциированных с дистрофином белковых комплексов (DAPC). Более длинная версия вектора RGX-DYS1 усиливала восстановление DAPC, особенно синтрофина и β -дистрогликана. Способность восстанавливать pNOS в мембранном DAPC вектором RGX-DYS1 была низкой, но заметной при окрашивании IF.

6.8 Пример 8- Трансдукция сателлитных клеток и улучшение регенерации мышечной дистрофии с помощью вектора RGX-DYS1

[00233] Стволовые клетки скелетных мышц, или сателлитные клетки (СК), в норме находятся в состоянии покоя и располагаются между базальной пластинкой и сарколеммой миофибрилл. Во время роста и после повреждения мышц активируется миогенная программа СК, и СК самообновляются для поддержания своего пула и/или дифференцируются с образованием миобластов и, в конечном счете, миофибрилл. Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) хорошо известны для трансдукции дифференцированных миофибрилл, поэтому мы исследовали, могут ли сателлитные клетки трансдуцироваться векторами AAV. Сателлитные клетки имеют небольшие размеры и очень мало цитоплазмы, поэтому изучение экспрессии

трансгенов в этих клетках является технически сложной задачей. Здесь мы применили RNAscore, чтобы выяснить, может ли AAV преобразовывать сателлитные клетки. RNAscore представляет собой передовую технологию гибридизации *in situ* (ISH), которая обеспечивает одновременное усиление сигнала и подавление фонового шума, что позволяет визуализировать экспрессию гена отдельной молекулы непосредственно в интактной ткани с разрешением одной клетки. Мультиплексный флуоресцентный анализ RNAscore использовали с зондом AAV μ -дистрофина, меченным флуорофором, Opal 570 (красный), и маркером сателлитных клеток мышц, *rax7*, меченным флуорофором, Opal 520 (зеленый). Мультиплексный флуоресцентный анализ RNAscore трансгена AAV и экспрессии мРНК *Rax7* был выполнен в Advanced Cell Diagnostics Inc (Ньюарк, Калифорния). Общую РНК экстрагировали из скелетных мышц с использованием мини-набора RNeasy® Fibrous Tissue Mini (Qiagen, кат. № 74704), а кДНК синтезировали с помощью набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit с ингибитором РНКазы (Applied Biosystems, кат. № 4374966). Абсолютное количество копий мРНК μ -дистрофина и эндогенной контрольной мРНК GAPDH измеряли с помощью цифровой ПЦР (система Naica Crystal Digital PCR, Stilla Technologies). Праймеры и зонд против μ -дистрофина были такими же, как описано ранее. Набор праймеров и зондов *rax7* для мышей (зонд TaqMan™ MGB, Applied Biosystems, кат. № 4316034) был куплен на коммерческой основе.

[00234] Как показано на **Фиг. 21А-В**, красный цвет (левая панель, **Фиг. 21А**) указывает на сигнал μ -дистрофина (либо экспрессия мРНК, либо присутствие генома AAV), а зеленый цвет обозначает *rax7*+ сателлитные клетки (обозначены стрелками на **Фиг. 21А-В**). Синий цвет при окрашивании DAPI (левая и правая панели, **Фиг. 21А-В**) указывает на окрашивание ядер. Колокализация зеленого, красного и синего (белая стрелка) представляла трансдукцию вектором AAV-DMD мышечных сателлитных клеток, в то время как только зеленые и синие клетки (белая стрелка с черными линиями) указывали на сателлитные клетки без трансдукции AAV. Подсчитывали сателлитные клетки, трансдуцированные μ -дистрофином, и рассчитывали скорость трансдукции сателлитных клеток. В трансдуцированных AAV- μ -dys скелетных мышцах частота трансдукции сателлитных клеток составляла $23 \pm 1,5\%$ (**Фиг. 21С**). Указанный вектор AAV был способен трансдуцировать мышечные сателлитные клетки, хотя и с гораздо более низкой частотой трансдукции, чем зрелые миофибриллы.

[00235] Затем на изображениях RNAscore подсчитывали общее количество *rax7*+ сателлитных клеток, чтобы выяснить, было ли количество сателлитных клеток одинаковым в разных группах лечения. Как показано на **Фиг. 21D**, количество положительных по *rax7* клеток на изображение у не получавших лечение *mdx* составляло $39,12 \pm 15,14$, а количество положительных клеток у мышей B6 дикого типа и мышей, получавших лечение вектором DMD, составляло $11,87 \pm 3,23$ (было подсчитано 8 изображений, $p < 0,0001$ по однофакторному дисперсионному анализу) и $14,66 \pm 5,91$ (было подсчитано 12 изображений, $p < 0,0001$ по однофакторному дисперсионному анализу), соответственно. Увеличение числа сателлитных клеток в необработанной мышце *mdx* указывало на регенеративный характер мышечной дистрофии. Доставка μ -дистрофина с помощью вектора RGX-DYS1 обращала эту патологию вспять и облегчала регенерацию мышц.

[00236] В дополнение к анализу с помощью технологии RNAscore мы выделили общую мышечную РНК и осуществили синтез кДНК. Общую РНК экстрагировали из скелетных мышц с использованием мини-набора RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen кат. № 74704), и кДНК синтезировали с помощью набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit с ингибитором РНКазы (Applied Biosystems, кат. № 4374966). Образцы подвергали анализу кПЦР с использованием специфических для мышинового *rax7* праймеров и

наборов зондов (имеющихся в продаже: mm01354484_m1 Pax7, Thermo Fisher Scientific; и зонд TaqMan™ MGB от Applied Biosystems, кат. № 4316034, соответственно). Праймеры и набор зондов GAPDH мыши использовали для нормализации введения РНК и кДНК. Абсолютное количество копий мРНК μ -дистрофина и эндогенной контрольной мРНК GAPDH измеряли с помощью цифровой ПЦР (система Naica Crystal Digital PCR, Stilla Technologies). Отношение количества копий мРНК *pax7* к количеству копий мРНК GAPDH сравнивали между группами (Фиг. 21Е). Как и ожидалось, относительная экспрессия *pax7* у мышей *mdx* составила $7,56 \pm 3,14$, что намного выше, чем у мышей ДТ-В6 ($1 \pm 0,68$, $n = 5$, $p < 0,001$ по однофакторному дисперсионному анализу). Относительная экспрессия *pax7* в трех разных группах, получавших вектор μ -дистрофина, была значительно снижена ($4,40 \pm 1,50$ для RGX-DYS5 ($n = 3$, $p = 0,06$), $3,12 \pm 0,74$ для группы RGX-DYS3 ($n = 5$, $p < 0,01$), $2,98 \pm 0,68$ для RGX-DYS1 ($n = 5$, $p < 0,01$). Снижение экспрессии мРНК *pax7* с помощью метода кцПЦР согласуется с выводами технологии RNAscope, что еще раз доказывает, что один из терапевтических механизмов, опосредованных настоящими векторами μ -дистрофина в мышечной дистрофической мышце, заключается в улучшении регенерации мышц.

6.9 Пример 9- Конструирование дополнительных кассет экспрессии генов микродистрофина (DMD).

[00237] Для потенциального дальнейшего улучшения функции μ -дистрофина и уменьшения общего размера трансгена (т.п.н.) было рекомбинантно сконструировано несколько дополнительных конструкций μ -дистрофина (Фиг. 22). Для RGX-DYS6 (SEQ ID NO: 91) прибл. 50 аминокислот в богатом цистеином (CR короткий, SEQ ID NO: 90) домене удаляли, чтобы уменьшить размер генома AAV для эффективной упаковки. Для RGX-DYS7 (SEQ ID NO: 92) nNOS-заякоренные домены в виде спектриновых повторов R16 и R17 (SEQ ID NO: 86 и 87) были вставлены между областью R2 и R24 с использованием предыдущих конструкций в качестве каркаса для рекомбинантной инженерии. RGX-DYS8 (SEQ ID NO: 93) подобен RGX-DYS7 в том, что были вставлены nNOS-заякоренные домены R16 и R17, но С-концевой домен (CT) был удален для уменьшения размера вектора AAV.

[00238] Все цис-плазмиды μ -дистрофина упаковывали в векторы AAV8, и векторы (2×10^5 гк/клетка) инфицировали на дифференцированных миотрубочках C2C12, как описано в разделе 6.2 (пример 2). Через пять дней после инфицирования клетки собирали и подвергали вестерн-блоттингу с использованием первичного антитела к дистрофину (MANEX1011B(1C7), как описано в данном документе для обнаружения белка μ -дистрофина. Все используемые способы аналогичны описанным в разделе 6.7 (Пример 7). Как показано на Фиг. 23А, вектор AAV, несущий различные версии μ -дистрофина, генерировал белки μ -дистрофина разной длины, а их размеры были такими, как ожидалось. Два заслуживающих внимания наблюдения: 1) В целом, более длинные версии белков μ -дистрофина имели более выраженные полосы (Фиг. 23А-В). Уровень экспрессии мРНК μ -дистрофина, исследованный методом кцПЦР (Фиг. 23С), не коррелировал с уровнем экспрессии белка, что указывает на то, что более выраженные полосы, образованные более длинной версией μ -дистрофина, не были вызваны повышением экспрессии мРНК, а скорее всего, вызваны повышенной стабильностью белка. 2) RGX-DYS6 μ -дистрофина был особенно нестабилен по сравнению с другими. Мы пришли к выводу, что делеция 50 аминокислот в домене CR может повлиять на стабильность μ -дистрофина.

[00239] Хотя изобретение подробно описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, следует понимать, что варианты, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема этого изобретения. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые показаны и описаны в данном документе, станут очевидны специалистам в данной области техники из вышеприведенного описания и сопроводительных графических материалов. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения. Специалистам в данной области техники станет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, существование многочисленных эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Такие эквиваленты должны охватываться следующей формулой изобретения.

[00240] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

[00241] Приведенное в данном документе обсуждение обеспечивает лучшее понимание природы проблем, стоящих перед данной областью техники, и никоим образом не должно толковаться как признание предшествующего уровня техники, равно как и цитирование какой-либо ссылки в данном документе не должно толковаться как признание того, что такая ссылка представляет собой «предшествующий уровень техники» для данной заявки.

[00242] Все ссылки, включая заявки на патенты и публикации, приведенные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, или патент, или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки во всей своей полноте. Многие модификации и вариации настоящего изобретения могут быть выполнены без отклонения от его сущности и объема, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Описанные в данном документе конкретные варианты осуществления предлагаются только в качестве примера, и изобретение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые эта формула изобретения имеет право.

Формула изобретения:

1. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин, причем белок микродистрофин содержит или состоит из доменов дистрофина, расположенных от аминоконца к карбокси-концу: ABD-N1-R1-R2-R3-N3-R24-N4-CR-CT, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, N1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R3 представляет собой область спектрина 3 дистрофина, N3 представляет собой область шарнира 3 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, N4 представляет собой область шарнира 4 дистрофина, CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина или его часть, связывающую β -дистрогликан, а CT представляет собой С-концевую область дистрофина или часть С-концевой области, содержащая сайт связывания $\alpha 1$ -синтрофина или сайт связывания дистрофина.

2. Композиция нуклеиновой кислоты по п. 1 (1), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, 79 или 91, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, кодирующей терапевтически функциональный белок микродистрофин, или (2) содержащая или состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 20, 81 или 100, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует терапевтически функциональный белок микродистрофин.

3. Композиция нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что (1) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен CT, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 35 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, и увеличивает связывание белка микродистрофина с $\alpha 1$ -синтрофином и/или дистробревином по сравнению с эталонным микродистрофином, который не имеет последовательности домена CT; при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен CT, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 70 или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, и увеличивает связывание белка микродистрофина с $\alpha 1$ -синтрофином и/или дистробревином по сравнению с эталонным микродистрофином, который не имеет последовательности домена CT; или при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая минимальный домен CT, или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 80, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней, или ее обратно комплементарной цепью, и увеличивает связывание белка микродистрофина с $\alpha 1$ -синтрофином по сравнению с эталонным микродистрофином, который не имеет последовательности домена CT; или (2) нуклеиновая кислота, кодирующая домен CT, кодирует аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16 или 83, или домен CT, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

4. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую интрон (I), соединенный с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок микродистрофин, причем белок микродистрофин содержит или состоит из доменов дистрофина,

расположенных от amino-конца к карбокси-концу: ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, H1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R3 представляет собой область спектрина 3 дистрофина, H3 представляет собой область шарнира 3 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, H4 представляет собой область шарнира 4 дистрофина, CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина.

5. Композиция нуклеиновой кислоты по п. 4 (1), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, или (2) содержащая или состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, где нуклеиновая кислота кодирует терапевтически функциональный дистрофин.

6. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что (1) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен CR, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 34 или 69, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, и увеличивает связывание белка микродистрофина с β -дистрогликаном по сравнению с эталонным белком микродистрофином, который не имеет последовательности домена CR; (2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен CR, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 100 или 109, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, и увеличивает связывание микродистрофина с β -дистрогликаном по сравнению с эталонным белком микродистрофином, который не имеет последовательности домена CR; или (2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домен CR, кодирует домен CR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или 90.

7. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ABD, состоит из SEQ ID NO: 22 или 57, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 22 или 57; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H1, состоит из SEQ ID NO: 24 или 59, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 24 или 59; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R1, состоит из SEQ ID NO: 26 или 61, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 26 или 61; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R2, состоит из SEQ ID NO: 27 или 62, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 27 или 62; последовательность нуклеиновой

кислоты, кодирующая R3, состоит из SEQ ID NO: 29 или 64, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 29 или 64; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H2, состоит из SEQ ID NO: 38 или последовательности, которая имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 38; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H3, состоит из SEQ ID NO: 30 или 65, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 30 или 65; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая R24, состоит из SEQ ID NO: 32 или 67, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32 или 67; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая H4, состоит из SEQ ID NO: 33 или 68, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 33 или 68; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CR, состоит из SEQ ID NO: 34, 69, 100 или 109, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 34, 69, 100 или 109; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CT, если она присутствует, состоит из SEQ ID NO: 35, 70, или 80, или последовательности, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 35, 70 или 80; и, необязательно, последовательность нуклеиновой кислоты I представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 41, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 41, связанной на 5'-конце последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей микродистрофин.

8. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует ABD, состоит из SEQ ID NO: 22 или 57; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H1, состоит из SEQ ID NO: 24 или 59; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R1, состоит из SEQ ID NO: 26 или 61; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R2, состоит из SEQ ID NO: 27 или 62; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R3, состоит из SEQ ID NO: 29 или 64; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H2, состоит из SEQ ID NO: 38; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H3, состоит из SEQ ID NO: 30 или 65; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует H4, состоит из SEQ ID NO: 33 или 68; последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует R24, состоит из SEQ ID NO: 32 или 67; последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CR, состоит из SEQ ID NO: 34, 69, 100, или 109; I состоит из SEQ ID NO: 41; и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CT, состоит из SEQ

ID NO: 35, 70 или 80.

9. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что белок микродистрофин содержит или состоит из последовательностей дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу: ABD-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R3-H3-L4-R24-H4-CR-CT или ABD-L1-H1-L2-R1-R2-L3-R3-H3-L4-R24-H4-CR, где L1, L2, L3, и L4 представляют собой линкеры.

10. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L1, содержит или состоит из SEQ ID NO: 23 или 58, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L2, содержит или состоит из SEQ ID NO: 25 или 60, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L3, содержит или состоит из SEQ ID NO: 28 или 63, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая L4, содержит или состоит из SEQ ID NO: 31, 36, 37, 66, 71 или 72.

11. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин, где белок микродистрофин содержит или состоит из доменов дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу: ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, H1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R16 представляет собой область спектрина 16 дистрофина, R17 представляет собой область спектрина 17 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, H4 представляет собой область шарнира 4 дистрофина, а CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина

12. Композиция нуклеиновой кислоты по п. 11, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую домен CT, который содержит сайт связывания $\alpha 1$ -синтрофина и/или сайт связывания дистробревина на C-конце домена CR.

13. Композиция нуклеиновой кислоты по п. 11 или п. 12 (1), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок микродистрофин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92 или 93, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, или (2) содержащая или состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 102 или 103, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая имеет по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности с ней или ее обратно комплементарной цепью, где нуклеиновая кислота кодирует терапевтически функциональный дистрофин.

14. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–3 или 6–13, дополнительно содержащая интрон (I), связанный с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок микродистрофин, необязательно, где I представляет собой интрон 4 (VH4) вариабельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина человека, или интрон SV40, или химерный интрон, расположенный на 5'-конце последовательности, кодирующей микродистрофин.

15. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота представляет собой вектор нуклеиновой кислоты, содержащий регуляторный элемент транскрипции, который способствует экспрессии в мышечной ткани и/или ткани ЦНС, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок микродистрофин.

16. Композиция нуклеиновой кислоты по п. 15, отличающаяся тем, что промотор представляет собой SPc5-12 или его транскрипционно активную часть.

17. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность вектора AAV, содержащую от 5' до 3': (i) ITR AAV - регуляторный элемент транскрипции - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домены микродистрофина, расположенные от N-конца к С-концу, ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR-CT- последовательность полиаденилирования - ITR AAV; (ii) ITR AAV - регуляторный элемент транскрипции - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домены микродистрофина, расположенные от N-конца к С-концу, ABD-H1-R1-R2-R3-H3-R24-H4-CR - последовательность полиаденилирования - ITR AAV; (iii) ITR AAV - регуляторный элемент транскрипции - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домены микродистрофина, расположенные от N-конца к С-концу, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR-CT- последовательность полиаденилирования - ITR AAV; или (iv) ITR AAV - регуляторный элемент транскрипции - последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая домены микродистрофина, расположенные от N-конца к С-концу, ABD-H1-R1-R2-R16-R17-R24-H4-CR - последовательность полиаденилирования - ITR AAV, где ITR AAV необязательно представляет собой ITR AAV2.

18. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность кодон-оптимизирована и/или истощена в отношении последовательностей CpG.

19. Композиция нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 53, 54, 55, 56, 82, 104, 105 или 106

20. Частица гAAV, содержащая кассету экспрессии, содержащую композицию нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов.

21. Частица гAAV по п. 20, отличающаяся тем, что указанный капсидный белок имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 77 (капсид AAV8), имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 78 (капсид AAV9), или имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество частицы гAAV по п. 20 или п. 21 и фармацевтически приемлемый носитель.

23. Способ доставки трансгена в клетку, причем указанный способ включает приведение в контакт указанной клетки с частицей гAAV по п. 20 или п. 21, при этом указанную клетку приводят в контакт с вектором.

24. Фармацевтическая композиция для лечения дистрофинопатии у человека, нуждающегося в этом, содержащая терапевтически эффективное количество частицы гAAV по п. 20 или п. 21, необязательно при этом указанная частица гAAV составлена для введения в кровоток, мышечную ткань или ЦНС указанного субъекта.

25. Способ лечения дистрофинопатии у нуждающегося в этом человека, причем указанный способ включает:

введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество частицы гAAV по п. 20 или п. 21, при этом указанное введение приводит к доставке белка

микродистрофина в мышцу или ЦНС указанного субъекта.

26. Фармацевтическая композиция или способ по п. 24 или п. 25, отличающиеся тем, что дистрофинопатия представляет собой МДД, МДБ, X-сцепленную дилатационную кардиомиопатию, или субъект является женщиной-носителем МДД или МДБ.

27. Белок микродистрофин, содержащий или состоящий из доменов дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу, ABD-N1-R1-R2-R3-N3-R24-N4-CR-CT, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, N1 представляет собой область шарнира 1 дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R3 представляет собой область спектрина 3 дистрофина, N3 представляет собой область шарнира 3 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина, а CT представляет собой по меньшей мере часть C-концевой области дистрофина, содержащую сайт связывания α 1-синтрофина, сайт связывания дистробревина.

28. Белок микродистрофин по п. 27, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, 79 или 91.

29. Белок микродистрофин, содержащий или состоящий из доменов дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу: ABD-N1-R1-R2-R16-R17-R24-N4-CR, где ABD представляет собой актинсвязывающий домен дистрофина, N1 представляет собой область 1 шарнира дистрофина, R1 представляет собой область спектрина 1 дистрофина, R2 представляет собой область спектрина 2 дистрофина, R16 представляет собой область спектрина 16 дистрофина, R17 представляет собой область спектрина 17 дистрофина, R24 представляет собой область спектрина 24 дистрофина, а CR представляет собой богатую цистеином область дистрофина.

30. Белок микродистрофин по п. 29, содержащий или состоящий из доменов дистрофина, расположенных от amino-конца к карбокси-концу ABD-N1-R1-R2-R16-R17-R24-N4-CR-CT, где CT представляет собой по меньшей мере часть C-концевой области дистрофина, содержащую сайт связывания α 1-синтрофина или сайт связывания дистрофина.

31. Белок микродистрофин по п. 29 или п. 30, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 или 93.

32. Способ лечения дистрофинопатии у нуждающегося в этом человека, включающий доставку в кровотоки, мышечную ткань и/или спинномозговую жидкость указанного субъекта-человека терапевтически эффективного количества белка микродистрофина по любому из пп. 27–31.

33. Фармацевтическая композиция для лечения дистрофинопатии у человека, содержащая терапевтически эффективное количество белка микродистрофина по любому из пп. 27–31, составленная для доставки в кровотоки, мышечную ткань и/или спинномозговую жидкость указанного человека.

34. Способ получения рекомбинантных AAV, включающий:

(а) культивирование клетки-хозяина, содержащей:

(i) искусственный геном, содержащий цис-кассету экспрессии, при этом цис-кассета экспрессии содержит композицию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 17–19;

(ii) транс-кассету экспрессии, не содержащую ITR AAV, при этом транс-кассета экспрессии кодирует белок гер и капсида AAV, функционально связанные с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией белков гер и капсида AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивает белки

гер и капсида в транс-положении;

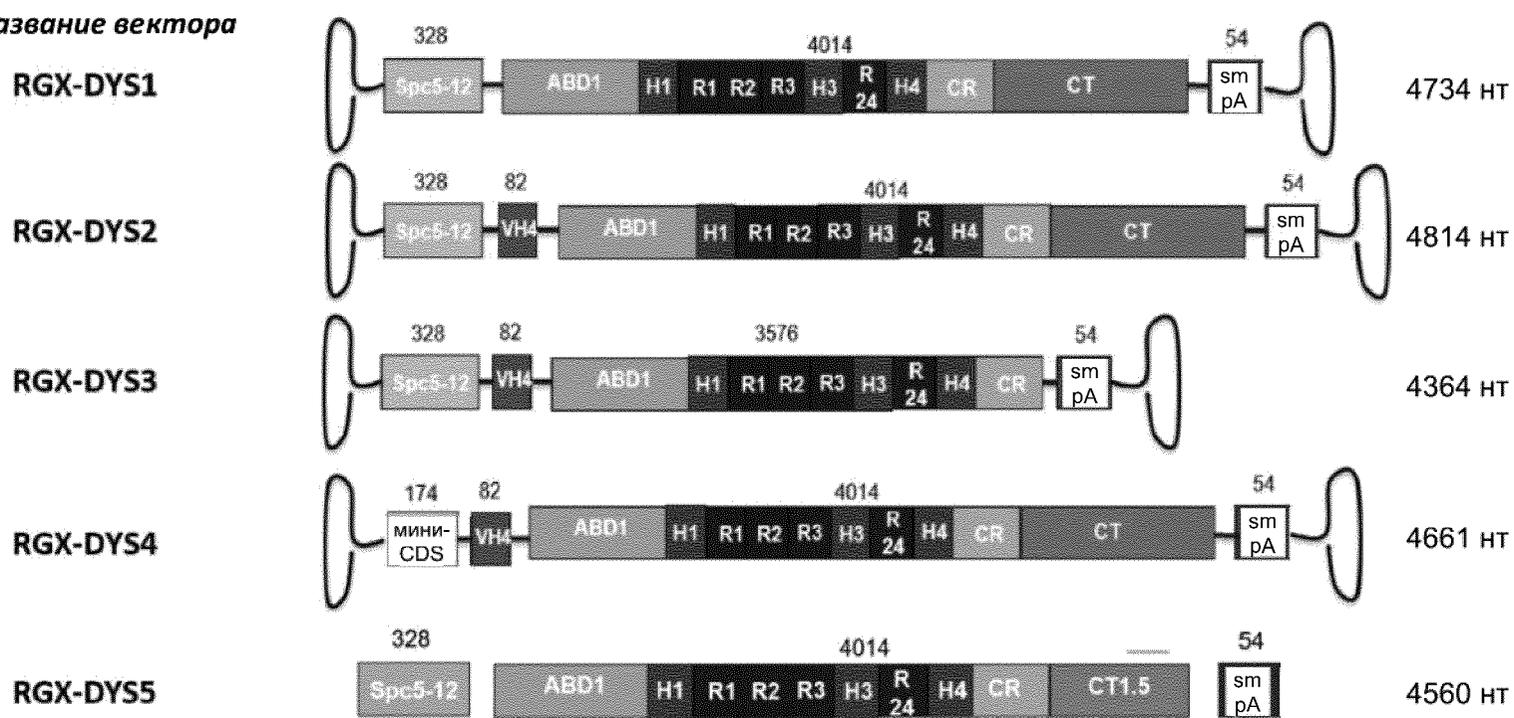
(iii) достаточные хелперные функции аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома белками капсида AAV; и

(b) выделение рекомбинантного AAV, инкапсулирующего искусственный геном, из культуры клеток.

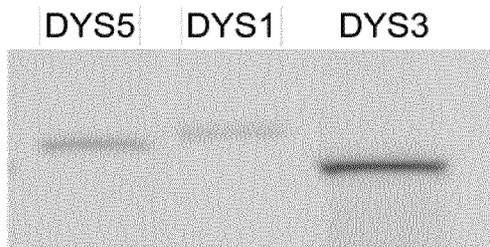
35. Клетка-хозяин, содержащая:

- a. искусственный геном, содержащий цис-кассету экспрессии, при этом цис-кассета экспрессии содержит композицию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 17–19;
- b. транс-кассету экспрессии, не содержащую ITR AAV, при этом транс-кассета экспрессии кодирует белок гер и белок капсида AAV, функционально связанные с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией белков гер и капсида AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивает белки гер и капсида в транс-положении; и
- c. достаточные хелперные функции аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома белками капсида AAV.

