

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292140** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.22

(22) Дата подачи заявки
2021.02.11

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) ВЕКТОРЫ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ СЕРДЦА

(31) 62/976,160; 63/047,633

(32) 2020.02.13; 2020.07.02

(33) US

(86) PCT/US2021/017699

(87) WO 2021/163357 2021.08.19

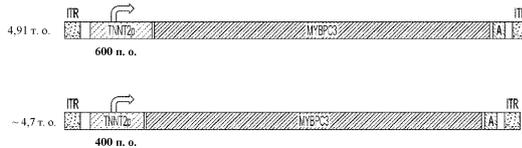
(88) 2021.12.02

(71) Заявитель:
ТЕНЯЯ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ломбарди Лора (US)

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) В настоящем изобретении предусмотрены способы и композиции, применимые для лечения или предупреждения заболевания сердца. В частности, в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий модифицированный промотор гена тропонина Т, функционально связанный с терапевтическим продуктом гена, для лечения или предупреждения заболевания сердца, например кардиомиопатии. Продукт гена может представлять собой MYBPC3. В настоящем изобретении также предусмотрены вирионы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), вирусные геномы rAAV, а также кассеты экспрессии и фармацевтические композиции на их основе. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы лечения заболевания или нарушения, такого как заболевание сердца.



A1

202292140

202292140

A1

ВЕКТОРЫ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ СЕРДЦА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка заявляет преимущество приоритета предварительной заявки на патент США с регистрационным номером 63/047633, поданной 2 июля 2020 г., и предварительной заявки на патент США с регистрационным номером 62/976160, поданной 13 февраля 2020 г., содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] Настоящее изобретение относится к композициям и способам для лечения или предупреждения заболевания сердца (*например*, кардиомиопатии) у субъекта. В частности, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему кардиоспецифический промотор, функционально связанный с терапевтическим продуктом гена, для лечения заболевания сердца (*например*, кардиомиопатии).

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[3] Настоящая заявка подается в электронном виде через EFS-Web и содержит представленный в электронном виде перечень последовательностей в формате .txt. Файл .txt под названием «TENA_015_02WO_SeqList_ST25.txt» содержит перечень последовательностей, создан 9 февраля 2021 г. и имеет размер 824 килобайта. Перечень последовательностей, содержащийся в этом файле .txt, является частью описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] В подходах генной терапии для лечения заболевания сердца часто используют векторы, имеющие конфигурацию, обеспечивающую эффективную трансдукцию клеток сердца и экспрессию трансгена специфичным для сердечной ткани образом. Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), кардиоспецифические промоторы или и то, и другое в комбинации можно применять для доставки полинуклеотида, кодирующего продукт гена (*например*,

терапевтический белок), в ткань сердца и экспрессии таким образом продукта гена в этой ткани для лечения заболевания сердца. Кардиоспецифические промоторы включают промоторы генов десмина (Des), тяжелой цепи альфа-миозина (α -MHC), легкой цепи 2 миозина (MLC-2) и сердечного тропонина С (TNNC1 или cTnC), а также промотор гена сердечного тропонина Т (TNNT2) размером 600 пар оснований. Однако доставка полинуклеотидов, кодирующих крупные белки, остается сложной задачей, отчасти ввиду наличия предела упаковки вирусных векторов.

[5] С учетом этих проблем в данной области техники сохраняется потребность в улучшенных векторах для генной терапии заболевания сердца.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам для лечения или предупреждения заболевания сердца (*например*, кардиомиопатии). В первом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены векторы, содержащие промотор, необязательно кардиоспецифический промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим терапевтический продукт гена, для лечения или предупреждения заболевания сердца, *например*, кардиомиопатии. Вектор может представлять собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

[7] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен промотор гена сердечного тропонина Т, содержащий полинуклеотид, имеющий от 300 п. о. до 500 п. о. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1—85. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% идентичностью с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% идентичностью с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной

последовательностью выше сайта начала транскрипции гена тропонина Т с включением этого сайта. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -450 п. о. до +1 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -350 п. о. до +1 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -250 п. о. до +1 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -450 п. о. до +50 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -350 п. о. до +50 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -250 п. о. до +50 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления ген тропонина Т представляет собой ген тропонина Т человека.

[8] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для мышц. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для клеток сердца. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для кардиомиоцитов. В некоторых вариантах осуществления

промотор обладает такой же специфичностью для типа клеток, что и нативный промотор гена тропонина Т размером приблизительно 600 п. о. В некоторых вариантах осуществления промотор, описанный в данном документе, обладает такой же специфичностью для типа клеток, что и эталонный промотор, содержащий SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления промотор обеспечивает экспрессию продукта гена, функционально связанного с ним, на уровне, на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30% более высоком, чем нативный промотор гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления промотор, описанный в данном документе, обеспечивает экспрессию продукта гена, функционально связанного с ним, на уровне, на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30% более высоком, чем эталонный промотор, содержащий SEQ ID NO: 1.

[9] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий любой из промоторов, описанных в данном документе, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим продукт гена. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор имеет предел упаковки, составляющий не более чем приблизительно 5,5 т. о.

[10] В некоторых вариантах осуществления продукт гена выбран из белков MYBPC3, KCNH2, TRPM4, DSG2 и ATP2A2. В некоторых вариантах осуществления продукт гена выбран из белков CACNA1C, DMD, DMPK, EPG5, EVC, EVC2, FBN1, NF1, SCN5A, SOS1, NPR1, ERBB4, VIP и MYH7. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой Cas9, необязательно выбранный из SpCas9, St1Cas9 и SaCas9.

[11] В некоторых вариантах осуществления вектор, описанный в данном документе, содержит полинуклеотид, кодирующий второй продукт гена. В некоторых вариантах осуществления второй продукт гена представляет собой функциональную РНК, необязательно микроРНК или направляющую РНК.

[12] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена выделенная клетка, содержащая любой из промоторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или выделенный кардиомиоцит.

[13] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая любой из описанных в данном документе векторов.

[14] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена композиция для клеточной терапии, содержащая любую из выделенных клеток, описанных в данном документе.

[15] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен геном вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий полинуклеотид *MYBPC3*, кодирующий белок MYBPC3 или его функциональный вариант, и промотор, где промотор представляет собой полинуклеотид, имеющий от 300 п. о. до 500 п. о. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1—85. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью выше сайта начала транскрипции гена тропонина Т с включением этого сайта. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -450 п. о. до +1 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В

некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -350 п. о. до +1 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -250 п. о. до +1 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -450 п. о. до +50 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -350 п. о. до +50 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью от -250 п. о. до +50 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления ген тропонина Т представляет собой ген тропонина Т человека.

[16] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для мышц. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для клеток сердца. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для кардиомиоцитов. В некоторых вариантах осуществления промотор обладает такой же специфичностью для типа клеток, что и нативный промотор гена тропонина Т размером приблизительно 600 п. о. В некоторых вариантах осуществления промотор обладает такой же специфичностью для типа клеток, что и эталонный промотор, содержащий SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления промотор обеспечивает экспрессию продукта гена,

функционально связанного с ним, на уровне, на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30% более высоком, чем нативный промотор гена тропонина Т. В некоторых вариантах осуществления промотор обеспечивает экспрессию продукта гена, функционально связанного с ним, на уровне, на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30% более высоком, чем эталонный промотор, содержащий SEQ ID NO: 1.

[17] В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), описанный в данном документе, содержит полинуклеотид *MYBPC3*, кодирующий белок MYBPC3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид *MYBPC3* содержит по меньшей мере приблизительно 3,5 т. о. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид *MYBPC3* содержит приблизительно 3,8 т. о. В некоторых вариантах осуществления MYBPC3 представляет собой полноразмерный MYBPC3. В некоторых вариантах осуществления MYBPC3 представляет собой усеченный MYBPC3.

[18] В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV, описанный в данном документе, экспрессирует MYBPC3. В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV экспрессирует MYBPC3 на приблизительно том же уровне, что и эталонный вектор на основе AAV, содержащий нативный промотор гена тропонина Т размером приблизительно 600 п. о. В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV экспрессирует MYBPC3 на уровне, на по меньшей мере 10% более высоком, чем эталонный вектор на основе AAV, содержащий нативный промотор гена тропонина Т размером приблизительно 600 п. о. В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV экспрессирует MYBPC3 на уровне, на по меньшей мере 20% более высоком, чем эталонный вектор на основе AAV, содержащий нативный промотор гена тропонина Т размером приблизительно 600 п. о.

[19] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен геном вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий кассету экспрессии, содержащую в направлении от 5' к 3' 5'-сегмент, содержащий промотор; полинуклеотид, кодирующий продукт гена; и 3'-сегмент, содержащий поли(А)-сигнал, при этом кассета экспрессии необязательно

фланкирована одним или обоими из 5'-инвертированного концевой повтора (ITR) и 3'-ITR, где полинуклеотид, кодирующий продукт гена, содержит от 3 т. о. до 11 т. о., от 3 т. о. до 5 т. о., от 3,5 т. о. до 4,5 т. о. или от 3,7 т. о. до 4 т. о.; и где: а) 5'-сегмент и 3'-сегмент в совокупности содержат не более 0,8 т. п. о. или не более 0,9 т. п. о.; б) 5'-ITR, 5'-сегмент, 3'-сегмент и 3'-ITR в совокупности содержат не более 1,2 т. п. о., не более 1,3 т. п. о.; и/или с) геном вектора содержит не более 4,7 т. п. о., не более 4,8 т. п. о., не более 4,9 т. п. о. или не более 5,0 т. п. о. В некоторых вариантах осуществления 5'-сегмент содержит не более 500 п. о. или не более 480 п. о. В некоторых вариантах осуществления 3'-сегмент содержит не более 200 п. о. или не более 150 п. о.

[20] В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV содержит полинуклеотид, кодирующий продукт гена, содержащий от 3,7 т. п. о. до 3,9 т. п. о., необязательно 3,8 т. п. о. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой MYBPC3 или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой MYBPC3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий MYBPC3, обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий MYBPC3, обладает по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий MYBPC3, представляет собой SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления MYBPC3 обладает по меньшей мере 90% идентичностью с полипептидной последовательностью под SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления MYBPC3 обладает по меньшей мере 95% идентичностью с полипептидной последовательностью под SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления MYBPC3 обладает 100% идентичностью с полипептидной последовательностью под SEQ ID NO: 103.

[21] В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV содержит промотор, где промотор представляет собой полинуклеотид, имеющий от 300 п. о. до 500 п. о. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 1–85 или SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 90%

идентичностью с SEQ ID NO: 1–85 или SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 100% идентичностью с SEQ ID NO: 1–85 или SEQ ID NO: 91.

[22] В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV содержит поли(А)-сигнал. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-сигнал содержит последовательность, состоит по существу из последовательности или состоит из последовательности, которая обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-сигнал содержит последовательность, состоит по существу из последовательности или состоит из последовательности, которая обладает по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-сигнал представляет собой SEQ ID NO: 92.

[23] В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV содержит 5'-сегмент. В некоторых вариантах осуществления 5'-сегмент обладает по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления 5'-сегмент обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления 5'-сегмент обладает по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления 5'-сегмент представляет собой SEQ ID NO: 93.

[24] В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV содержит 3'-сегмент. В некоторых вариантах осуществления 3'-сегмент обладает по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления 3'-сегмент обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления 3'-сегмент обладает по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления 3'-сегмент представляет собой SEQ ID NO: 94.

[25] В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе гAAV содержит кассету экспрессии. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии обладает по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления

кассета экспрессии обладает по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии представляет собой SEQ ID NO: 95.

[26] В некоторых вариантах осуществления геном гAAV содержит кассету экспрессии, которая фланкирована одним или обоими из 5'-инвертированного концевых повтора (ITR) и 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления 5'-ITR содержит последовательность, которая обладает 95% идентичностью с SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления 3'-ITR содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 97.