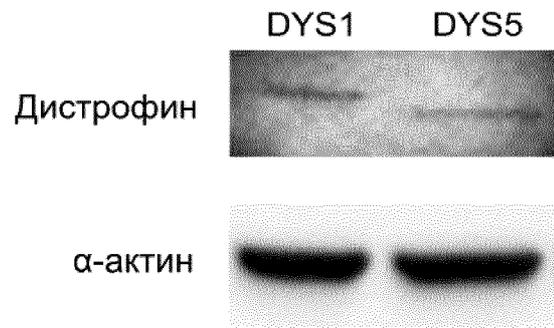
Название вектора



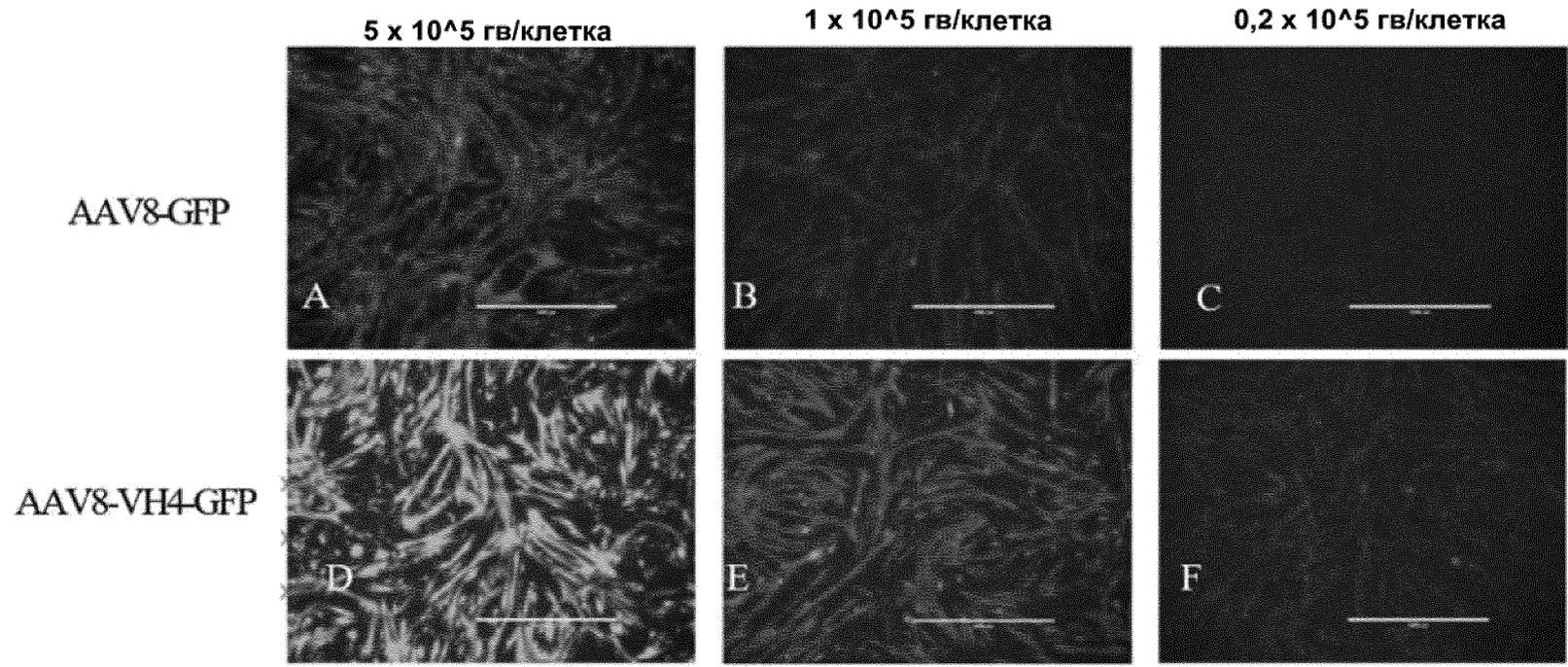
Фиг. 1А



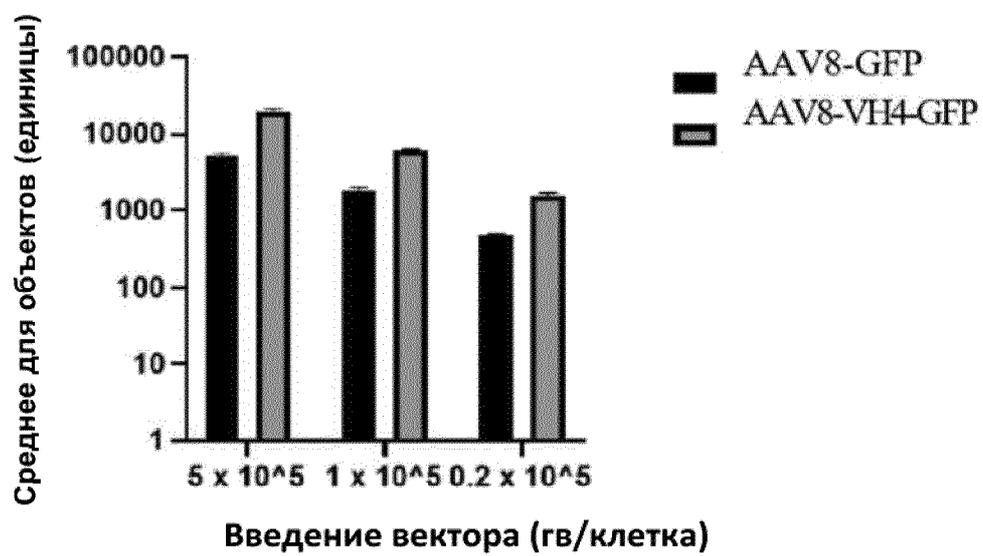
Фиг. 1В



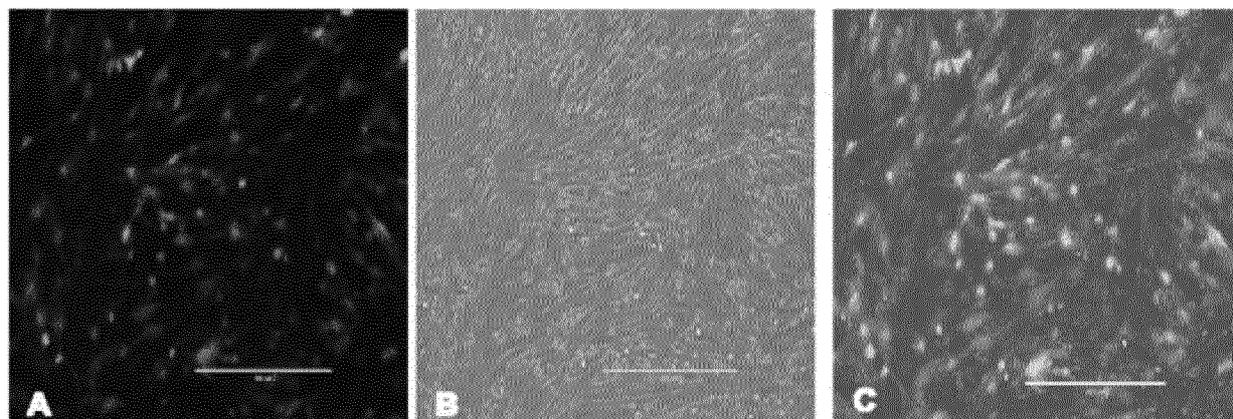
Фиг. 1С



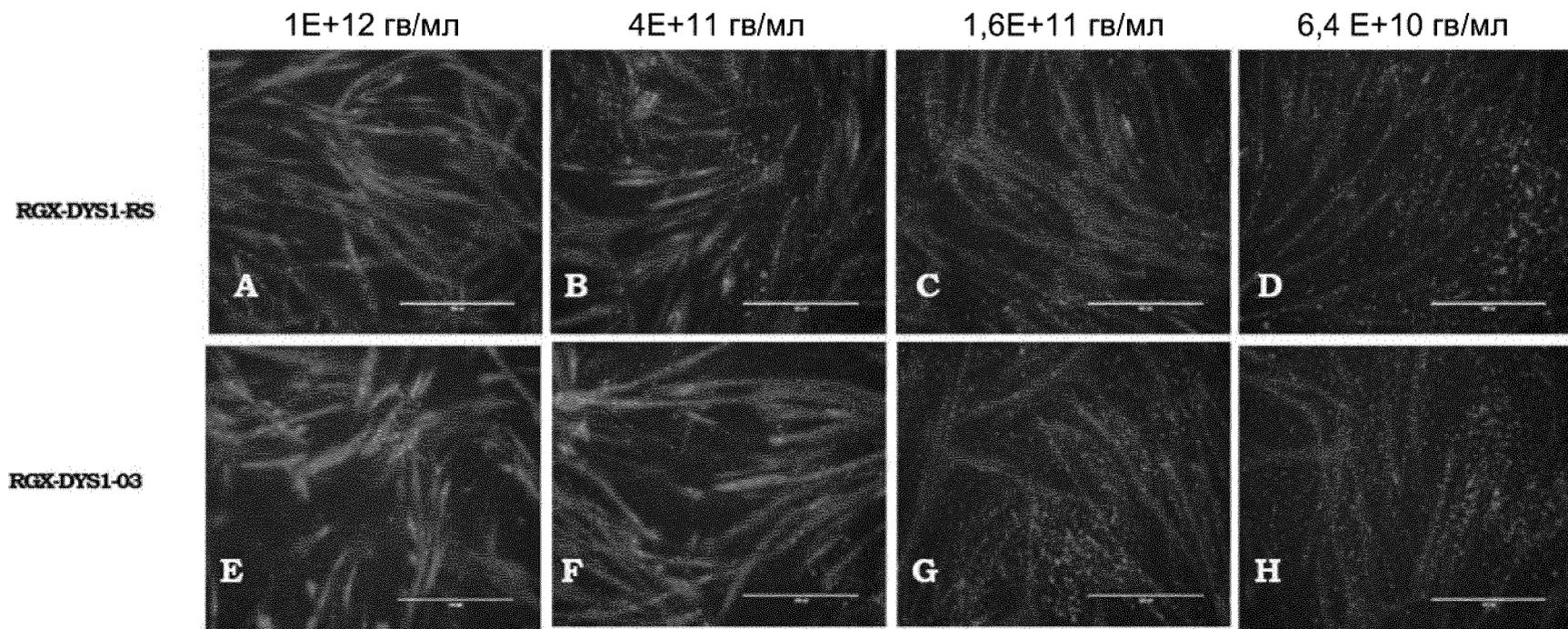
Фиг. 2



Фиг. 3



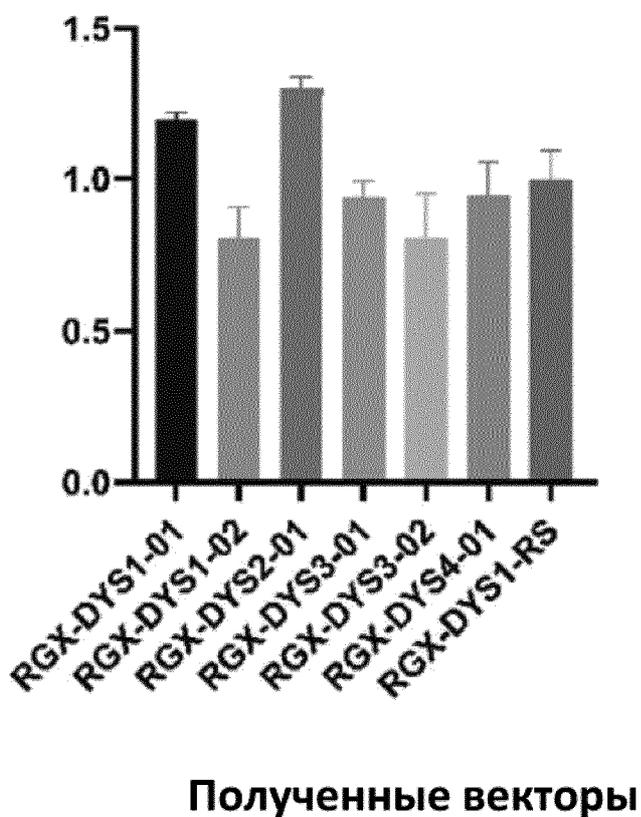
Фиг. 4



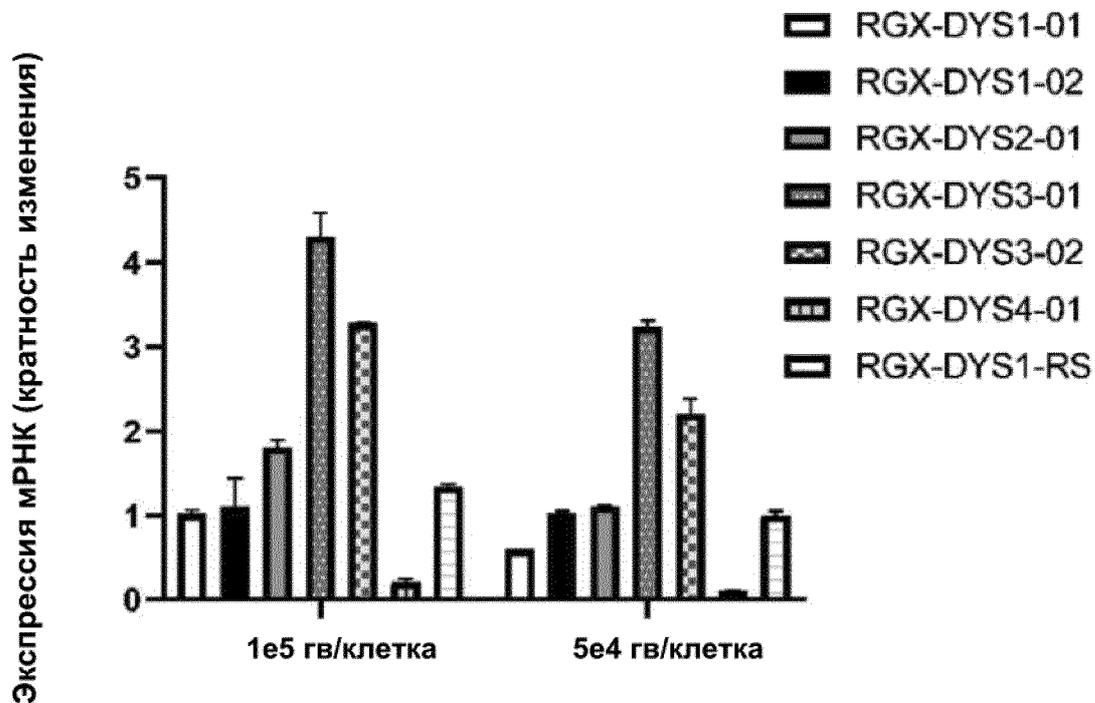
Фиг. 5

Число копий вектора/Эталонный контроль (кратность изменения)

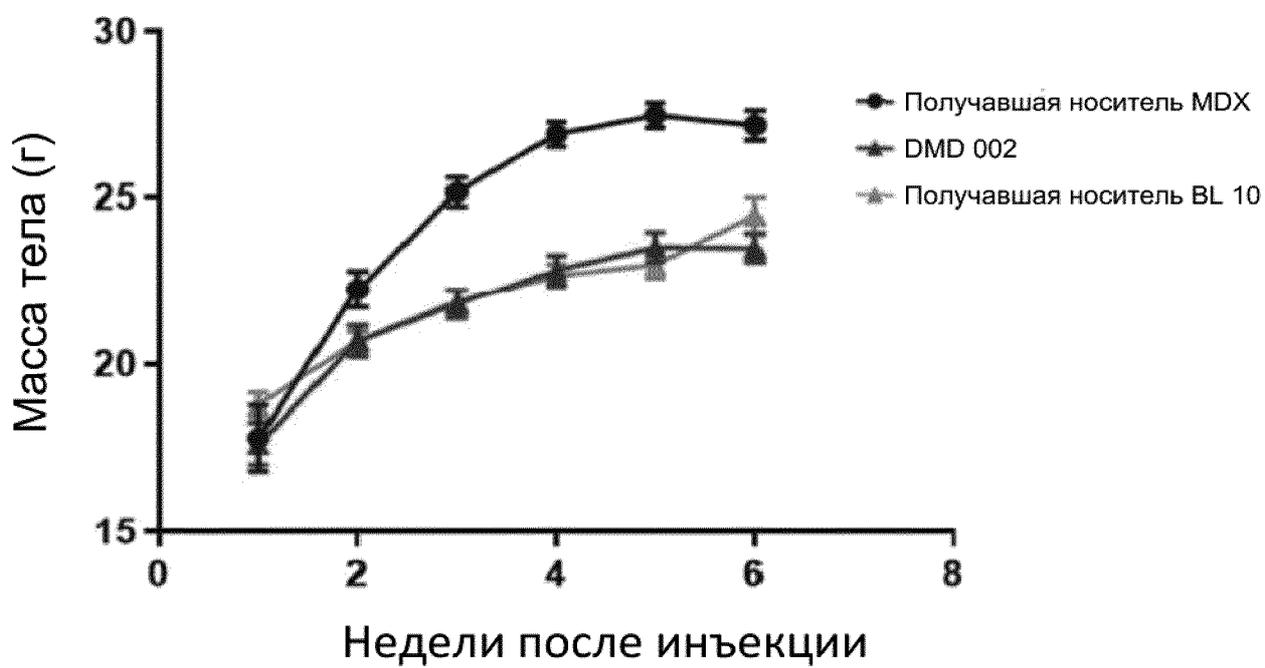
Копии ДНК векторов C2C12 - кратность изменения



Фиг. 6

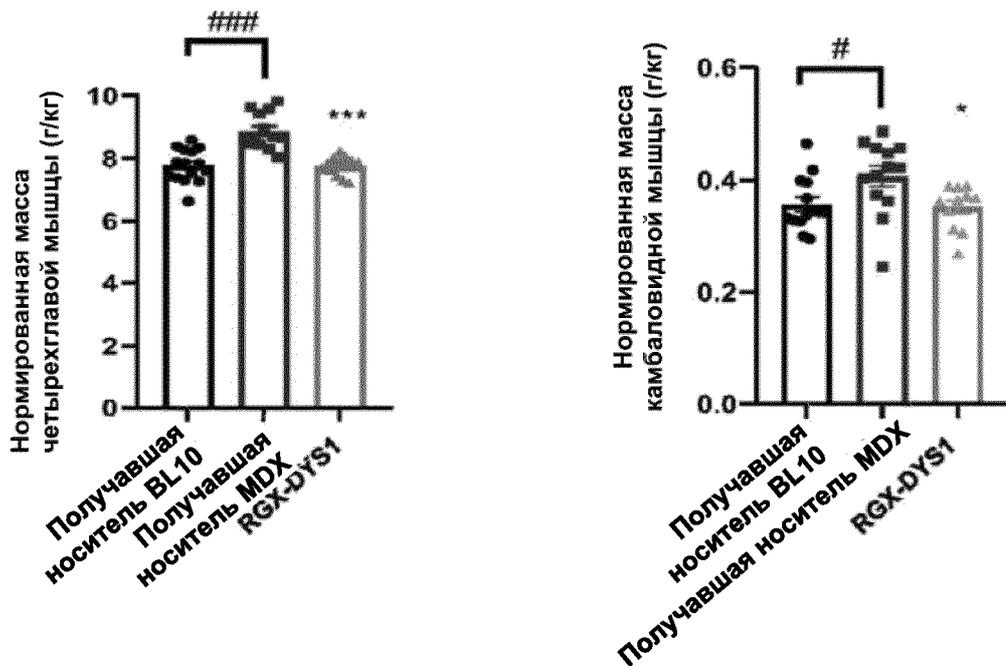


Фиг. 7



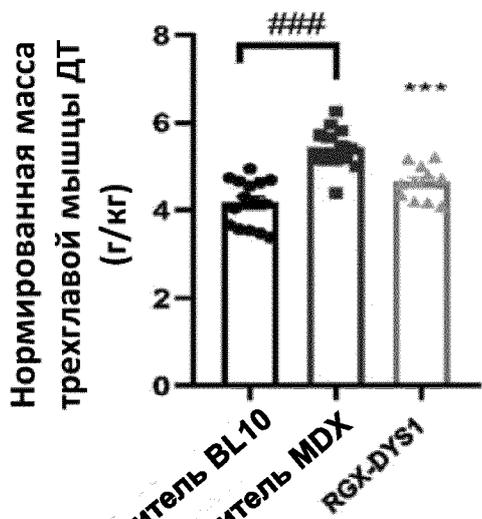
Фиг. 8

Нормированная масса четырехглавой мышцы Нормированная масса камбаловидной мышцы

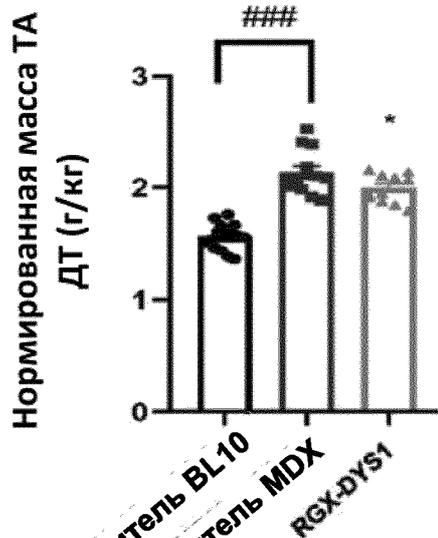


Фиг. 9А

Нормированная масса трехглавой мышцы



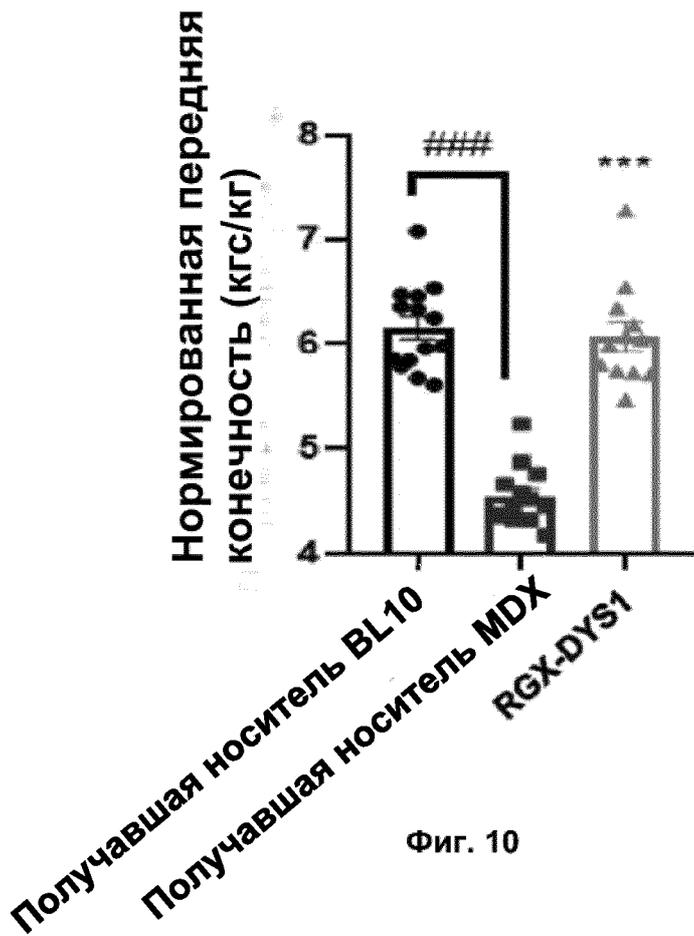
Нормированная масса ТА



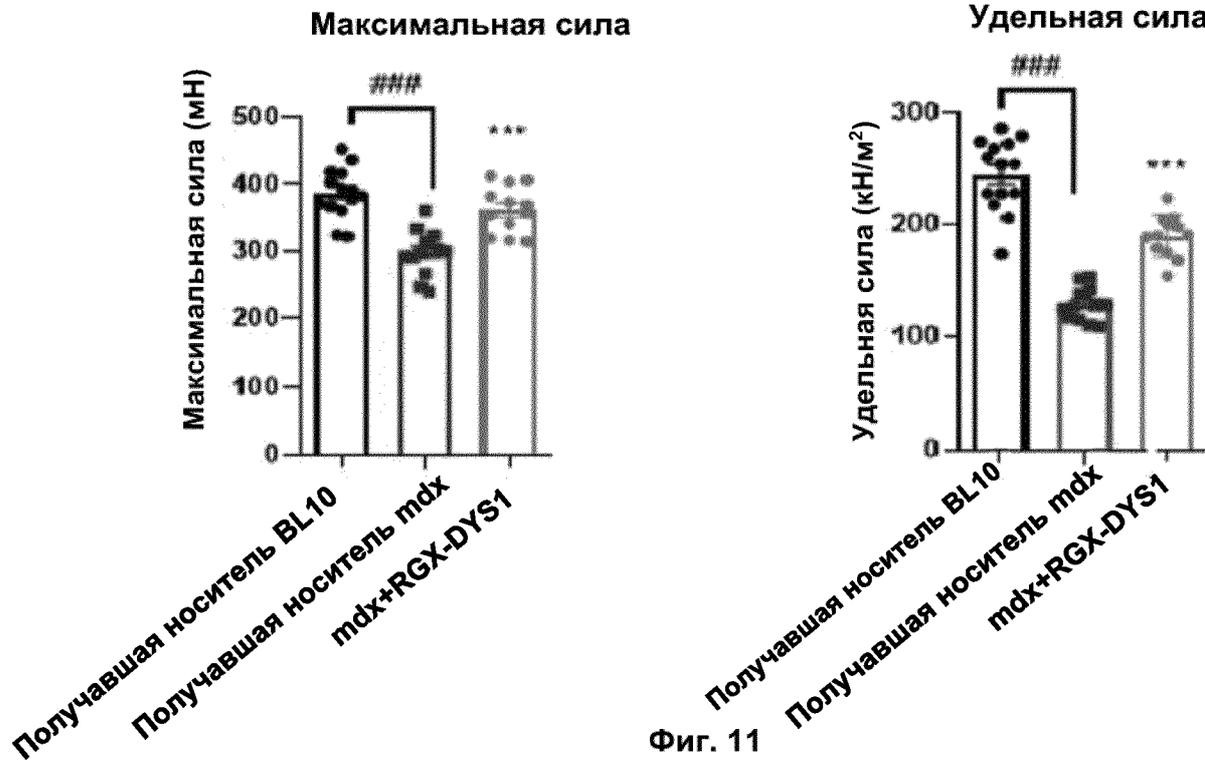
Получавшая носитель BL10
Получавшая носитель MDX
RGX-DYS1