[27] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен вирион рекомбинантного AAV (гAAV). В некоторых вариантах осуществления вирион гAAV содержит любой из геномов векторов на основе гAAV, описанных в данном документе, и капсидный белок AAV.

[28] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения экспрессии белка MYBPC3 в клетке, включающий обеспечение трансдукции клетки вирионом гAAV, описанным в данном документе, или любым из геномов векторов на основе гAAV, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой *MYBPC3*^{-/-} клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит инактивирующую мутацию в одной или обеих копиях эндогенного гена *MYBPC3*.

[29] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения и/или предупреждения кардиомиопатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту вириона гAAV, описанного в данном документе, или любого из геномов векторов на основе гAAV, описанных в данном документе, где субъект необязательно страдает кардиомиопатией или имеет риск ее развития.

[30] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ обеспечения экспрессии белка MYBPC3 в сердце субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение вириона гAAV, описанного в данном документе, или любого из геномов векторов на основе гAAV, описанных в данном документе, субъекту, необязательно субъекту, страдающему кардиомиопатией или имеющему риск ее

развития, где субъект необязательно страдает кардиомиопатией или имеет риск ее развития.

[31] В некоторых вариантах осуществления введение вектора на основе AAV вызывает специфичную экспрессию MYBPC3 в сердце субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение вектора на основе AAV вызывает низкую или не выявляемую экспрессию MYBPC3 в скелетной ткани, головном мозге и/или печени субъекта, где субъект необязательно страдает кардиомиопатией или имеет риск ее развития.

[32] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания, вызванного мутацией MYBPC3, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту описанного вириона rAAV или любого из геномов векторов на основе rAAV, описанных в данном документе, где субъект необязательно страдает кардиомиопатией или имеет риск ее развития.

[33] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ увеличения активности MYBPC3 и/или усиления сердечной функции в сердце субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту вириона rAAV, описанного в данном документе, или любого из геномов векторов на основе rAAV, описанных в данном документе, где субъект необязательно страдает кардиомиопатией или имеет риск ее развития.

[34] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, обеспечивают лечение кардиомиопатии. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, обеспечивают предупреждение кардиомиопатии. В некоторых вариантах осуществления кардиомиопатия представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию.

[35] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают внутривенное введение субъекту вириона rAAV, описанного в данном документе, или любого из геномов векторов на основе rAAV, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают внутрисердечное введение субъекту вириона rAAV, описанного в данном документе, или любого из геномов векторов на основе rAAV, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы,

описанные в данном документе, включают прямую инъекцию субъекту вириона rAAV, описанного в данном документе, или любого из геномов векторов на основе rAAV, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают введение дозы, составляющей от приблизительно 10^{11} до приблизительно 10^{14} вирионов rAAV на кг или вирусных геномов на кг.

[36] В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект является взрослой особью.

[37] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в данном документе, предназначены для применения в качестве лекарственного препарата при терапевтическом или профилактическом лечении заболевания сердца, *например*, форм кардиомиопатии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[38] На **фиг. 1А** показаны карты последовательностей вставок для геномов векторов на основе AAV, адаптированных для крупных грузов, на которых показаны делеция или усечение двух *цис*-регуляторных элементов.

[39] На **фиг. 1В** показан анализ методом проточной цитометрии через два дня после инфицирования сердечных фибробластов человека ($n = 2$), MOI 160000, конструкциями, упакованными в AAV.

[40] На **фиг. 1С** показана карта последовательности вставки для генома вектора на основе AAV, адаптированного для крупных грузов, на которой показаны делеция или усечение двух *цис*-регуляторных элементов, делеция интрона и частичная делеция последовательности от 3'- до 5'-ITR.

[41] На **фиг. 2А** показано схематическое изображение исходного и измененного вариантов вирусного генома, содержащих кардиоспецифический промотор гена тропонина (TNNT2) и трансген миозинсвязывающего белка С (MYBPC3).

[42] На **фиг. 2В** показано выявление белка MYBPC3 с помощью иммунофлуоресценции в *MYBPC3^{-/-}* кардиомиоцитах, полученных из iPSC, трансдуцированных конструкциями, упакованными в AAV6, которые кодируют MYBPC3 под управлением кардиоспецифического промотора TNNT2.

[43] На **фиг. 3А** показано выявление белка MYBPC3 с помощью вестерн-блоттинга в *MYBPC3^{-/-}* кардиомиоцитах, полученных из iPSC, трансдуцированных конструкциями, упакованными в AAV6, которые кодируют MYBPC3 человека под управлением кардиоспецифического промотора TNNT2 различных размеров (400-600 п. о.). В качестве контроля нагрузки использовали GAPDH.

[44] На **фиг. 3В** показано выявление белка MYBPC3 с помощью вестерн-блоттинга в *MYBPC3^{-/-}* кардиомиоцитах, полученных из iPSC, трансдуцированных конструкциями, упакованными в AAV6, которые кодируют MYBPC3 человека под управлением промотора гена сердечного TNNT2 человека различных размеров (400 или 600 п. о.). Последовательность Козак не использовали в качестве отрицательного контроля, а в качестве контроля нагрузки использовали GAPDH.

[45] На **фиг. 3С** показано выявление белка MYBPC3 с помощью вестерн-блоттинга в *MYBPC3^{-/-}* кардиомиоцитах, полученных из iPSC, трансдуцированных плазмидами AAV6, которые кодируют MYBPC3 человека под управлением промотора гена сердечного TNNT2 человека различных размеров (400 или 600 п. о.). В качестве контроля нагрузки использовали GAPDH.

[46] На **фиг. 4А** показаны карта интронов гена *Mybpc3* и дот-блот экспрессии белка MYBPC3 у мыши-основателя линии с КО.

[47] На **фиг. 4В** показана столбчатая диаграмма массы тела однопометных мышей дикого типа (WT) или мышей с КО (*Mybpc3^{-/-}*) в возрасте двух недель. WT (n = 11), *Mybpc3^{+/-}* (n = 7) и *Mybpc3^{-/-}* (n = 13).

[48] На **фиг. 4С** показана столбчатая диаграмма фракции выброса (%), измеренной с помощью эхокардиографии у мышей дикого типа (WT), гетерозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{+/-}*) или гомозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{-/-}*) в возрасте двух недель.

[49] На **фиг. 4D** показана столбчатая диаграмма фракции укорочения (%), измеренной с помощью эхокардиографии у мышей дикого типа (WT), гетерозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{+/-}*) или гомозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{-/-}*) в возрасте двух недель.

[50] На **фиг. 4E** показана столбчатая диаграмма массы левого желудочка (LV), нормализованной по массе тела (BW), у мышей дикого типа (WT), гетерозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{+/-}*) или гомозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{-/-}*) в возрасте двух недель.

[51] На **фиг. 4F** показана столбчатая диаграмма внутреннего диаметра левого желудочка во время систолы (LVIDs), нормализованного по массе тела, у мышей дикого типа (WT), гетерозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{+/-}*) или гомозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{-/-}*) в возрасте двух недель.

[52] На **фиг. 4G** показана столбчатая диаграмма внутреннего диаметра левого желудочка во время диастолы (LVIDd), нормализованного по массе тела, у мышей дикого типа (WT), гетерозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{+/-}*) или гомозиготных мышей с КО (*Mybpc3^{-/-}*) в возрасте двух недель.

[53] На **фиг. 5** показано выявление мРНК MYBPC3 с помощью qRT-PCR в ткани сердца, скелета, головного мозга и печени, собранной от мышей, которым проводили ретроорбитальную инъекцию E12 GC конструкций, упакованных в AAV9, которые кодируют MYBPC3 человека под управлением промотора гена сердечного TNNT2 человека различных размеров (400 или 600 п. о.).

[54] На **фиг. 6A** показана столбчатая диаграмма, на которой показана абсолютная количественная оценка векторных геномов на микрограмм геномной ДНК в сердце и печени взрослых мышей через 4 недели после внутривенного введения вектора на основе AAV9, содержащего кассету с модифицированным промотором TNNT2 размером 400 п. о.

[55] На **фиг. 6B** показана столбчатая диаграмма, на которой показана кратность увеличения по сравнению со средой-носителем для трансгенной РНК в сердце и печени взрослых мышей через 4 недели после внутривенного введения вектора на основе AAV9, содержащего кассету с модифицированным промотором TNNT2 размером 400 п. о.

[56] На **фиг. 7** показан вестерн-блот экспрессии белка MYBPC3 у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS.

[57] На **фиг. 8** показана столбчатая диаграмма, на которой показана экспрессия MYBPC3 у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS.

[58] На **фиг. 9А** показана столбчатая диаграмма, на которой показана масса левого желудочка, нормализованная по массе тела (LVM/BM), у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей через 6 недель после того, как им в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS.

[59] На **фиг. 9В** показана столбчатая диаграмма, на которой показана FAS, выраженная в виде % процентного изменения внутренних размеров LV между систолой и диастолой, у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей через 6 недель после того, как им в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS.

[60] На **фиг. 9С** показана столбчатая диаграмма, на которой показана фракция выброса у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей через 6 недель после того, как им в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS.

[61] На **фиг. 9D** показана столбчатая диаграмма, на которой показана масса левого желудочка, нормализованная по массе тела (LVM/BM), у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей через 31 неделю после того, как им в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS.

[62] На **фиг. 9Е** показана столбчатая диаграмма, на которой показана FAS, выраженная в виде % процентного изменения внутренних размеров LV между

систолой и диастолой, у гомозиготных *Mybpc3*^{-/-} мышей через 31 неделю после того, как им в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS.

[63] На **фиг. 9F** показана столбчатая диаграмма, на которой показана фракция выброса у гомозиготных *Mybpc3*^{-/-} мышей через 31 неделю после того, как им в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS.

[64] **Фиг. 10A** представляет собой иллюстрацию вектора на основе AAV9, кодирующего *Mybpc3* в окружении кассет экспрессии размером 5,4 т. п. о. или 4,7 т. п. о.

[65] **Фиг. 10B** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана фракция выброса у гомозиготных *Mybpc3*^{-/-} мышей через 18 недель после того, как им в возрасте трех месяцев проводили ретроорбитальную инъекцию $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ или $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV9, кодирующего *Mybpc3* в окружении кассет размером 5,4 т. п. о. или 4,7 т. п. о., или инъецировали контроль в виде среды-носителя HBSS.

[66] **Фиг. 10C** представляет собой график, на котором показано последовательное изменение фракции выброса у гомозиготных *Mybpc3*^{-/-} мышей после того, как им в возрасте трех месяцев проводили ретроорбитальную инъекцию $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ или $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV9, кодирующего *Mybpc3* в окружении кассет размером 5,4 т. п. о. или 4,7 т. п. о., или инъецировали контроль в виде среды-носителя HBSS.

[67] **Фиг. 10D** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана масса левого желудочка, нормализованная по массе тела (LVM/BM), у гомозиготных *Mybpc3*^{-/-} мышей через 18 недель после того, как им в возрасте трех месяцев проводили ретроорбитальную инъекцию $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ или $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV9, кодирующего *Mybpc3* в окружении кассет размером 5,4 т. п. о. или 4,7 т. п. о., или инъецировали контроль в виде среды-носителя HBSS.

[68] **Фиг. 11А** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана экспрессия GFP в сердечной ткани после системной доставки варианта капсида AAV9 CR9-10 с кассетой, кодирующей GFP, или AAV9 с кассетой, кодирующей GFP, у взрослых мышей ($p < 0,05$, однофакторный ANOVA; критерий множественных сравнений Даннета).

[69] **Фиг. 11В** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана фракция выброса у *Mylbpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV9, кодирующего *Mylbpc3*, вектора CR9-10, кодирующего *Mylbpc3*, или контроля в виде среды-носителя HBSS.

[70] **Фиг. 11С** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана фракция выброса по сравнению с исходным уровнем до введения дозы (ΔEF) у *Mylbpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV9, кодирующего кассету экспрессии гена *Mylbpc3*, вектора CR9-10, кодирующего кассету экспрессии гена *Mylbpc3*, или контроля в виде среды-носителя HBSS.