Получавшая носитель BL10
Получавшая носитель MDX
RGX-DYS1

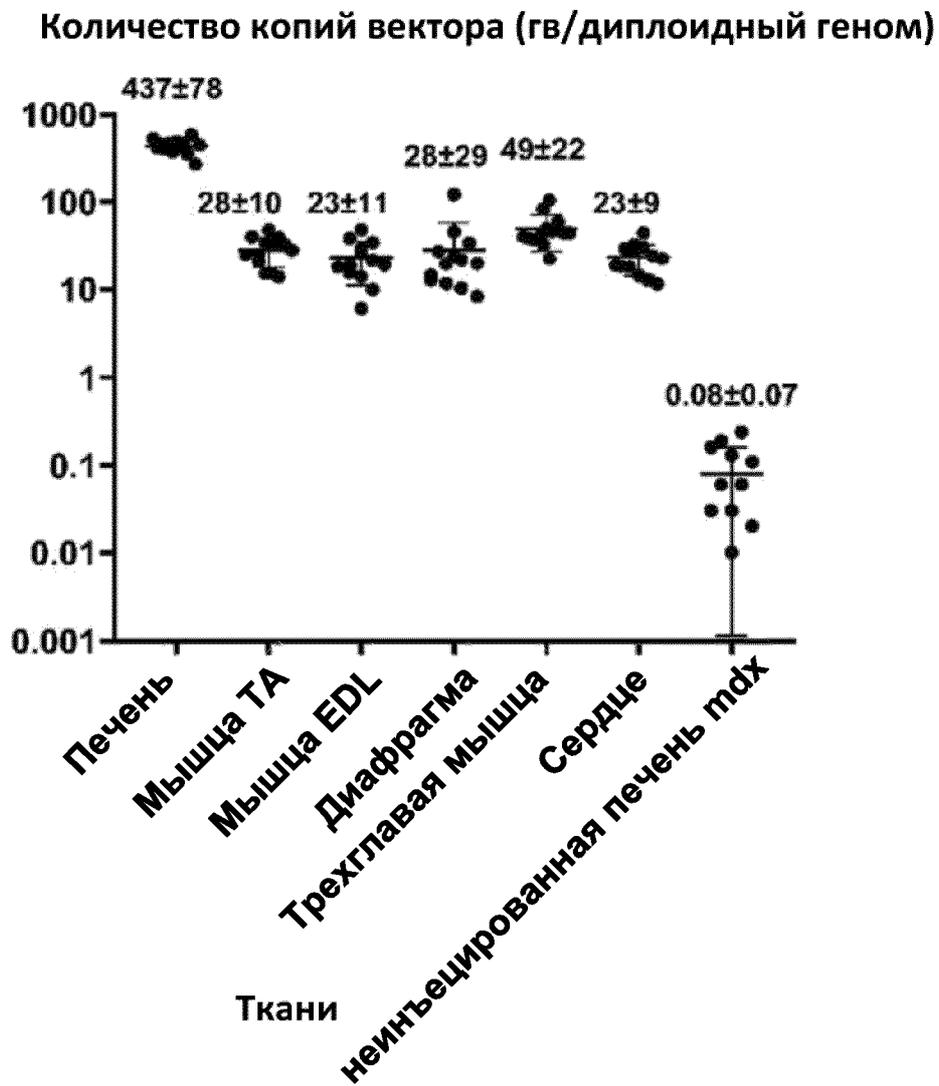
Фиг. 9В



Фиг. 10

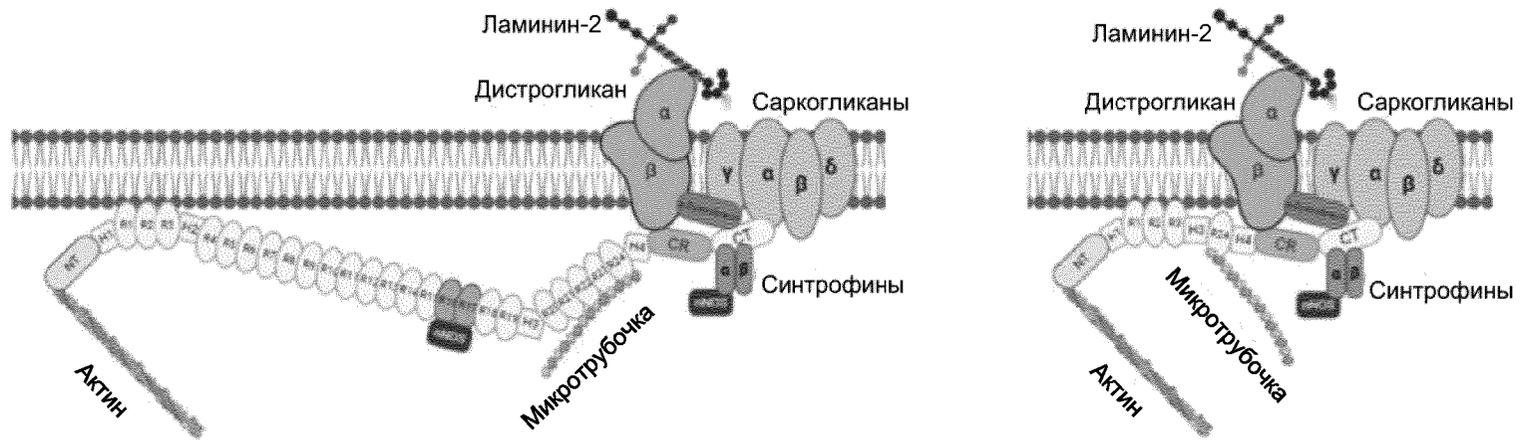


Фиг. 11

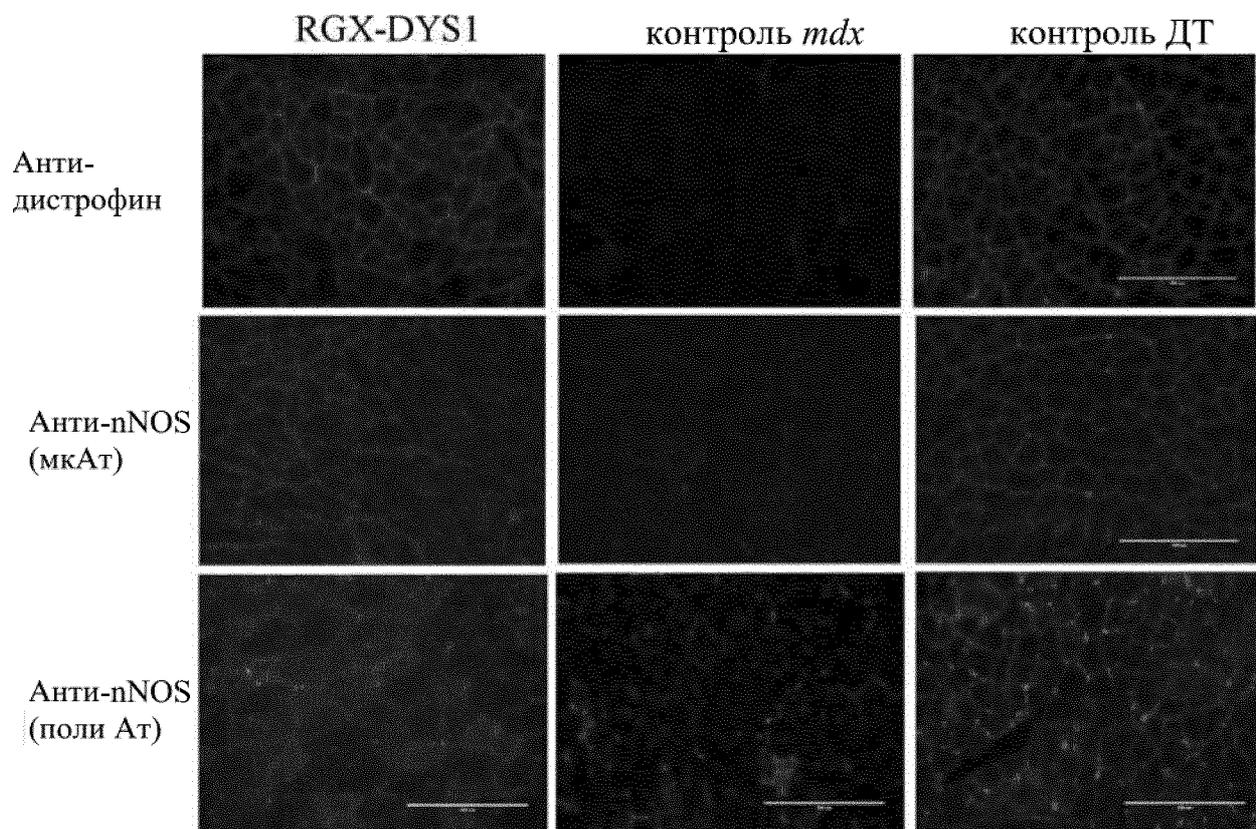


Фиг. 12

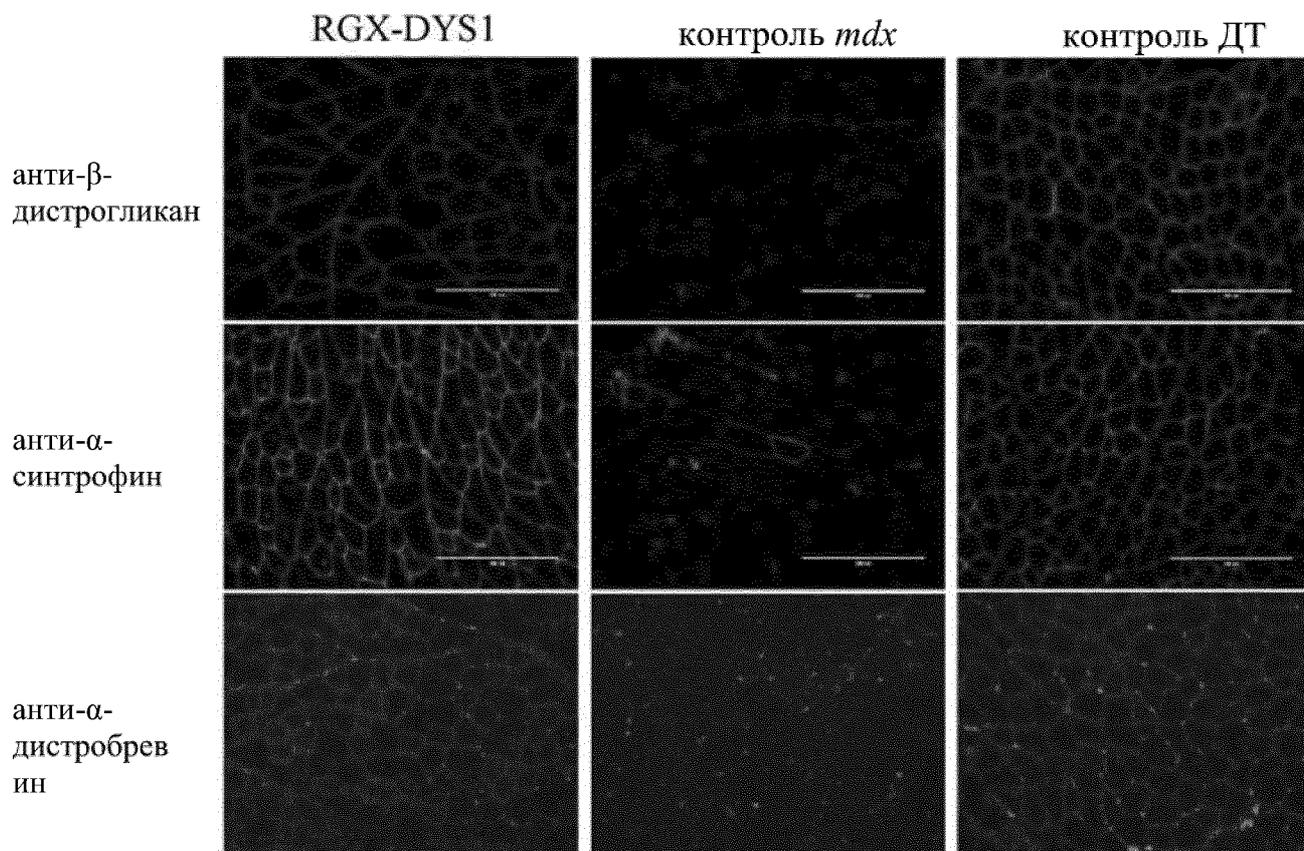
Дистрофин дикого типа и DAPC RGX-DYS1 и DAPC