[71] **Фиг. 12А** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана экспрессия GFP в левом желудочке у отличных от человека приматов через месяц после внутривенной доставки дозы $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV, кодирующего GFP, упакованного в один из четырнадцати различных капсидных белков.

[72] **Фиг. 12В** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана экспрессия GFP в печени у отличных от человека приматов через месяц после внутривенной доставки дозы $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV, кодирующего GFP, упакованного в один из четырнадцати различных капсидных белков.

[73] **Фиг. 12С** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показано соотношение экспрессии GFP в левом желудочке и печени у отличных от человека приматов через месяц после внутривенной доставки дозы $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV, кодирующего GFP, упакованного в один из четырнадцати различных капсидных белков.

[74] **Фиг. 13А** представляет собой график, на котором показано последовательное изменение фракции выброса у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию AAV9, кодирующего ген *Mybpc3* мыши (mMybpc3) (при $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$), AAV9, кодирующего ген *MYBPC3* человека (hMYBPC3) (при $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$), или среды-носителя HBSS.

[75] **Фиг. 13В** представляет собой график, на котором показано последовательное изменение массы левого желудочка, нормализованной по массе тела (LVM/BW), у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию AAV9, кодирующего ген *Mybpc3* мыши (mMybpc3) (при $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$), AAV9, кодирующего ген *MYBPC3* человека (hMYBPC3) (при $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$), или среды-носителя HBSS.

[76] **Фиг. 13С** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана толщина задней стенки левого желудочка во время диастолы (LVPW;d) у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию AAV9, кодирующего ген *Mybpc3* мыши (mMybpc3) (при $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$), AAV9, кодирующего ген *MYBPC3* человека (hMYBPC3) (при $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$), или среды-носителя HBSS.

[77] **Фиг. 14А** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана фракция выброса у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $3E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего ген *MYBPC3* человека, или среды-носителя HBSS.

[78] **Фиг. 14В** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана фракция выброса по сравнению с исходным уровнем до введения дозы (ΔEF) у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $3E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего ген *MYBPC3* человека, или среды-носителя HBSS.

[79] **Фиг. 14С** представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана масса левого желудочка, нормализованная по массе тела (LVM/BW), у гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей, которым в возрасте двух недель проводили

ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $3E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего ген *MYBPC3* человека, или среды-носителя HBSS.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[80] В настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы для генной терапии в клетках сердца и/или с крупными генами. Раскрытые полинуклеотиды и векторы можно применять для лечения или предупреждения заболевания (*например*, заболевания сердца, такого как кардиомиопатия). В настоящем изобретении предусмотрены кардиоспецифические промоторы, кассеты экспрессии, вирусные геномы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), вирионы rAAV, фармацевтические композиции и способы применения. Кассеты экспрессии и вирусные геномы rAAV могут содержать кардиоспецифический промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим продукт гена. Продукт гена может представлять собой терапевтический продукт гена, при этом такой терапевтический продукт гена применяется для лечения и/или предупреждения заболевания сердца, *например*, кардиомиопатии. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены вирусные геномы rAAV и кассеты экспрессии, сконструированные для доставки и экспрессии продукта крупного гена. В некоторых вариантах осуществления геном вектора содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид MYBPC3 или его функциональный вариант, и промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор гена сердечного тропонина Т (*т. е.* промотор TNNT2). В некоторых вариантах осуществления геном вектора на основе rAAV содержит кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, кодирующий продукт гена, *например*, MYBPC3, и промотор, *например*, промотор TNNT2, фланкированный одной или более полинуклеотидными последовательностями инвертированных концевых повторов. В некоторых вариантах осуществления вирион rAAV содержит полинуклеотид, содержащий геном вектора на основе rAAV, описанный в данном документе, и капсидный белок AAV. В настоящем изобретении также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие геномы векторов, геномы векторов на основе rAAV и вирионы rAAV, описанные в данном документе. Также предусмотрены способы лечения и/или предупреждения

кардиомиопатии у субъекта, включающие введение описанных в данном документе вирионов гAAV или геномов векторов на их основе.

[81] Другие варианты осуществления, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения и охватываются ими.

I. Определения

[82] Используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иного.

[83] Используемый в данном описании термин «и/или» используется в настоящем изобретении для обозначения «и» либо «или», если не указано иное.

[84] Во всем данном описании, если контекст не требует иного, слова «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного элемента или целого числа или группы элементов или целых чисел, но не исключение любого другого элемента или целого числа или группы элементов или целых чисел.

[85] Используемые в настоящей заявке термины «приблизительно» и «примерно» используются как эквиваленты. Любые числа, используемые в настоящей заявке с указанием или без указания «приблизительно»/«примерно», предназначены для охвата любых отклонений в пределах нормальных, оцененных средним специалистом в соответствующей области техники. В определенных вариантах осуществления термин «примерно» или «приблизительно» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любую сторону (большую или меньшую) от указанного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100% возможного значения).

[86] Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полимерной форме нуклеотидов из более чем приблизительно 100 нуклеотидов — рибонуклеотидов либо

дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает без ограничения одно-, двух- или многонитевую ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания. «Олигонуклеотид» обычно относится к полинуклеотидам из от приблизительно 5 до приблизительно 100 нуклеотидов одно- или двухнитевой ДНК. Однако для целей настоящего изобретения не существует верхнего предела длины олигонуклеотида. Олигонуклеотиды также известны как «олигомеры» или «олиго» и могут быть выделены из генов или химически синтезированы способами, известными из уровня техники. Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» следует понимать как включающие, что применимо к описываемым вариантам осуществления, однонитевые (такие как смысловые или антисмысловые) и двухнитевые полинуклеотиды.

[87] Используемый в данном документе термин «промотор» относится к полинуклеотидной последовательности, которая имеет один или более сайтов распознавания, с которыми связывается РНК-полимераза, так что в клетке-хозяине или в клетке-мишени РНК-полимераза может обеспечивать инициацию и транскрипцию полинуклеотидной последовательности «ниже» промотора в РНК. Аналогичным образом, «промотор» операционно связан или функционально связан с полинуклеотидной последовательностью, если в клетке-хозяине или в клетке-мишени, в которой активен промотор, РНК-полимераза инициирует транскрипцию полинуклеотида в сайте начала транскрипции. Промоторы, функционирующие в клетках млекопитающих, обычно содержат АТ-богатую область, расположенную на примерно 25—30 оснований выше сайта, в котором инициируется транскрипция, и/или другую последовательность, находящуюся на 70—80 оснований выше сайта начала транскрипции — область CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид.

[88] Термины «выше» и «вышерасположенный конец» относятся к части полинуклеотида, которая по отношению к сайту начала транскрипции (TSS) расположена с 5'-стороны от TSS в смысловой нити (или кодирующей нити) полинуклеотида и с 3'-стороны от TSS в антисмысловой нити полинуклеотида.

Термины «ниже» и «нижерасположенный конец» относятся к части полинуклеотида, которая по отношению к TSS расположена с 3'-стороны от TSS в смысловой нити (или кодирующей нити) полинуклеотида и с 5'-стороны от TSS в антисмысловой нити полинуклеотида. Таким образом, делеция с вышерасположенного конца от промотора представляет собой делецию одной или более пар оснований в нетранскрибируемой области полинуклеотида с 5'-стороны от TSS в смысловой нити (или, что то же самое, с 3'-стороны от TSS в антисмысловой нити). Делеция с нижерасположенного конца от промотора представляет собой делецию одной или более пар оснований в транскрибируемой области полинуклеотида с 3'-стороны от TSS в смысловой нити (или, что то же самое, с 5'-стороны от TSS в антисмысловой нити).

[89] Используемый в данном документе термин «трансген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или РНК (*например*, терапевтический белок), которая является частично или полностью гетерологичной, *т. е.*, чужеродной, по отношению к трансгенным животному или клетке, которым она введена, или является гомологичной по отношению к эндогенному гену трансгенных животного или клетки, которым она введена, но которая предназначена для вставки или вставлена в геном животного таким образом, чтобы изменить геном клетки, в которую она вставлена (*например*, она вставлена в местоположение, которое отличается от местоположения природного гена, или ее вставка приводит к нокауту). Трансген может содержать одну или более последовательностей, регулирующих транскрипцию, и любую другую нуклеиновую кислоту, такую как интроны, которая может быть необходимой для оптимальной экспрессии выбранной нуклеиновой кислоты.

[90] Термин «идентичность последовательностей» относится к процентной доле оснований или аминокислот в двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностях, которые являются одинаковыми и находятся в одном и том же относительном положении. Таким образом, одна полинуклеотидная или полипептидная последовательность характеризуется определенным процентным значением идентичности последовательности по сравнению с другой полинуклеотидной или полипептидной последовательностью. Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность выступает в качестве

эталонной последовательности, с которой сравниваются тестируемые последовательности. Термин «эталонная последовательность» относится к молекуле, с которой сравнивают тестируемую последовательность.

[91] Способы выравнивания последовательностей для сравнения и определения процента идентичности последовательностей хорошо известны из уровня техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, *например*, с помощью алгоритма выравнивания для поиска гомологии Нидлмана-Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью метода поиска подобия Липмана-Пирсона, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин), путем ручного выравнивания и визуального осмотра (см., *например*, Brent *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (2003)), с применением алгоритмов, известных из уровня техники, в том числе алгоритмов BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977); и Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным из Национального центра биотехнологической информации.

[92] В некоторых вариантах осуществления определение процента идентичности последовательностей может происходить после локального выравнивания. Такие способы выравнивания хорошо известны из уровня техники, например, сервис EMBOSS Matcher позволяет определить локальное подобие между двумя последовательностями с применением алгоритма, основанного на приложении LALIGN версии 2.0u4. Например, идентичность между двумя последовательностями нуклеиновых кислот может быть рассчитана с использованием сервиса Matcher (EMBOSS), для которого заданы параметры по умолчанию, например, матрица (DNAfull), штраф за открытие гэпа (16), штраф за продление гэпа (4), альтернативные совпадения (1).

[93] «Кассета экспрессии» или «экспрессионная конструкция» относится к полинуклеотидной последовательности ДНК, функционально связанной с промотором. «Операционно связанный» или «функционально связанный» относится

к смежному расположению, при котором описанные таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предполагаемым для них образом. Например, промотор операционно связан с полинуклеотидной последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию полинуклеотидной последовательности.

[94] Используемый в данном документе термин «доставка», который используется взаимозаменяемо с «трансдукцией», относится к процессу, с помощью которого экзогенные молекулы нуклеиновой кислоты переносятся в клетку таким образом, что они располагаются внутри клетки. Доставка нуклеиновых кислот представляет собой процесс, отличающийся от экспрессии нуклеиновых кислот.

[95] Термин «модифицированный» относится к веществу или соединению (*например*, клетке, полинуклеотидной последовательности и/или полипептидной последовательности), которое было изменено или видоизменено по сравнению с соответствующим немодифицированным веществом или соединением.

[96] Термин «образец» относится к биологической композиции (*например*, клетке или части ткани), которая подвергается анализу и/или генетической модификации. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой «первичный образец» в том смысле, что он получен непосредственно от субъекта; в некоторых вариантах осуществления «образец» представляет собой результат обработки первичного образца, например, для удаления определенных компонентов и/или для выделения или очистки определенных компонентов, представляющих интерес.

[97] Термин «ген» или «рекомбинантный ген» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, которая содержит последовательности как экзонов, так и (необязательно) интронов.

[98] Термин «трансфекция» относится к поглощению чужеродной ДНК клеткой. Клетка была «трансфицирована», если экзогенная ДНК была введена внутрь от клеточной мембраны. Ряд методик трансфекции общеизвестен из уровня техники. См., *например*, Graham et al., *Virology* 52:456 (1973); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986); Chu et al., *Gene* 13:197 (1981). Такие методики можно применять для

введения одного или более экзогенных фрагментов ДНК, таких как вектор для интеграции нуклеотидов и другие молекулы нуклеиновой кислоты, в подходящие клетки-хозяева. Этот термин охватывает процедуры химической и электрической трансфекции.