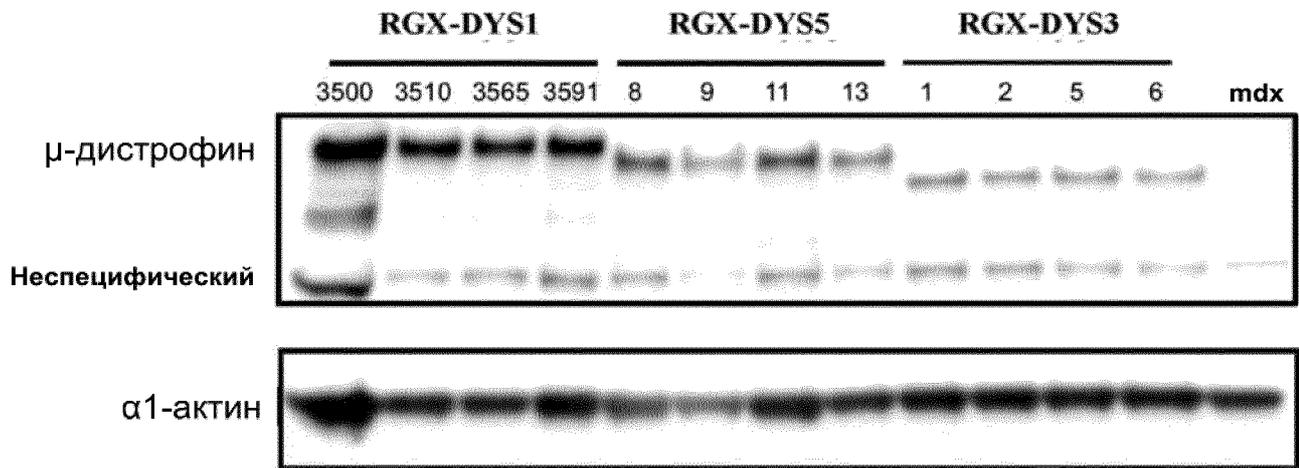
Фиг. 13



Фиг. 14

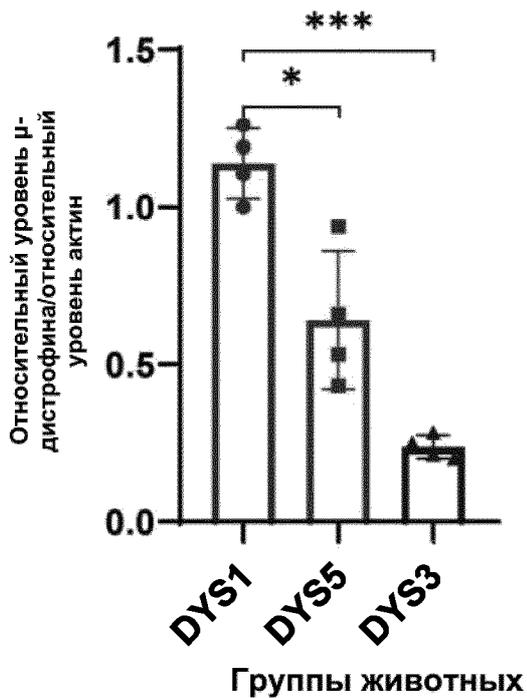


Фиг. 14 (продолжение)

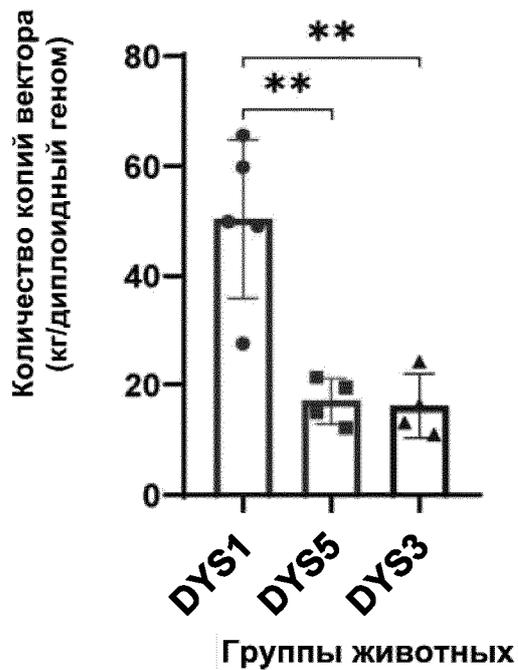


Фиг. 15

A Количественная оценка μ -дистрофина с помощью вестерн-блоттинга

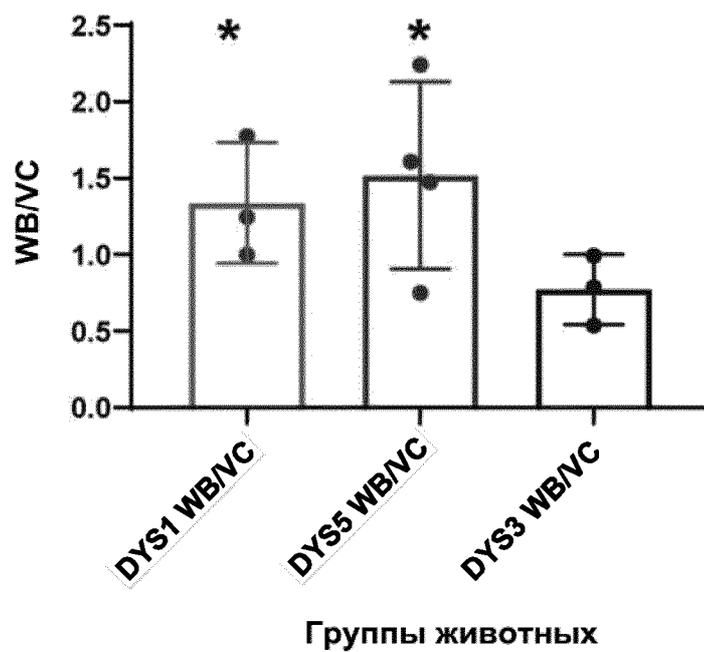


B Количество копий вектора по кцПЦР



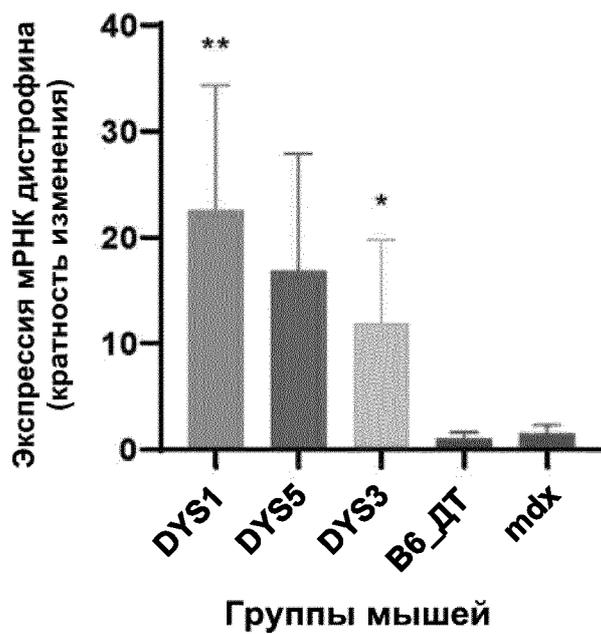
ФИГ. 16А-16В

C



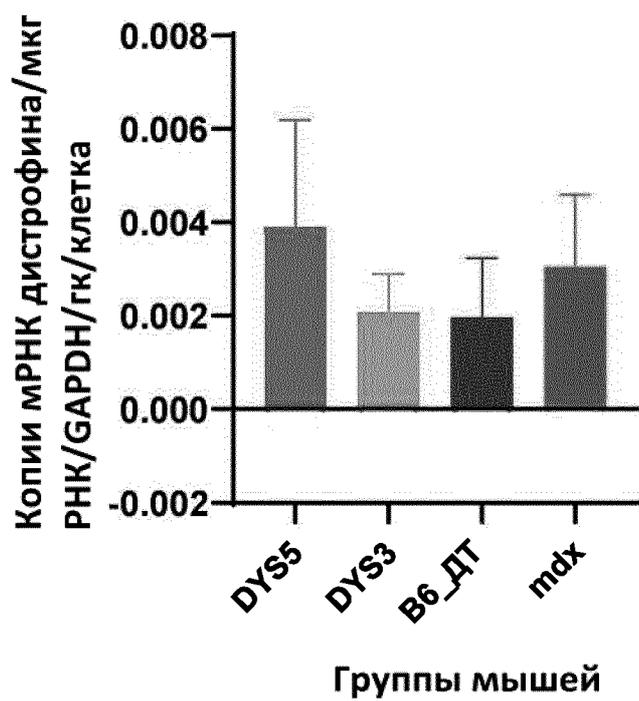
Фиг. 16С

A Экспрессия мРНК μ -дистрофина или дистрофина ДТ в скелетных мышцах

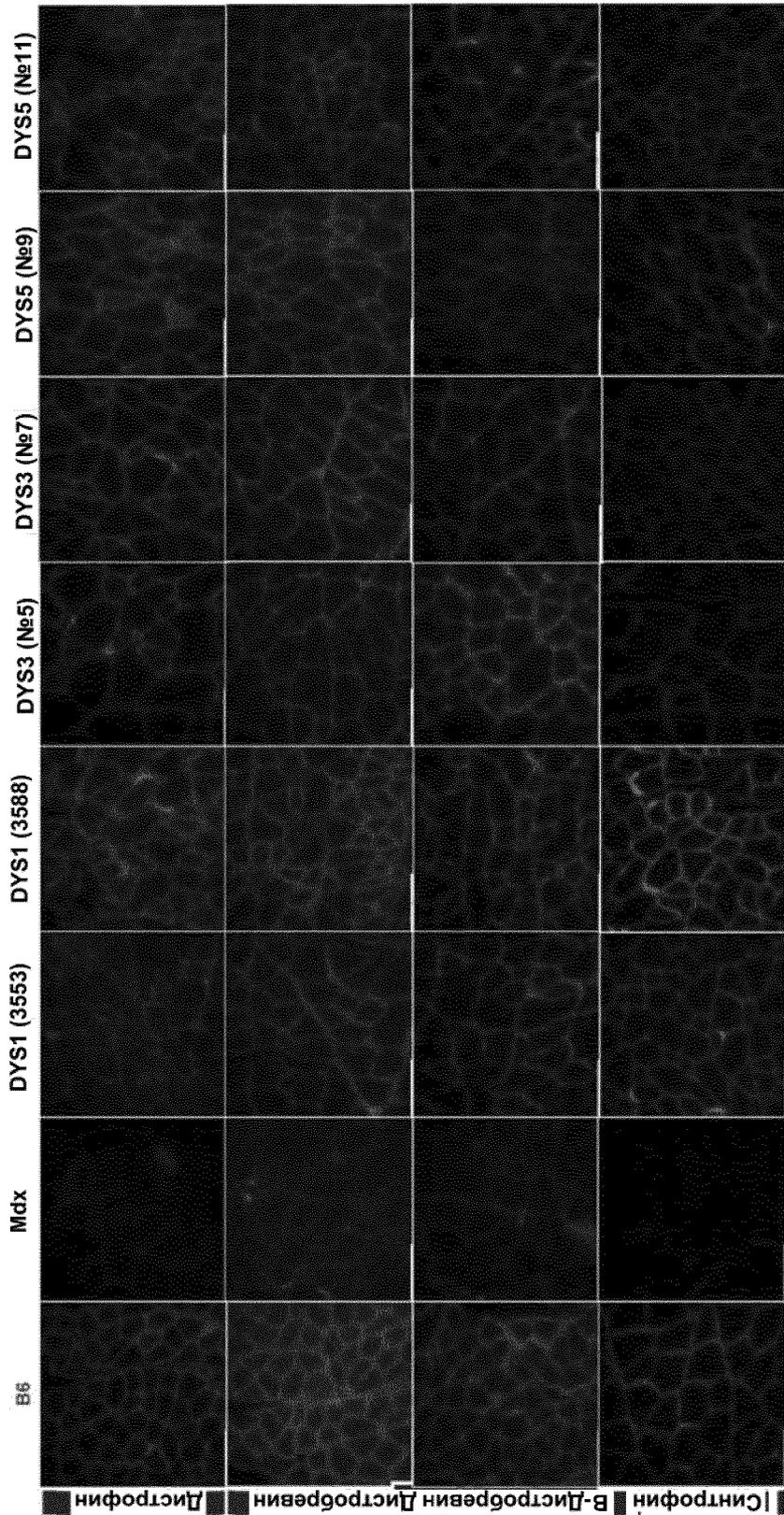


Фиг. 17А

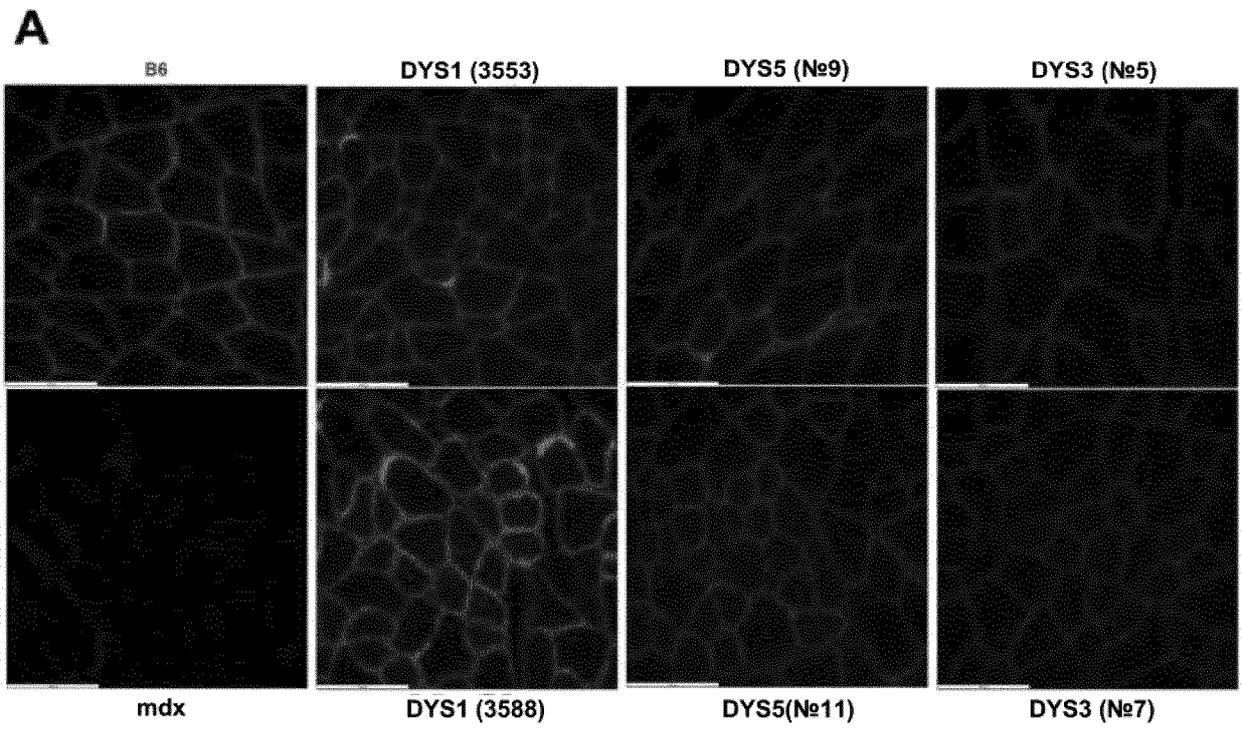
В Экспрессия мРНК дистрофина на клетку



Фиг. 17В

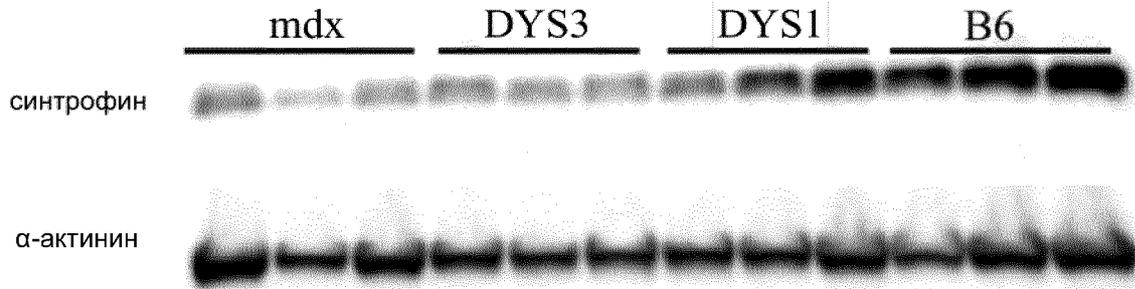


Фиг. 18



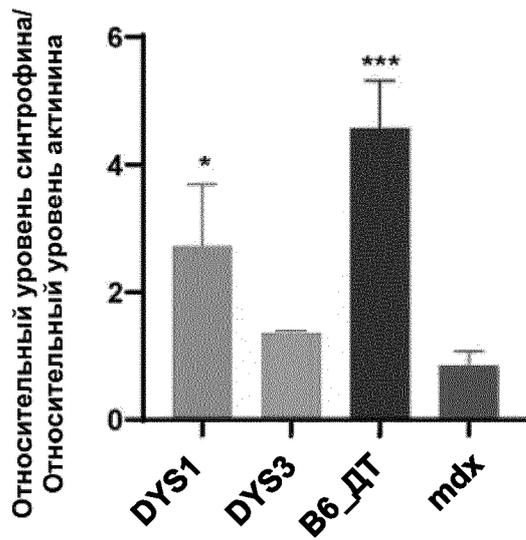
Фиг. 19А

B



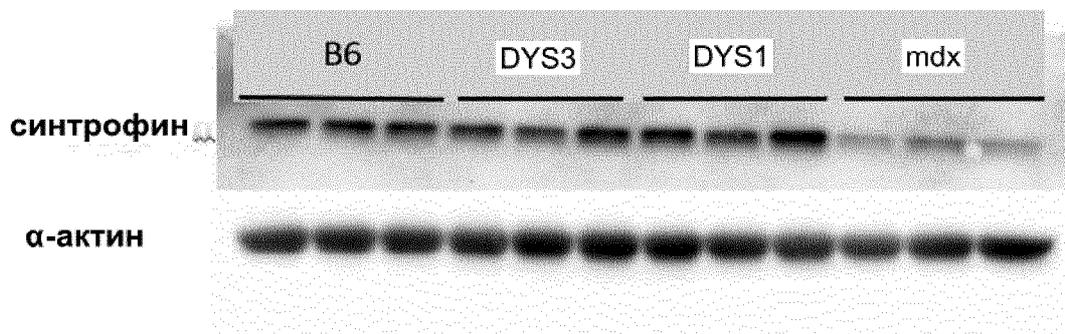
C

Количественное определение синтрофина в целом лизате методом вестерн-блоттинга



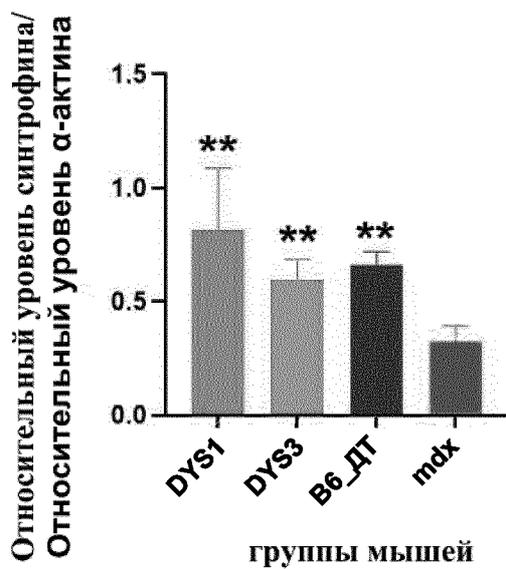
ФИГ. 19В-19С

D

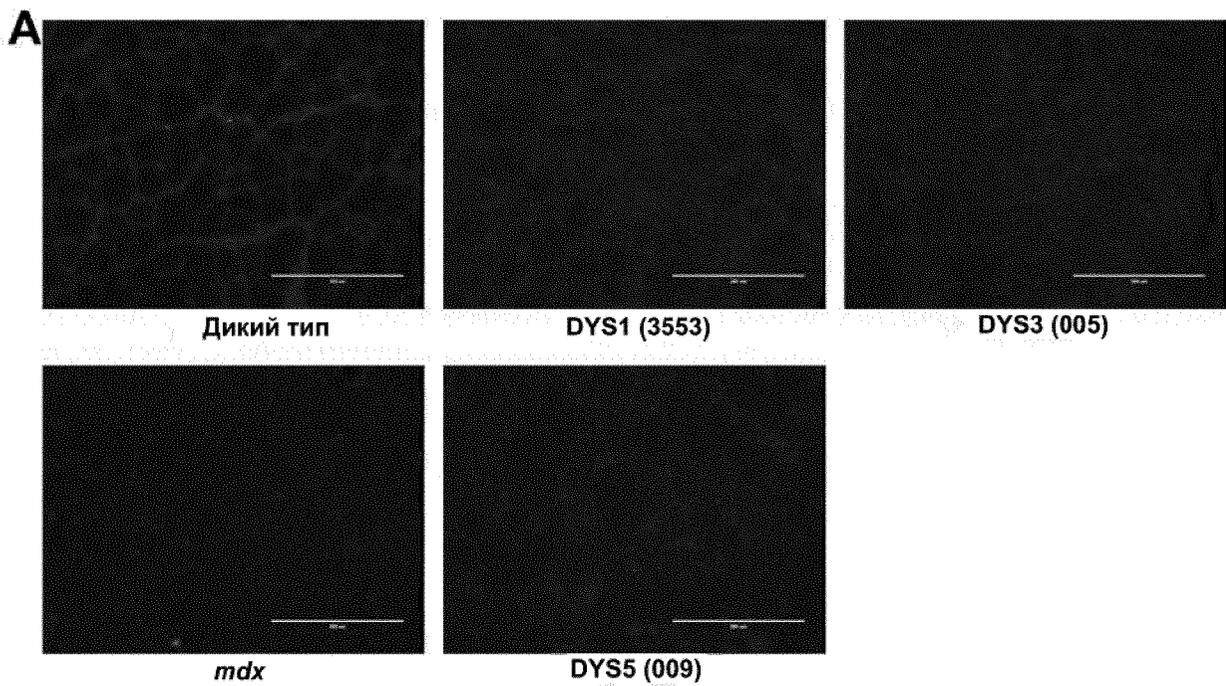


E

Количественное определение синтрофина на мембранном белке методом вестерн-блоттинга