[99] Термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого нуклеиновая кислота транслируется в пептиды или транскрибируется в РНК, которая, например, может транслироваться в пептиды, полипептиды или белки. Если нуклеиновая кислота получена из геномной ДНК, то в случае, если выбраны подходящие эукариотические клетка- или организм-хозяин, экспрессия может включать сплайсинг мРНК. Для того чтобы гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессировалась в клетке-хозяине, она должна сначала быть доставлена в клетку, а затем, оказавшись в клетке, в конечном итоге находиться в ядре.

[100] Термин «генная терапия» включает перенос гетерологичной ДНК в клетки млекопитающего, в частности человека, с нарушениями или состояниями, при которых требуется терапия или диагностика. ДНК вводят в выбранные клетки-мишени таким образом, что гетерологичная ДНК экспрессируется, и продуцируется кодируемый ею терапевтический продукт. В качестве альтернативы гетерологичная ДНК может некоторым образом опосредовать экспрессию ДНК, которая кодирует терапевтический продукт; она может кодировать продукт, такой как пептид или РНК, который некоторым образом прямо или косвенно опосредует экспрессию терапевтического продукта. Генную терапию также можно применять для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт гена, для замены дефектного гена или дополнения продукта гена, продуцируемого млекопитающим или клеткой, в которую она введена. Введенная нуклеиновая кислота может кодировать терапевтический продукт гена, который обычно не продуцируется у хозяина-млекопитающего или который не продуцируется в терапевтически эффективных количествах или в терапевтически полезное время. Гетерологичная ДНК, кодирующая терапевтический продукт, может быть модифицирована перед введением в клетки пораженного заболеванием хозяина для усиления или иного изменения продукта или его экспрессии.

[101] Как используется в данном документе, «гетерологичные» полинуклеотид или нуклеиновая кислота относятся к полинуклеотиду или части

полинуклеотида, полученным из источника, отличного от организма-хозяина, или, в случае вирусного вектора, нативного нерекомбинантного вируса. Примеры гетерологичной ДНК включают, без ограничения, ДНК, кодирующую отслеживаемые маркерные белки, такие как белок, придающий устойчивость к лекарственным средствам, ДНК, кодирующую терапевтически эффективные вещества, такие как противораковые средства, ферменты и гормоны, и ДНК, кодирующую другие типы белков, такие как антитела.

[102] Термин «дикий тип» относится к встречающейся в природе полинуклеотидной последовательности, кодирующей белок, или ее части или последовательности белка или ее части соответственно в том виде, в каком она обычно существует *in vivo* у нормального или здорового субъекта.

[103] Термин «вариант» относится к белку или нуклеиновой кислоте, имеющим одно или более генетических изменений (*например*, вставки, делеции, замены и т. п.), которые сохраняют все или практически все функции эталонного белка или нуклеиновой кислоты. Например, вариант терапевтического белка сохраняет такую же или практически такую же активность и/или обеспечивает такую же или практически такую же терапевтическую пользу для субъекта, нуждающегося в этом. Вариант промоторной последовательности сохраняет способность инициировать транскрипцию на том же или практически том же уровне, что и эталонный промотор, и сохраняет такую же или практически такую же специфичность для типа клеток. В конкретных вариантах осуществления варианты полинуклеотидов характеризуются по меньшей мере или приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью. В конкретных вариантах осуществления варианты белков характеризуются по меньшей мере или приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью.

[104] Термин «субъект» включает животных, таких как, *например*, млекопитающие. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является

приматом. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъекты являются сельскохозяйственными животными, таким как крупный рогатый скот, овцы, козы, коровы, свиньи и т. п.; или одомашненными животными, такими как собаки и кошки. В некоторых вариантах осуществления (*например*, особенно в контексте исследований) субъекты являются грызунами (*например*, мышами, крысами, хомяками), кроликами, приматами или свиньями, такими как инбредные свиньи и т. п. Термины «субъект» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[105] Термин «введение» субъекту означает процедуру, с помощью которой одно или более средств доставки, вместе или по отдельности, вводят субъекту или наносят на субъекта таким образом, что клетки-мишени, присутствующие у субъекта, в конечном итоге контактируют со средством.

[106] «Лечение», как используется в данном документе, относится к доставке средства или композиции субъекту для влияния на физиологический исход.

[107] Используемый в данном документе термин «продукт гена» относится к белку или нуклеиновой кислоте, полученным путем транскрипции полинуклеотида и, в случае белкового продукта гена, последующей трансляции транскрипта в белок. «Терапевтический продукт гена» относится к продукту гена, который обеспечивает терапевтический физиологический эффект или пользу для нуждающегося субъекта в случае экспрессии в терапевтическом количестве у субъекта.

[108] Используемый в данном документе термин «терапевтический белок» относится к белку или полипептиду, который обеспечивает терапевтический физиологический эффект или пользу для нуждающегося субъекта в случае экспрессии у субъекта или введения субъекту в терапевтическом количестве. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью терапевтического белка или вектора, который экспрессирует терапевтический белок, обеспечивает терапевтический физиологический эффект или пользу для субъекта с заболеванием сердца (*например*, для субъекта с кардиомиопатией). Иллюстративные терапевтические белки для лечения заболевания сердца представлены в таблице 2.

[109] Используемый в данном документе термин «кардиомиопатия» относится к ухудшению функции миокарда (*т. е.* собственно сердечной мышцы) по любой причине. Субъекты с кардиомиопатией часто имеют риск развития аритмии или внезапной сердечной смерти или и того, и другого.

[110] Используемый в данном документе термин «гипертрофическая кардиомиопатия» относится к заболеванию сердца и миокарда, при котором часть миокарда гипертрофирована.

[111] Используемый в данном документе термин «семейная гипертрофическая кардиомиопатия» относится к генетическому заболеванию, характеризующемуся усиленным ростом (*т. е.* гипертрофией) толщины стенки левого желудочка.

[112] Используемый в данном документе термин «эффективное количество» относится к минимальному количеству средства или композиции, требуемому для достижения конкретного физиологического эффекта. Эффективное количество конкретного средства может быть представлено различными способами в зависимости от природы средства, как, например, масса/объем, количество клеток/объем, количество частиц/объем, (масса средства)/(масса субъекта), количество клеток/(масса субъекта) или количество частиц/(масса субъекта). Эффективное количество конкретного средства также может быть выражено как полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}), что относится к концентрации средства, которая приводит к конкретному физиологическому ответу определенной величины, находящейся посередине между эталонным уровнем и максимальным уровнем ответа.

II. Полинуклеотиды

[113] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полинуклеотидные последовательности для лечения и/или предупреждения заболевания сердца (*например*, кардиомиопатии). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные последовательности содержат кардиоспецифический промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим один или более терапевтических продуктов гена для лечения и/или предупреждения кардиомиопатии.

[114] Полинуклеотиды относятся к полимерной форме нуклеотидов длиной по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 10000 или по меньшей мере 15000 или больше нуклеотидов — рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов, либо модифицированной формы любого типа нуклеотидов — а также ко всем промежуточным длинам. «Промежуточные длины» в данном контексте означают любую длину между указанными значениями, такими как 6, 7, 8, 9 *и т. д.*, 101, 102, 103 *и т. д.*; 151, 152, 153 *и т. д.*; 201, 202, 203 *и т. д.*

[115] Вследствие вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептид или его фрагмент или вариант, как описано в данном документе. Некоторые из этих полинуклеотидов обладают минимальной гомологией с нуклеотидной последовательностью любого нативного гена. Тем не менее, полинуклеотиды, которые варьируются вследствие различий в частоте использования кодонов, специально рассматриваются в конкретных вариантах осуществления, например, полинуклеотиды, которые оптимизированы для выбора кодонов человека и/или приматов. Кроме того, также можно использовать аллели генов, содержащих полинуклеотидные последовательности, представленные в данном документе. Аллели представляют собой эндогенные гены, измененные в результате одной или более мутаций, таких как делеции, добавления и/или замены нуклеотидов.

[116] Рассматриваемые в данном документе полинуклеотиды, независимо от длины самой кодирующей последовательности, могут быть объединены с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы и/или энхансеры, нетранслируемые области (UTR), сигнальные последовательности, последовательности Козак, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты для рестрикционных ферментов, сайты множественного клонирования, участки внутренней посадки рибосомы (IRES), сайты распознавания рекомбиназы (*например*, сайты LoxP, FRT и Att), терминирующие кодоны, сигналы терминации транскрипции и полинуклеотиды, кодирующие саморасщепляющиеся полипептиды,

эпитопные метки, раскрытые в другом месте данного документа или известные из уровня техники.

[117] Полинуклеотиды можно получать, с ними можно производить манипуляции и/или их экспрессию можно обеспечивать с использованием любой из множества хорошо обоснованных методик, известных и доступных в данной области техники.

[118] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность представляет собой промотор. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность представляет собой промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим терапевтический продукт гена для лечения или предупреждения заболевания сердца (*например*, кардиомиопатии).

[119] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит кардиоспецифический промотор, который функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим терапевтический продукт гена (*например*, кодирующий терапевтический белок, *например*, белок MYBPC3). Используемый в данном документе термин «кардиоспецифический промотор» относится к промотору, активность которого в клетках сердца в по меньшей мере 2 раза выше, чем в клетках любого другого типа, отличного от клеток сердца. Кардиоспецифический промотор, подходящий для применения в векторе по настоящему изобретению, предпочтительно обладает активностью в клетках сердца, которая в по меньшей мере 5 раз, в по меньшей мере 10 раз, в по меньшей мере 15 раз, в по меньшей мере 20 раз, в по меньшей мере 25 раз или в по меньшей мере 50 раз выше по сравнению с его активностью в клетках типа, отличного от клеток сердца.

[120] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит промотор, специфичный для кардиомиоцитов, который функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим терапевтический продукт гена (*например*, белок MYBPC3). Термин «промотор, специфичный для кардиомиоцитов», используемый в данном документе, означает промотор, активность которого в кардиомиоцитах в по меньшей мере 2 раза выше, чем в клетках любого другого типа, отличного от

клеток сердца, или в клетках сердца, не являющихся кардиомиоцитами. Промотор, специфичный для кардиомиоцитов, подходящий для применения в векторе по настоящему изобретению, предпочтительно обладает активностью в кардиомиоцитах, которая в по меньшей мере 5 раз, в по меньшей мере 10 раз, в по меньшей мере 15 раз, в по меньшей мере 20 раз, в по меньшей мере 25 раз или в по меньшей мере 50 раз выше по сравнению с его активностью в клетках типа, отличного от клеток сердца, или клетках типа клеток сердца, не являющихся кардиомиоцитами.

[121] В некоторых вариантах осуществления кардиоспецифический промотор или промотор, специфичный для кардиомиоцитов, представляет собой промотор человека. Примеры кардиоспецифического промотора или промотора, специфичного для кардиомиоцитов, включают без ограничения промотор гена тяжелой цепи альфа-миозина, промотор гена легкой цепи 2v миозина, промотор гена тяжелой цепи альфа-миозина, промотор гена сердечного альфа-актина, промотор гена альфа-тропомиозина, промотор гена сердечного тропонина C, промотор гена сердечного тропонина I, промотор гена сердечного миозинсвязывающего белка C и промотор гена Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA) (*например*, изоформы 2 SERCA2).

[122] В некоторых вариантах осуществления кардиоспецифический промотор представляет собой промотор гена сердечного TNNT2. В некоторых вариантах осуществления промотор гена сердечного TNNT2 модифицирован, *например*, путем делеции, вставки или замены полинуклеотидов. Иллюстративные полинуклеотидные последовательности промотора гена сердечного TNNT2 показаны в **таблице 1** ниже. Сайт начала транскрипции (TSS) промоторов TNNT2 выделен жирным шрифтом и подчеркнут.

Таблица 1. Иллюстративные промоторы TNNT2

Название	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
TNNT2p-600	GTCATGGAGAAGACCCACCTTGCAGATGTCCTCACTGG GGCTGGCAGAGCCGGCAACCTGCCTAAGGCTGCTCAGT CCATTAGGAGCCAGTAGCCTGGAAGATGTCTTTACCCC CAGCATCAGTTCAAGTGGAGCAGCACATAACTCTTGCC CTCTGCCTTCCAAGATTCTGGTGCTGAGACTTATGGAGT GTCTTGGAGGTTGCCTTCTGCCCCCAACCCTGCTCCCA GCTGGCCCTCCCAGGCCTGGGTTGCTGGCCTCTGCTTTA TCAGGATTCTCAAGAGGGACAGCTGGTTTATGTTGCAT GACTGTTCCCTGCATATCTGCTCTGGTTTTAAATAGCTT ATCTGAGCAGCTGGAGGACCACATGGGCTTATATGGCG TGGGGTACATGTTCCCTGTAGCCTTGTCCCTGGCACCTGC CAAAATAGCAGCCAACACCCCCACCCCCACCGCCATC CCCCTGCCCCACCCGTCCCCTGTCGCACATTCCTCCCTC CGCAGGGCTGGCTCACCAGGCCCCAGCCACATGCCTG CTTAAAGCCCTCTCCATCCTCTGCCTCACCCAGTCCCC GCTGAGACTGAGCAGACGCCTCCA	1
TNNT2p-500	GATGTCTTTACCCCCAGCATCAGTTCAAGTGGAGCAGC ACATAACTCTTGCCCTCTGCCTTCCAAGATTCTGGTGCT GAGACTTATGGAGTGTCTTGGAGGTTGCCTTCTGCCCC CAACCCTGCTCCCAGCTGGCCCTCCCAGGCCTGGGTTG CTGGCCTCTGCTTTATCAGGATTCTCAAGAGGGACAGC TGGTTTATGTTGCATGACTGTTCCCTGCATATCTGCTCT GGTTTTAAATAGCTTATCTGAGCAGCTGGAGGACCACA TGGGCTTATATGGCGTGGGGTACATGTTCCCTGTAGCCTT GTCCCTGGCACCTGCCAAAATAGCAGCCAACACCCCC ACCCCCACCGCCATCCCCCTGCCCCACCCGTCCCCTGTC GCACATTCCTCCCTCCGCAGGGCTGGCTCACCAGGCC CAGCCACATGCCTGCTTAAAGCCCTCTCCATCCTCTG CCTCACCCAGTCCCCGCTGAGACTGAGCAGACGCCTCC A	2
TNNT2p-400	GTTGCCTTCTGCCCCCAACCCTGCTCCCAGCTGGCCCT CCCAGGCCTGGGTTGCTGGCCTCTGCTTTATCAGGATTC TCAAGAGGGACAGCTGGTTTATGTTGCATGACTGTTCC CTGCATATCTGCTCTGGTTTTAAATAGCTTATCTGAGCA GCTGGAGGACCACATGGGCTTATATGGCGTGGGGTACA TGTTCCCTGTAGCCTTGTCCCTGGCACCTGCCAAAATAGC AGCCAACACCCCCACCCCCACCGCCATCCCCCTGCC CACCCGTCCCCTGTCGCACATTCCTCCCTCCGCAGGGCT GGCTCACCAGGCCCCAGCCACATGCCTGCTTAAAGCC CTCTCCATCCTCTGCCTCACCCAGTCCCCGCTGAGACT GAGCAGACGCCTCCA	3
TNNT2p-300	GTTGCATGACTGTTCCCTGCATATCTGCTCTGGTTTTAA ATAGCTTATCTGAGCAGCTGGAGGACCACATGGGCTTA	4

	TATGGCGTGGGGTACATGTTCCCTGTAGCCTTGTCCTGG CACCTGCCAAAATAGCAGCCAACACCCCCACCCCCAC CGCCATCCCCCTGCCCCACCCGTCCCCTGTTCGCACATTC CTCCCTCCGCAGGGCTGGCTCACCAGGCCCCAGCCCAC ATGCCTGCTTAAAGCCCT <u>CTCCAT</u> CCTCTGCCTCACCC AGTCCCCGCTGAGACTGAGCAGACGCCTCCA	
--	--	--

[123] В некоторых вариантах осуществления промотор гена сердечного TNNT2 модифицирован таким образом, чтобы он содержал полинуклеотидную последовательность длиной приблизительно 200—500 пар оснований, приблизительно 250—500 пар оснований, приблизительно 300—500 пар оснований, приблизительно 350—500 пар оснований, приблизительно 400—500 пар оснований, приблизительно 450—500 пар оснований, приблизительно 200—450 пар оснований, приблизительно 200—400 пар оснований, приблизительно 200—350 пар оснований, приблизительно 200—300 пар оснований и приблизительно 200—250 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления модифицированный промотор гена сердечного TNNT2 содержит полинуклеотидную последовательность из от приблизительно 350 пар оснований до приблизительно 450 пар оснований, от приблизительно 375 пар оснований до приблизительно 425 пар оснований, от приблизительно 375 пар оснований до приблизительно 400 пар оснований, от приблизительно 375 пар оснований до приблизительно 425 пар оснований, от приблизительно 400 пар оснований до приблизительно 425 пар оснований или от приблизительно 400 пар оснований до приблизительно 450 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления промотор гена сердечного TNNT2 содержит полинуклеотидную последовательность из приблизительно 400 пар оснований.

[124] В конкретном варианте осуществления модифицированный промотор гена сердечного тропонина Т содержит от 300 п. о. до 500 п. о. из SEQ ID NO: 1. Например, модифицированный промотор гена сердечного тропонина Т может содержать SEQ ID NO: 3. В некоторых примерах последовательность размером от 300 п. о. до 500 п. о. может быть связана с дополнительными полинуклеотидными последовательностями, но может не быть связана с дополнительными последовательностями, полученными из SEQ ID NO: 1. Например, в одном варианте осуществления модифицированный промотор гена сердечного тропонина Т может содержать не более 500 п. о. из SEQ ID NO: 1, но может содержать дополнительные неродственные полинуклеотидные последовательности. В другом примере

модифицированный промотор гена сердечного тропонина Т может содержать SEQ ID NO: 3, не иметь дополнительных последовательностей, полученных из SEQ ID NO: 1, но может содержать дополнительные неродственные полинуклеотидные последовательности.

[125] В некоторых вариантах осуществления промотор гена сердечного TNNT2 модифицирован путем делеции полинуклеотидов. Модификация может включать одну, две, три или больше внутренних делеций. Каждая делеция может представлять собой делецию 1 пары оснований, 2 пар оснований, 3 пар оснований, 4 пар оснований, 5 пар оснований, 10 пар оснований, 15 пар оснований, 20 пар оснований, 25 пар оснований, 30 пар оснований, 40 пар оснований, 50 пар оснований, 60 пар оснований, 70 пар оснований, 80 пар оснований, 90 пар оснований, 100 пар оснований, 125 пар оснований, 150 пар оснований, 175 пар оснований, 200 пар оснований, 225 пар оснований, 250 пар оснований, 275 пар оснований или 300 пар оснований относительно эталонного промотора гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 1), имеющего приблизительно 600 пар оснований.

[126] В некоторых вариантах осуществления промотор TNNT2 модифицирован путем делеции полинуклеотидов с вышерасположенного конца промотора относительно эталонного промотора гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 1), имеющего приблизительно 600 пар оснований. Модификация может включать в себя делецию 1 пары оснований, 2 пар оснований, 3 пар оснований, 4 пар оснований, 5 пар оснований, 10 пар оснований, 15 пар оснований, 20 пар оснований, 25 пар оснований, 30 пар оснований, 40 пар оснований, 50 пар оснований, 60 пар оснований, 70 пар оснований, 80 пар оснований, 90 пар оснований, 100 пар оснований, 125 пар оснований, 150 пар оснований, 175 пар оснований, 200 пар оснований, 225 пар оснований, 250 пар оснований, 275 пар оснований или 300 пар оснований с вышерасположенного конца промотора относительно эталонного промотора гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 1), имеющего приблизительно 600 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой делецию 200 пар оснований с вышерасположенного конца промотора относительно эталонного промотора гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 1), имеющего приблизительно 600 пар оснований.

[127] В некоторых вариантах осуществления промотор гена сердечного TNNT2 модифицирован путем делеции полинуклеотидов с нижерасположенного конца промотора относительно эталонного промотора гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 1), имеющего приблизительно 600 пар оснований. Модификация может включать в себя делецию 1 пары оснований, 2 пар оснований, 3 пар оснований, 4 пар оснований, 5 пар оснований, 10 пар оснований, 15 пар оснований, 20 пар оснований, 25 пар оснований, 30 пар оснований, 40 пар оснований, 50 пар оснований, 60 пар оснований, 70 пар оснований, 80 пар оснований, 90 пар оснований, 100 пар оснований, 125 пар оснований, 150 пар оснований, 175 пар оснований, 200 пар оснований, 225 пар оснований, 250 пар оснований, 275 пар оснований или 300 пар оснований с нижерасположенного конца промотора относительно эталонного промотора гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 1), имеющего приблизительно 600 пар оснований.

[128] В некоторых вариантах осуществления промотор гена сердечного TNNT2 модифицирован путем внутренней делеции полинуклеотидов. Модификация может включать в себя внутреннюю делецию 1 пары оснований, 2 пар оснований, 3 пар оснований, 4 пар оснований, 5 пар оснований, 10 пар оснований, 15 пар оснований, 20 пар оснований, 30 пар оснований, 40 пар оснований, 50 пар оснований, 60 пар оснований, 70 пар оснований, 80 пар оснований, 90 пар оснований, 100 пар оснований, 125 пар оснований, 150 пар оснований, 175 пар оснований, 200 пар оснований, 225 пар оснований, 250 пар оснований, 275 пар оснований или 300 пар оснований относительно эталонного промотора гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 1).

[129] В некоторых вариантах осуществления промотор гена сердечного TNNT2 модифицирован путем вставки полинуклеотидов. Модификация может включать в себя вставку 1 пары оснований, 2 пар оснований, 3 пар оснований, 4 пар оснований, 5 пар оснований, 10 пар оснований, 15 пар оснований, 20 пар оснований, 25 пар оснований, 30 пар оснований, 35 пар оснований, 40 пар оснований, 45 пар оснований, 50 пар оснований, 55 пар оснований, 60 пар оснований, 65 пар оснований, 70 пар оснований, 75 пар оснований, 80 пар оснований, 85 пар оснований, 90 пар оснований, 100 пар оснований, 125 пар оснований, 150 пар оснований, 175 пар оснований, 200 пар оснований, 225 пар оснований, 250 пар оснований, 275 пар

оснований или 300 пар оснований относительно эталонного промотора гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 1).

[130] В некоторых вариантах осуществления промотор гена сердечного TNNT2 модифицирован путем замены полинуклеотидов. Модификация может включать в себя замену 1 пары оснований, 2 пар оснований, 3 пар оснований, 4 пар оснований, 5 пар оснований, 6 пар оснований, 7 пар оснований, 8 пар оснований, 9 пар оснований или 10 пар оснований относительно эталонного промотора гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 1).

[131] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность промотора TNNT2 обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью от -450 пар оснований до +1 пары оснований относительно сайта начала транскрипции гена TNNT2 человека. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность промотора TNNT2 обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью от -350 пар оснований до +1 пары оснований относительно сайта начала транскрипции гена TNNT2 человека. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность промотора TNNT2 обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью от -250 пар оснований до +1 пары оснований относительно сайта начала транскрипции гена TNNT2 человека.

[132] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность промотора гена сердечного TNNT2 обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью от -450 пар оснований до +50 пар оснований относительно сайта начала транскрипции гена TNNT2. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность промотора гена сердечного TNNT2 обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью от -350 пар

оснований до +50 пар оснований относительно сайта начала транскрипции гена TNNT2. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность промотора гена сердечного TNNT2 обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с полинуклеотидной последовательностью от -250 пар оснований до +5 пар оснований относительно сайта начала транскрипции гена TNNT2.