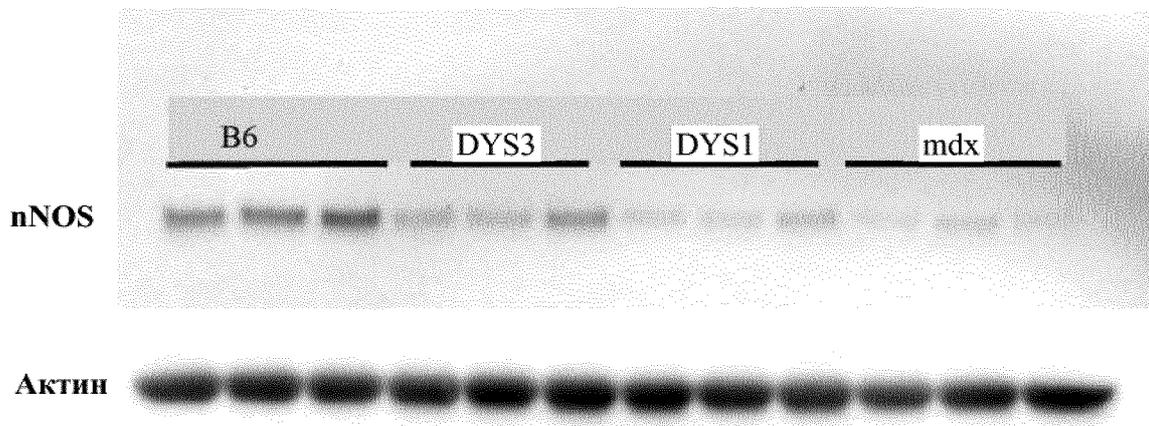


ФИГ. 19D-19E

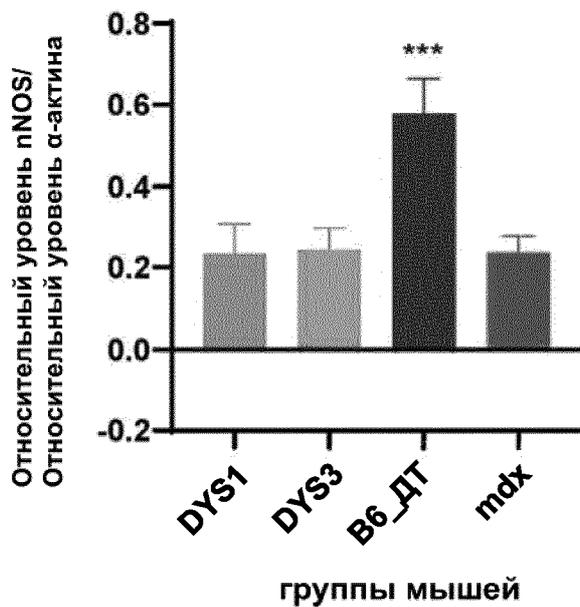


Фиг. 20A

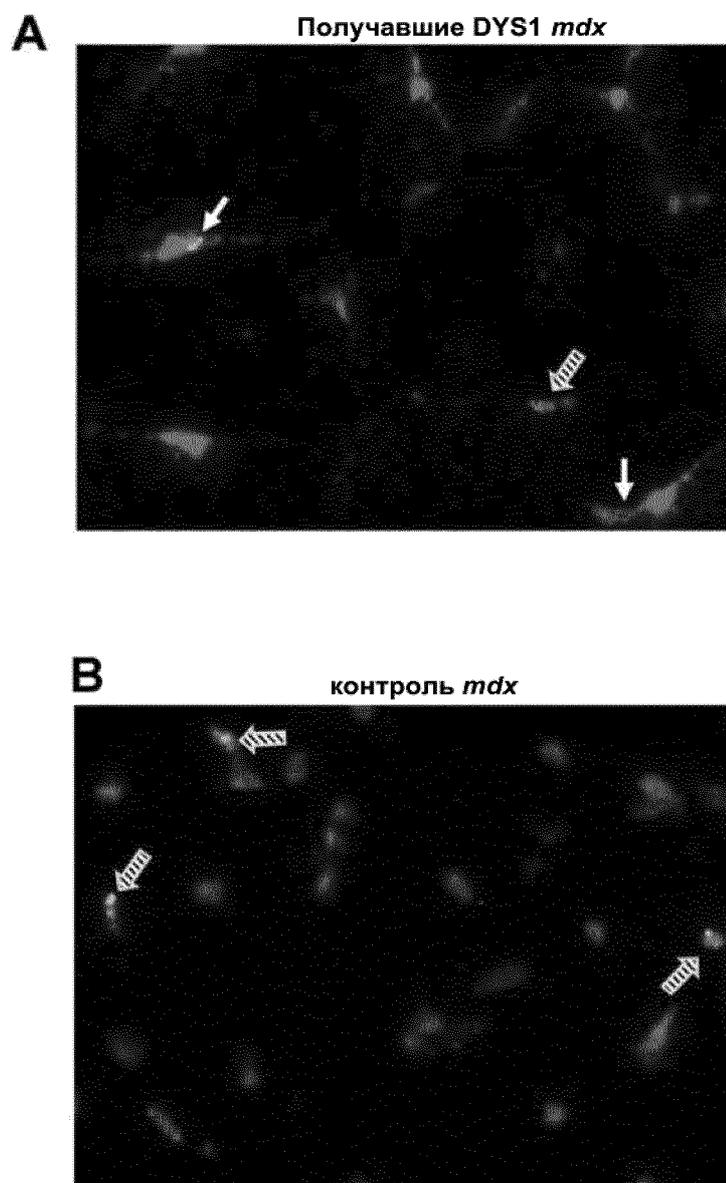
B



C

Количественный анализ pNOS методом вестерн-блоттинга

ФИГ. 20В-20С

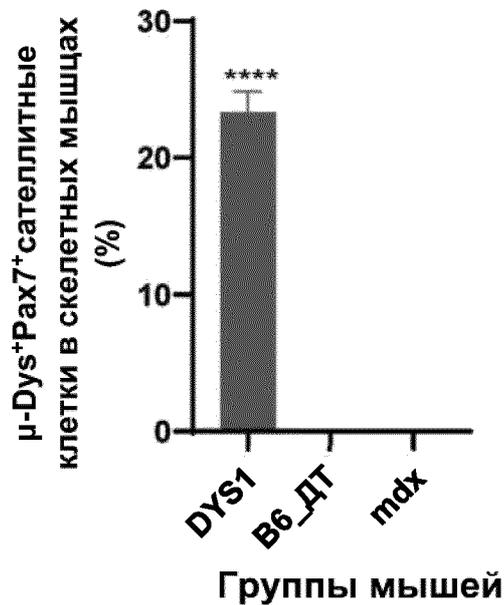


КРАСНЫЙ цвет: зонд мю-дистрофина; Зеленый: зонд рах7; Синий DAPI: ядра;

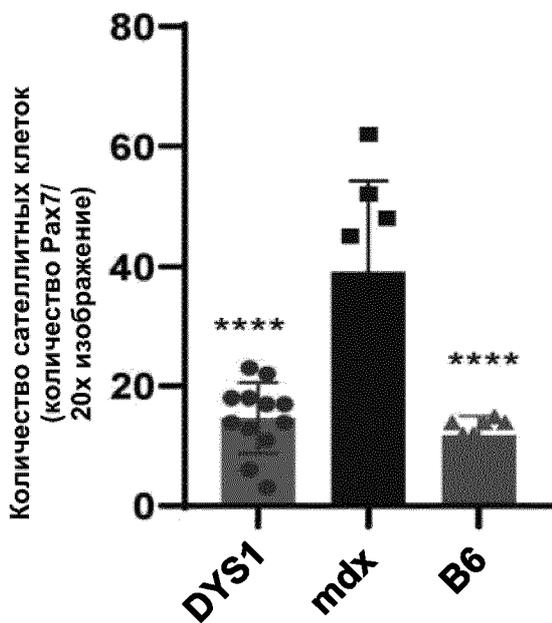
Белая стрелка: коэкспрессия рах7 и мю-дистрофина; Белые стрелки с черными линиями: только экспрессия рах7

ФИГ. 21А-21В

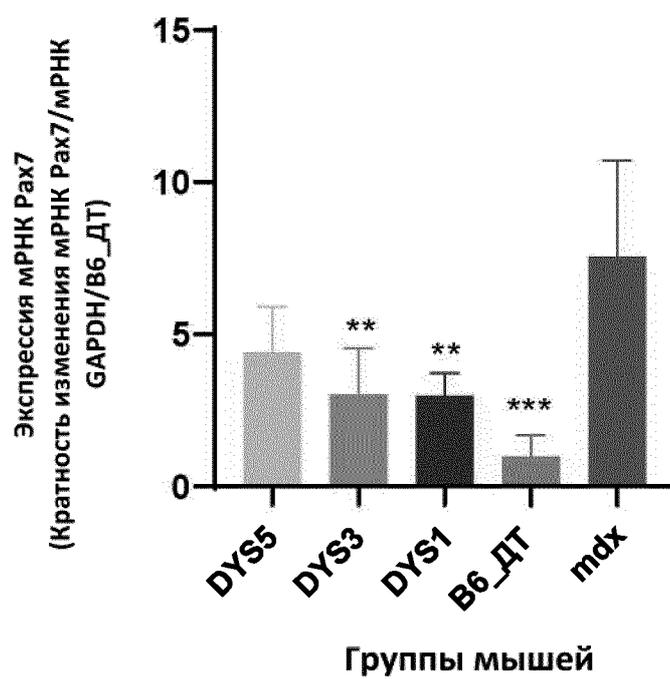
C Трансдукция сателлитных клеток вектором AAV



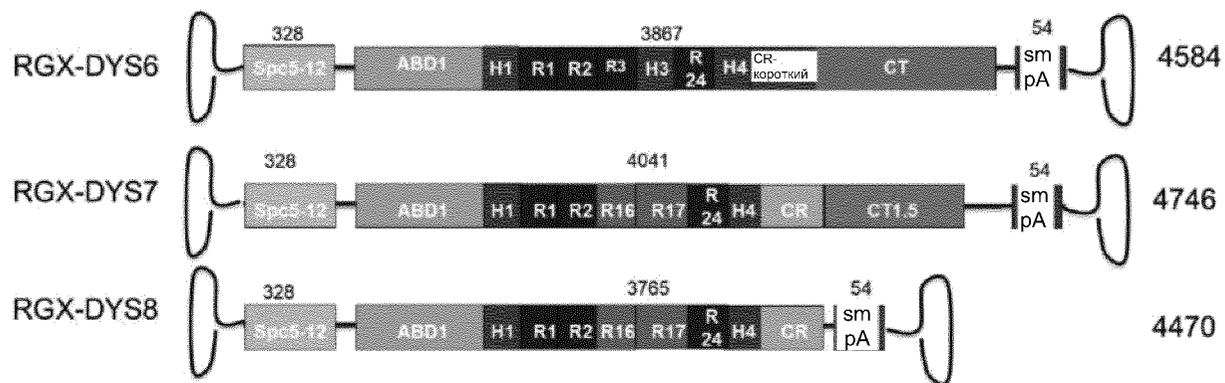
D Общее количество сателлитных клеток на изображениях RNAscope



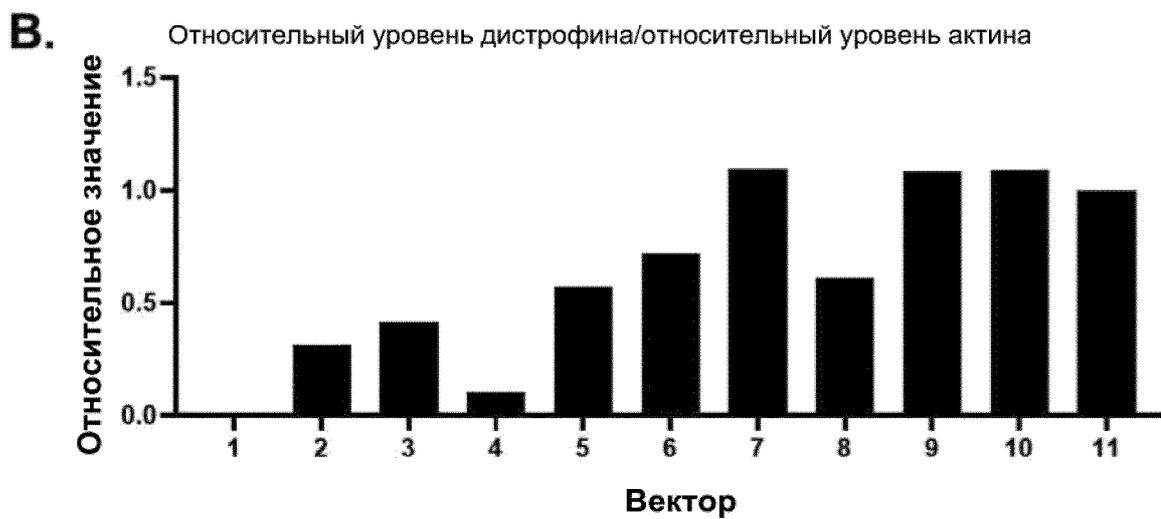
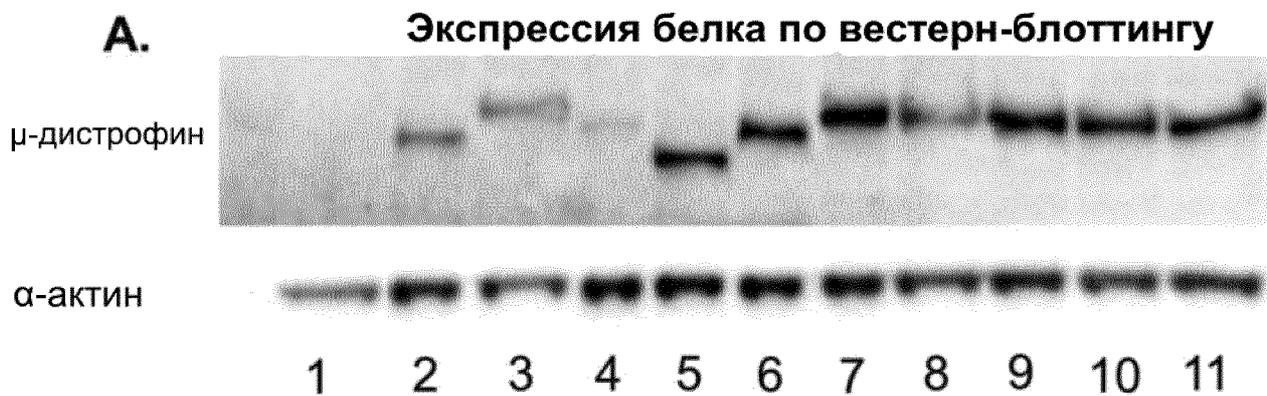
ФИГ. 21C-21D

E Экспрессия мРНК Pax7 по кцПЦР

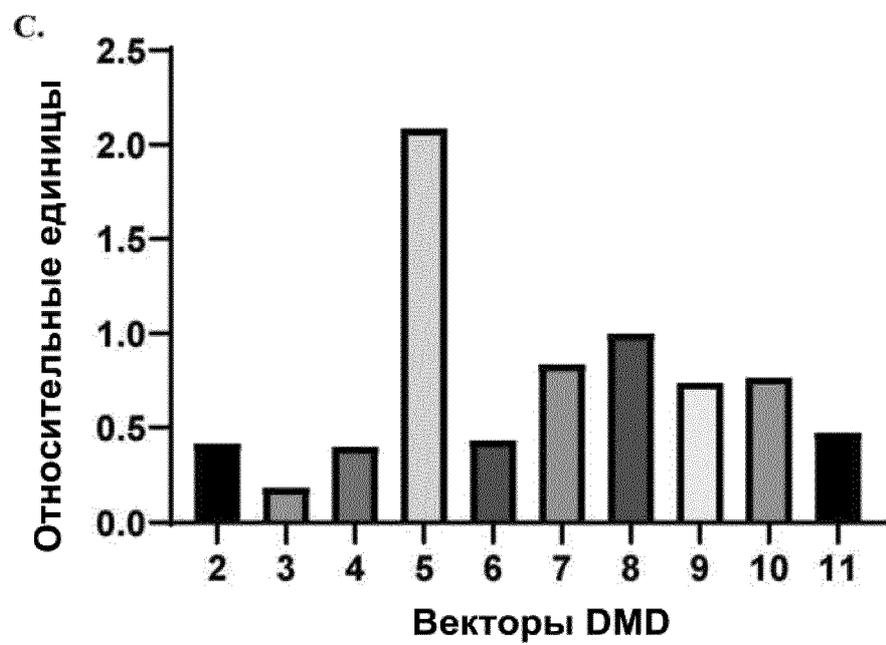
Фиг. 21E



Фиг. 22



ФИГ. 23А-23В



Фиг. 23С