[133] В некоторых вариантах осуществления промотор гена сердечного TNNT2 содержит полинуклеотид, содержащий последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1—85. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1—85. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 90% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1—85. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1—85. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 100% идентичностью с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 100% идентичностью с SEQ ID NO: 3.

В. Иллюстративные продукты генов (белки)

[134] Промоторы по настоящему изобретению могут быть функционально связаны с полинуклеотидом, содержащим последовательность, кодирующую продукт гена (*например*, белок или нуклеиновую кислоту). В некоторых вариантах осуществления продукт гена представляет собой терапевтический белок. Терапевтический белок может представлять собой любой из нативных белков человека, перечисленных в таблице 2, или их функциональных гомологов или вариантов. Промоторы по настоящему изобретению особенно подходят для использования с крупными генами, которые в иных случаях могут экспрессироваться на низких уровнях или не экспрессироваться при доставке с помощью вирусного вектора. Преимущество некоторых вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, заключается в возможности экспрессировать терапевтический белок (в частности, крупный терапевтический белок) в вирусном векторе, имеющем ограниченную упаковочную способность, *например*, в векторе на основе AAV. «Крупный» белок представляет собой любой белок, размер которого влияет на экспрессию в выбранном векторе. Как правило, «крупные» терапевтические белки содержат по меньшей мере приблизительно 1000 или больше аминокислот, т. е. белок кодируется полинуклеотидной последовательностью размером приблизительно 3 т. п. о. или больше. Иллюстративные белки, в том числе крупные белки, представлены в таблице 2 ниже.

Таблица 2. Иллюстративные белки

Название гена	Обозначение гена	ID гена в NCBI	ID в UniProt
Миозинсвязывающий белок С	MYBPC3	4607	Q14896
Представитель 2 подсемейства Н калиевых потенциалзависимых каналов	KCNH2	3757	Q12809
Представитель 4 подсемейства М катионных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом	TRPM4	54795	Q8TD43
Десмоглеин-2	DSG2	1829	Q14126
Кальций-транспортирующая АТРаза 2 саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума	ATP2A2	488	P16615
Субъединица альфа-1С кальциевого потенциалзависимого канала	CACNA1C	775	Q13936

Название гена	Обозначение гена	ID гена в NCBI	ID в UniProt
Дистрофин	DMD	1756	P11532
Протеинкиназа DM1	DMPK	1760	Q09013
Гомолог белка 5 эктопических Р-гранул	EPG5	57724	Q9HCE0
Субъединица 1 цилиарного комплекса EvC	EVC	2121	P57679
Лимбин	EVC2	132884	Q86UK5
Фибриллин-1	FBN1	2200	P35555
Нейрофибрин	NF1	4763	P21359
Альфа-субъединица белка натриевых каналов 5 типа	SCN5A	6331	Q14524
Гомолог 1 Son of Sevenless	SOS1	6654	Q07889
Рецептор 1 натрийуретического пептида	NPR1	4881	P16066
Рецепторная тирозиновая протеинкиназа erbB-4	ERBB4	2066	Q15303
Вазоактивный интестинальный пептид	VIP	7432	P01282
Тяжелая цепь бета-миозина	MYH7	4625	P12883

[135] Различные терапевтические полинуклеотиды или терапевтические белки, кодируемые полинуклеотидами, имеющие длину 3 тысячи пар оснований или больше, экспрессируются более эффективно в случае, когда они функционально связаны с модифицированным промотором TNNT2 по настоящему изобретению, по сравнению с промотором TNNT2 из приблизительно 600 пар оснований. Промоторы по настоящему изобретению применимы для экспрессии по меньшей мере следующего: а) крупных генов, в которых мутации потери функции приводят к кардиомиопатии (генная заместительная терапия); б) крупных генов, экспрессия которых в кардиомиоцитах является кардиопротективной; в) комбинации генов, совместная экспрессия которых в кардиомиоцитах является благоприятной; и д) инструментов для редактирования генома, специфичного для кардиомиоцитов. «Крупный» ген представляет собой любой ген, размер которого влияет на экспрессию в выбранном векторе. Как правило, «крупные» терапевтические гены кодируют белки, которые содержат по меньшей мере приблизительно 1000 или больше аминокислот, т. е. ген содержит полинуклеотидную последовательность размером приблизительно 3 т. п. о. или больше. В дополнительных вариантах осуществления векторы и промоторы по настоящему изобретению применяются для

лечения заболеваний или нарушений, перечисленных в таблице 3, где полинуклеотид кодирует терапевтический белок, указанный в таблице.

Таблица 3. Иллюстративные терапевтические продукты генов для лечения заболевания сердца

Состояние	Терапевтический продукт гена	Размер гена (т. о.)
Синдром Тимоти	CACNA1C	6,663
Мышечная дистрофия Беккера	DMD	11,055
Мышечная дистрофия Дюшенна	DMD	11,055
Миотоническая дистрофия 1 типа	DMPK	4,653
Синдром Вичи	EPG5	7,737
Синдром Эллиса-ван Кревельда	EVC	2,976
Синдром Эллиса-ван Кревельда	EVC2	3,924
Синдром Марфана	FBN1	8,613
Синдром удлиненного интервала QT	KCNH2	3,477
Нейрофиброматоз с синдромом Нунан	NF1	3,517
Синдром Бругада	SCN5A	6,048
Синдром удлиненного интервала QT	SCN5A	6,048
Пароксизмальная фибрилляция желудочков 1 типа	SCN5A	6,048
Прогрессирующая семейная блокада сердца типа 1А	SCN5A	6,048
Синдром Нунан	SOS1	3,999
Прогрессирующая семейная блокада сердца типа 1В	TRPM4	3,642
Острая декомпенсированная сердечная недостаточность (ADHF)	NPR1	3,183
Застойная сердечная недостаточность (CHF)	ERBB4	3,924
Застойная сердечная недостаточность (CHF)	Аналог VIP*	3,729
Гипертрофическая кардиомиопатия	MYBPC3	3,822
Некомпактная кардиомиопатия левого желудочка	MYBPC3	3,822
Гипертрофическая кардиомиопатия	MYH7	5,805
Некомпактная кардиомиопатия левого желудочка	MYH7	5,805

*VIP слит с биополимером ELP (например, PB1046) для увеличения стабильности in vivo

[136] *MYBPC3* представляет собой ген, экспрессируемый в клетках сердца. Известно, что различные мутации в *MYBPC3* вызывают гипертрофическую кардиомиопатию. Почти половина всех мутаций, вызывающих гипертрофическую кардиомиопатию, приводит к усечениям посредством нонсенс-мутаций, мутаций

сдвига рамки считывания или мутаций сайтов сплайсинга (Marian and Braunwald, *Circ. Res.* 121:749-770 (2017); Walsh et al., *Genet. Med.* 19:192-203 (2017). мРНК, содержащие преждевременные стоп-кодоны, подвергаются надзору и разрушению с помощью механизма нонсенс-опосредованного распада. Это согласуется со сниженными уровнями мутантных РНК при анализе сердечной ткани пациентов с гипертрофической кардиомиопатией, перенесших процедуры миоэктомии (Marston et al., *Circ. Res.* 105:219-222 (2009); van Dijk et al., *Circulation* 119:1473-1483 (2009); Helms et al., *Circ. Cardiovasc. Genet.* 7:434-443 (2014). Кроме того, любые полученные усеченные полипептиды оказываются чувствительными к воздействию убиквитин-протеасомной системы разрушения. В образцах пациентов после миоэктомии не наблюдался усеченный белок при девяти различных мутациях (Rottbauer et al., *J. Clin. Invest.* 100:475-482 (1997); Moolman et al., *Circulation* 101:1396-1402 (2000); Marston et al., *Circ. Res.* 105:219-222 (2009); van Dijk et al., *Circ. Heart Fail* 5:36-46 (2012)). Несмотря на то, что экспрессия аллеля *MYBPC3* дикого типа у гетерозиготных пациентов, по-видимому, незначительно повышена, общее количество белка MYBPC3, включенного в состав саркомеров, падает значительно ниже нормы и составляет ~ 65% (Marston et al., *Circ. Res.* 105:219-222 (2009); van Dijk et al., *Circ. Heart Fail* 5:36-46 (2012); McNamara et al., *PLoS One* 12:e0180064 (2017)). Таким образом, патофизиологические процессы в саркомерах у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией с мутациями усечения *MYBPC3*, по-видимому, обусловлены гаплонедостаточностью.

[137] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок MYBPC3, функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором гена сердечного TNNT2), представляет собой *MYBPC3* или его мутантную форму, вариант или фрагмент. У людей ген *MYBPC3* кодирует белок MYBPC3 (также известный как MyBP-C), который отвечает за регуляцию сердечного саркомера — основной единицы мышечного сокращения. Саркомер сердечной мышцы состоит из толстых и тонких филаментов, и MYBPC3 прикрепляется к толстым филаментам,

чтобы предотвратить преждевременное разрушение. Иллюстративные полинуклеотидные последовательности МУВРС3 показаны в **таблице 4А** ниже. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий МУВРС3, обладает по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 86—89. Иллюстративные последовательности белков МУВРС3 показаны в **таблице 4В**. В некоторых вариантах осуществления геном вектора кодирует белок МУВРС3, который обладает по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 103—106.

Таблица 4А. Иллюстративные полинуклеотидные последовательности МУВРС3

Название	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
МУВРС3	ATGCCTGAGCCGGGGAAGAAGCCAGTCTCAGCTTTTAGC AAGAAGCCACGGTCAAGTGGAGGAGTGGCCGCAGGCAGCCCT GCCGTGTTTCGAGGCCGAGACAGAGCGGGCAGGAGTGAAG GTGCGCTGGCAGCGCGGAGGCAGTGACATCAGCGCCAGC AACAAGTACGGCCTGGCCACAGAGGGCACACGGCATAACG CTGACAGTGCGGGAAGTGGGCCCTGCCGACCAGGGATCT TACGCAGTCATTGCTGGCTCCTCCAAGGTCAAGTTCGACC TCAAGGTCATAGAGGCAGAGAAGGCAGAGCCCATGCTGG CCCCTGCCCTGCCCTGCTGAGGCCACTGGAGCCCCTGG AGAAGCCCCGGCCCCAGCCGCTGAGCTGGGAGAAAGTGC CCAAGTCCCAAAGGGTCAAGCTCAGCAGCTCTCAATGGT CCTACCCCTGGAGCCCCCGATGACCCCATGGCCTCTTCG TGATGCGGCCACAGGATGGCGAGGTGACCGTGGGTGGCA GCATCACCTTCTCAGCCCGCGTGGCCGGCGCCAGCCTCCT GAAGCCGCCTGTGGTCAAGTGGTTCAAGGGCAAATGGGT GGACCTGAGCAGCAAGGTGGGCCAGCACCTGCAGCTGCA CGACAGCTACGACCGCGCCAGCAAGGTCTATCTGTTCGAG CTGCACATACCGATGCCAGCCTGCCTTCACTGGCAGCT ACCGCTGTGAGGTGTCCACCAAGGACAAATTTGACTGCTC CAACTTCAATCTCACTGTCCACGAGGCCATGGGCACCGGA GACCTGGACCTCCTATCAGCCTTCCGCCGCACGAGCCTGG CTGGAGGTGGTTCGGCGGATCAGTGATAGCCATGAGGACA CTGGGATTCTGGACTTCAGCTCACTGCTGAAAAAGAGAG ACAGTTTCCGGACCCCGAGGGACTCGAAGCTGGAGGCAC CAGCAGAGGAGGACGTGTGGGAGATCCTACGGCAGGCAC CCCATCTGAGTACGAGCGCATCGCCTTCCAGTACGGCGT CACTGACCTGCGCGGCATGCTAAAGAGGCTCAAGGGCAT GAGGCGCGATGAGAAGAAGAGCACAGCCTTTCAGAAGAA GCTGGAGCCGGCCTACCAGGTGAGCAAAGGCCACAAGAT	86

CCGGCTGACCGTGGAACCTGGCTGACCATGACGCTGAGGT
CAAATGGCTCAAGAATGGCCAGGAGATCCAGATGAGCGG
CAGCAAGTACATCTTTGAGTCCATCGGTGCCAAGCGTACC
CTGACCATCAGCCAGTGCTCATTGGCGGACGACGCAGCCT
ACCAGTGCCTGGTGGGTGGCGAGAAGTGTAGCACGGAGC
TCTTTGTGAAAGAGCCCCCTGTGCTCATCACGCGCCCCCT
GGAGGACCAGCTGGTGTGGTGGGGCAGCGGGTGGAGTT
TGAGTGTGAAGTATCGGAGGAGGGGGCGCAAGTCAAATG
GCTGAAGGACGGGGTGGAGCTGACCCGGGAGGAGACCTT
CAAATACCGGTTCAAGAAGGACGGGCAGAGACACCACCT
GATCATCAACGAGGCCATGCTGGAGGACGCGGGGCACTA
TGCACTGTGCACTAGCGGGGGCCAGGCGCTGGCTGAGCT
CATTGTGCAGGAAAAGAAGCTGGAGGTGTACCAGAGCAT
CGCAGACCTGATGGTGGGCGCAAAGGACCAGGCGGTGTT
CAAATGTGAGGTCTCAGATGAGAATGTTCCGGGGTGTGTG
GCTGAAGAATGGGAAGGAGCTGGTGCCCGACAGCCGCAT
AAAGGTGTCCACATCGGGCGGGTCCACAACTGACCAT
TGACGACGTCACACCTGCCGACGAGGCTGACTACAGCTTT
GTGCCCGAGGGCTTCGCCTGCAACCTGTCAGCCAAGCTCC
ACTTCATGGAGGTCAAGATTGACTTCGTACCCAGGCAGGA
ACCTCCCAAGATCCACCTGGACTGCCCAGGCCGCATACCA
GACACCATTGTGGTTGTAGCTGGAAATAAGCTACGTCTGG
ACGTCCCTATCTCTGGGGACCCCGCTCCCACTGTGATCTG
GCAGAAGGCTATCACGCAGGGGAATAAGGCCCCAGCCAG
GCCAGCCCCAGATGCCCCAGAGGACACAGGTGACAGCGA
TGAGTGGGTGTTTGACAAGAAGCTGCTGTGTGAGACCGA
GGGCCGGGTCCGCGTGGAGACCACCAAGGACCGCAGCAT
CTTACGGTCGAGGGGGCAGAGAAGGAAGATGAGGGCGT
CTACACGGTCACAGTGAAGAACCCTGTGGGCGAGGACCA
GGTCAACCTCACAGTCAAGGTCATCGACGTGCCAGACGC
ACCTGCGGCCCCCAAGATCAGCAACGTGGGAGAGGACTC
CTGCACAGTACAGTGGGAGCCGCCTGCCTACGATGGCGG
GCAGCCCATCCTGGGCTACATCCTGGAGCGCAAGAAGAA
GAAGAGCTACCGGTGGATGCGGCTGAACTTCGACCTGATT
CAGGAGCTGAGTCATGAAGCGCGGCGCATGATCGAGGGC
GTGGTGTACGAGATGCGCGTCTACGCGGTCAACGCCATCG
GCATGTCCAGGCCAGCCCTGCCTCCAGCCCTTCATGCC
TATCGGTCCCCCAGCGAACCACCCACCTGGCAGTAGAG
GACGTCTCTGACACCACGGTCTCCCTCAAGTGGCGGCCCC
CAGAGCGCGTGGGAGCAGGAGGCCTGGATGGCTACAGCG
TGGAGTACTGCCAGAGGGCTGCTCAGAGTGGGTGGCTG
CCCTGCAGGGGCTGACAGAGCACACATCGATACTGGTGA
AGGACCTGCCACGGGGGCGCGGCTGCTTTTCCGAGTGCG
GGCACACAATATGGCAGGGCCTGGAGCCCCTGTTACCAC
CACGGAGCCGGTGACAGTGCAGGAGATCCTGCAACGGCC
ACGGCTTCAGCTGCCAGGCACCTGCGCCAGACCATTAG
AAGAAGGTCCGGGAGCCTGTGAACCTTCTCATCCCTTTCC
AGGGCAAGCCCCGGCCTCAGGTGACCTGGACCAAGAGG

	<p>GGCAGCCCCTGGCAGGCGAGGAGGTGAGCATCCGCAACA GCCCCACAGACACCATCCTGTTCATCCGGGCCGCTCGCCG CGTGCAATTCAGGCACTTACCAGGTGACGGTGCGCATTGAG AACATGGAGGACAAGGCCACGCTGGTGCTGCAGGTTGTT GACAAGCCAAGTCCTCCCCAGGATCTCCGGGTGACTGAC GCCTGGGGTCTTAATGTGGCTCTGGAGTGGAAGCCACCCC AGGATGTCGGCAACACGGA ACTCTGGGGGTACACAGTGC AGAAAGCCGACAAGAAGACCATGGAGTGGTTCACCGTCT TGGAGCATTACCGCCGCACCCACTGCGTGGTGCCAGAGCT CATCATTGGCAATGGCTACTACTTCCGCGTCTTCAGCCAG AATATGGTTGGCTTTAGTGACAGAGCGGCCACCACCAAG GAGCCCGTCTTTATCCCCAGACCAGGCATCACCTATGAGC CACCCA ACTATAAGGCCCTGGACTTCTCCGAGGCCCAAG CTTCACCCAGCCCCTGGTGAACCGCTCGGTCATCGCGGGC TACTGCTATGCTCTGCTGTGCTGTCCGGGGTAGCCCCA AGCCCAAGATTTCTGGTTCAAGAATGGCCTGGACCTGGG AGAAGACGCCCGCTTCCGCATGTTCAAGCAAGCAGGGAGT GTTGACTCTGGAGATTAGAAAGCCCTGCCCTTTGACGGG GGCATCTATGTCTGCAGGGCCACCAACTTACAGGGCGAG GCACGGTGTGAGTGCCGCCTGGAGGTGCGAGTGCCTCAG TAA</p>	
<p>MYBPC3- delC3</p>	<p>ATGCCTGAGCCGGGGAAGAAGCCAGTCTCAGCTTTTAGC AAGAAGCCACGGTCAGTGGAAGTGGCCGCAGGCAGCCCT GCCGTGTTTCGAGGCCGAGACAGAGCGGGCAGGAGTGAAG GTGCGCTGGCAGCGCGGAGGCAGTGACATCAGCGCCAGC ACAAGTACGGCCTGGCCACAGAGGGCACACGGCATAACG CTGACAGTGCGGGAAGTGGGCCCTGCCGACCAGGGATCT TACGCAGTCATTGCTGGCTCCTCCAAGGTCAAGTTCGACC TCAAGGTCATAGAGGCAGAGAAGGCAGAGCCCATGCTGG CCCCTGCCCTGCCCTGCTGAGGCCACTGGAGCCCCTGG AGAAGCCCCGGCCCCAGCCGCTGAGCTGGGAGAAAGTGC CCCAAGTCCCAAAGGGTCAAGCTCAGCAGCTCTCAATGGT CCTACCCCTGGAGCCCCCGATGACCCCATGGCCTCTTCG TGATGCGGCCACAGGATGGCGAGGTGACCGTGGGTGGCA GCATCACCTTCTCAGCCCGCGTGGCCGGCGCCAGCCTCCT GAAGCCGCCTGTGGTCAAGTGGTTCAAGGGCAAATGGGT GGACCTGAGCAGCAAGGTGGGCCAGCACCTGCAGCTGCA CGACAGCTACGACCGCGCCAGCAAGGTCTATCTGTTCGAG CTGCACATCACCGATGCCAGCCTGCCTTCACTGGCAGCT ACCGCTGTGAGGTGTCCACCAAGGACAAATTTGACTGCTC CAACTTCAATCTCACTGTCCACGAGGCCATGGGCACCGGA GACCTGGACCTCCTATCAGCCTTCCGCCGCACGAGCCTGG CTGGAGGTGGTCGGCGGATCAGTGATAGCCATGAGGACA CTGGGATTCTGGACTTCAGCTCACTGCTGAAAAAGAGAG ACAGTTTCCGGACCCCGAGGGACTCGAAGCTGGAGGCAC CAGCAGAGGAGGACGTGTGGGAGATCCTACGGCAGGCAC CCCCATCTGAGTACGAGCGCATCGCCTTCCAGTACGGCGT</p>	<p>87</p>

CACTGACCTGCGCGGCATGCTAAAGAGGCTCAAGGGCAT
GAGGCGCGATGAGAAGAAGAGCACAGCCTTTCAGAAGAA
GCTGGAGCCGGCCTACCAGGTGAGCAAAGGCCACAAGAT
CCGGCTGACCGTGGAACTGGCTGACCATGACGCTGAGGT
CAAATGGCTCAAGAATGGCCAGGAGATCCAGATGAGCGG
CAGCAAGTACATCTTTGAGTCCATCGGTGCCAAGCGTACC
CTGACCATCAGCCAGTGCTCATTGGCGGACGACGCAGCCT
ACCAGTGCGTGGTGGGTGGCGAGAAGTGTAGCACGGAGC
TCTTTGTGAAAGAGCCCCCTGTGTACCAGAGCATCGCAGA
CCTGATGGTGGGCGCAAAGGACCAGGCGGTGTTCAAATG
TGAGGTCTCAGATGAGAATGTTTCGGGGTGTGTGGCTGAA
GAATGGGAAGGAGCTGGTGCCCGACAGCCGCATAAAGGT
GTCCACATCGGGCGGGTCCACAACTGACCATTGACGA
CGTCACACCTGCCGACGAGGCTGACTACAGCTTTGTGCC
GAGGGCTTCGCCTGCAACCTGTCAGCCAAGCTCCACTTCA
TGGAGGTCAAGATTGACTTCGTACCCAGGCAGGAACCTCC
CAAGATCCACCTGGACTGCCCAGGCCGCATACCAGACAC
CATTGTGGTTGTAGCTGGAAATAAGCTACGTCTGGACGTC
CCTATCTCTGGGGACCCCGCTCCCACTGTGATCTGGCAGA
AGGCTATCACGCAGGGGAATAAGGCCCCAGCCAGGCCAG
CCCAGATGCCCCAGAGGACACAGGTGACAGCGATGAGT
GGGTGTTTGACAAGAAGCTGCTGTGTGAGACCGAGGGCC
GGGTCCGCGTGGAGACCACCAAGGACCGCAGCATCTTCA
CGGTGAGGGGGCAGAGAAGGAAGATGAGGGCGTCTACA
CGGTACAGTGAAGAACCCTGTGGGCGAGGACCAGGTCA
ACCTCACAGTCAAGGTCATCGACGTGCCAGACGCACCTGC
GGCCCCAAGATCAGCAACGTGGGAGAGGACTCCTGCAC
AGTACAGTGGGAGCCGCCTGCCTACGATGGCGGGCAGCC
CATCCTGGGCTACATCCTGGAGCGCAAGAAGAAGAAGAG
CTACCGGTGGATGCGGCTGAACTTCGACCTGATTCAGGAG
CTGAGTCATGAAGCGCGGCATGATCGAGGGCGTGGTG
TACGAGATGCGCGTCTACGCGGTCAACGCCATCGGCATGT
CCAGGCCAGCCCTGCCTCCAGCCCTTCATGCCTATCGG
TCCCCCAGCGAACCCACCCACCTGGCAGTAGAGGACGT
CTCTGACACCACGGTCTCCCTCAAGTGGCGGCCCCAGAG
CGCGTGGGAGCAGGAGGCCTGGATGGCTACAGCGTGGAG
TACTGCCAGAGGGCTGCTCAGAGTGGGTGGCTGCCCTGC
AGGGGCTGACAGAGCACACATCGATACTGGTGAAGGACC
TGCCACGGGGGCGCGGCTGCTTTTCCGAGTGCGGGCACA
CAATATGGCAGGGCCTGGAGCCCCTGTTACCACCACGGA
GCCGGTGACAGTGCAGGAGATCCTGCAACGGCCACGGCT
TCAGCTGCCAGGCACCTGCGCCAGACCATTGAGAAGAA
GGTCGGGGAGCCTGTGAACCTTCTCATCCCTTTCCAGGGC
AAGCCCCGGCCTCAGGTGACCTGGACCAAAGAGGGGCAG
CCCCTGGCAGGCGAGGAGGTGAGCATCCGCAACAGCCCC
ACAGACACCATCCTGTTTCATCCGGGCCGCTCGCCGCGTGC
ATTGAGGCACTTACCAGGTGACGGTGCATGAGAACAT
GGAGGACAAGGCCACGCTGGTGCTGCAGGTTGTTGACAA

	<p>GCCAAGTCCTCCCCAGGATCTCCGGGTGACTGACGCCTGG GGTCTTAATGTGGCTCTGGAGTGGAAGCCACCCCAGGATG TCGGCAACACGGA ACTCTGGGGGTACACAGTGCAGAAAG CCGACAAGAAGACCATGGAGTGGTTACCGTCTTGGAGC ATTACCGCCGCACCCACTGCGTGGTGCCAGAGCTCATCAT TGGCAATGGCTACTACTTCCGCGTCTTCAGCCAGAATATG GTTGGCTTTAGTGACAGAGCGGCCACCACCAAGGAGCCC GTCTTTATCCCCAGACCAGGCATCACCTATGAGCCACCCA ACTATAAGGCCCTGGACTTCTCCGAGGCCCAAGCTTCAC CCAGCCCCTGGTGAACCGCTCGGTCATCGCGGGCTACACT GCTATGCTCTGCTGTGCTGTCCGGGGTAGCCCCAAGCCCA AGATTTCTGGTTCAAGAATGGCCTGGACCTGGGAGAAG ACGCCCCTTCCGCATGTTCAAGCAAGCAGGGAGTGTGAC TCTGGAGATTAGAAAGCCCTGCCCTTTGACGGGGGCATC TATGTCTGCAGGGCCACCAACTTACAGGGCGAGGCACGG TGTGAGTGCCGCCTGGAGGTGCGAGTGCCTCAGTAA</p>	
<p>MYBPC3- delC4</p>	<p>ATGCCTGAGCCGGGGAAGAAGCCAGTCTCAGCTTTTAGC AAGAAGCCACGGTCAAGTGGAAAGTGGCCGCAGGCAGCCCT GCCGTGTTTCGAGGCCGAGACAGAGCGGGCAGGAGTGAAG GTGCGCTGGCAGCGCGGAGGCAGTGACATCAGCGCCAGC ACAAGTACGGCCTGGCCACAGAGGGCACACGGCATAACG CTGACAGTGCGGGAAGTGGGCCCTGCCGACCAGGGATCT TACGCAGTCATTGCTGGCTCCTCCAAGGTCAAGTTCGACC TCAAGGTCATAGAGGCAGAGAAGGCAGAGCCCATGCTGG CCCCTGCCCTGCCCTGCTGAGGCCACTGGAGCCCCTGG AGAAGCCCCGGCCCCAGCCGCTGAGCTGGGAGAAAGTGC CCCAAGTCCCAAAGGGTCAAGCTCAGCAGCTCTCAATGGT CCTACCCCTGGAGCCCCCGATGACCCATTGGCCTCTTCG TGATGCGGCCACAGGATGGCGAGGTGACCGTGGGTGGCA GCATCACCTTCTCAGCCCGCGTGGCCGGCGCCAGCCTCCT GAAGCCGCCTGTGGTCAAGTGGTTCAAGGGCAAATGGGT GGACCTGAGCAGCAAGGTGGGCCAGCACCTGCAGCTGCA CGACAGCTACGACCGCGCCAGCAAGGTCTATCTGTTCGAG CTGCACATCACCGATGCCAGCCTGCCTTCACTGGCAGCT ACCGCTGTGAGGTGTCCACCAAGGACAAATTTGACTGCTC CAACTTCAATCTCACTGTCCACGAGGCCATGGGCACCGGA GACCTGGACCTCCTATCAGCCTTCCGCCGCACGAGCCTGG CTGGAGGTGGTCGGCGGATCAGTGATAGCCATGAGGACA CTGGGATTCTGGACTTCAGCTCACTGCTGAAAAAGAGAG ACAGTTTCCGGACCCCGAGGGACTCGAAGCTGGAGGCAC CAGCAGAGGAGGACGTGTGGGAGATCCTACGGCAGGCAC CCCATCTGAGTACGAGCGCATCGCCTTCCAGTACGGCGT CACTGACCTGCGCGGCATGCTAAAGAGGCTCAAGGGCAT GAGGCGCGATGAGAAGAAGAGCACAGCCTTTCAGAAGAA GCTGGAGCCGGCCTACCAGGTGAGCAAAGGCCACAAGAT CCGGCTGACCGTGGAACTGGCTGACCATGACGCTGAGGT CAAATGGCTCAAGAATGGCCAGGAGATCCAGATGAGCGG CAGCAAGTACATCTTTGAGTCCATCGGTGCCAAGCGTACC</p>	<p>88</p>

CTGACCATCAGCCAGTGCTCATTGGCGGACGACGCAGCCT
ACCAGTGCGTGGTGGGTGGCGAGAAGTGTAGCACGGAGC
TCTTTGTGAAAGAGCCCCCTGTGCTCATCACGCGCCCCTT
GGAGGACCAGCTGGTGTATGGTGGGGCAGCGGGTGGAGTT
TGAGTGTGAAGTATCGGAGGAGGGGGCGCAAGTCAAATG
GCTGAAGGACGGGGTGGAGCTGACCCGGGAGGAGACCTT
CAAATACCGGTTCAAGAAGGACGGGCAGAGACACCACCT
GATCATCAACGAGGCCATGCTGGAGGACGCGGGGCACTA
TGCACTGTGCACTAGCGGGGGCCAGGCGCTGGCTGAGCT
CATTGTGCAGGAAAAGAAGCTGGAGCCTCCCAAGATCCA
CCTGGACTGCCAGGCCGCATAACCAGACACCATTGTGGTT
GTAGCTGGAAATAAGCTACGTCTGGACGTCCCTATCTCTG
GGGACCCCGCTCCCACTGTGATCTGGCAGAAGGCTATCAC
GCAGGGGAATAAGGCCCCAGCCAGGCCAGCCCCAGATGC
CCCAGAGGACACAGGTGACAGCGATGAGTGGGTGTTTGA
CAAGAAGCTGCTGTGTGAGACCGAGGGCCGGGTCCGCGT
GGAGACCACCAAGGACCGCAGCATCTTCACGGTCGAGGG
GGCAGAGAAGGAAGATGAGGGCGTCTACACGGTCACAGT
GAAGAACCCTGTGGGCGAGGACCAGGTCAACCTCACAGT
CAAGGTCATCGACGTGCCAGACGCACCTGCGGCCCCCAA
GATCAGCAACGTGGGAGAGGACTCCTGCACAGTACAGTG
GGAGCCGCTGCCTACGATGGCGGGCAGCCATCCTGGG
CTACATCCTGGAGCGCAAGAAGAAGAAGAGCTACCGGTG
GATGCGGCTGAACTTCGACCTGATTCAGGAGCTGAGTCAT
GAAGCGCGGCGCATGATCGAGGGCGTGGTGTACGAGATG
CGGTCTACGCGGTCAACGCCATCGGCATGTCCAGGCCCA
GCCCTGCCTCCCAGCCCTTCATGCCTATCGGTCCCCCAG
CGAACCCACCCACCTGGCAGTAGAGGACGTCTCTGACAC
CACGGTCTCCCTCAAGTGGCGGGCCCCAGAGCGCGTGGG
AGCAGGAGGCCTGGATGGCTACAGCGTGGAGTACTGCCC
AGAGGGCTGCTCAGAGTGGGTGGCTGCCCTGCAGGGGCT
GACAGAGCACACATCGATACTGGTGAAGGACCTGCCAC
GGGGGCCCGGCTGCTTTTCCGAGTGCGGGCACACAATATG
GCAGGGCCTGGAGCCCCTGTTACCACCACGGAGCCGGTG
ACAGTGCAGGAGATCCTGCAACGGCCACGGCTTCAGCTG
CCCAGGCACCTGCGCCAGACCATTGAGAAGAAGGTCGGG
GAGCCTGTGAACCTTCTCATCCCTTTCCAGGGCAAGCCCC
GGCCTCAGGTGACCTGGACCAAAGAGGGGCAGCCCCTGG
CAGGCGAGGAGGTGAGCATCCGCAACAGCCCCACAGACA
CCATCCTGTTTCATCCGGGCCGCTCGCCGCGTGCATTCAGG
CACTTACCAGGTGACGGTGCGCATTGAGAACATGGAGGA
CAAGGCCACGCTGGTGTGCTGCAGGTTGTTGACAAGCCAAG
TCCTCCCCAGGATCTCCGGGTGACTGACGCCTGGGGTCTT
AATGTGGCTCTGGAGTGGAAGCCACCCAGGATGTCGGC
AACACGGAACCTCTGGGGGTACACAGTGCAGAAAGCCGAC
AAGAAGACCATGGAGTGGTTCACCGTCTTGGAGCATTACC
GCCGCACCCACTGCGTGGTGCCAGAGCTCATATTGGCAA
TGGTACTACTTCCGCGTCTTCAGCCAGAATATGGTTGGC

	<p>TTTAGTGACAGAGCGGCCACCACCAAGGAGCCCGTCTTTA TCCCAGACCAGGCATCACCTATGAGCCACCCAACCTATAA GGCCCTGGACTTCTCCGAGGCCCAAGCTTCACCCAGCCC CTGGTGAACCGCTCGGTCATCGCGGGCTACACTGCTATGC TCTGCTGTGCTGTCCGGGGTAGCCCCAAGCCCAAGATTC CTGGTTCAAGAATGGCCTGGACCTGGGAGAAGACGCCCG CTCCGCATGTTCAAGCAAGCAGGGAGTGTTGACTCTGGAG ATTAGAAAGCCCTGCCCTTTGACGGGGGCATCTATGTCT GCAGGGCCACCAACTTACAGGGCGAGGCACGGTGTGAGT GCCGCCTGGAGGTGCGAGTGCCTCAGTAA</p>	
MYBPC3- delC4b	<p>ATGCCTGAGCCGGGGAAGAAGCCAGTCTCAGCTTTTAGC AAGAAGCCACGGTCAGTGGAAGTGGCCGCAGGCAGCCCT GCCGTGTTTCGAGGCCGAGACAGAGCGGGCAGGAGTGAAG GTGCGCTGGCAGCGCGGAGGCAGTGACATCAGCGCCAGC ACAAGTACGGCCTGGCCACAGAGGGCACACGGCATAACG CTGACAGTGCGGGAAGTGGGCCCTGCCGACCAGGGATCT TACGCAGTCATTGCTGGCTCCTCCAAGGTCAAGTTCGACC TCAAGGTCATAGAGGCAGAGAAGGCAGAGCCCATGCTGG CCCCTGCCCTGCCCTGCTGAGGCCACTGGAGCCCCTGG AGAAGCCCCGGCCCCAGCCGCTGAGCTGGGAGAAAGTGC CCCAAGTCCCAAAGGGTCAAGCTCAGCAGCTCTCAATGGT CCTACCCCTGGAGCCCCCGATGACCCCATGGCCTCTTCG TGATGCGGCCACAGGATGGCGAGGTGACCGTGGGTGGCA GCATCACCTTCTCAGCCCGCGTGGCCGGCGCCAGCCTCCT GAAGCCGCCTGTGGTCAAGTGGTTCAAGGGCAAATGGGT GGACCTGAGCAGCAAGGTGGGCCAGCACCTGCAGCTGCA CGACAGCTACGACCGCGCCAGCAAGGTCTATCTGTTCGAG CTGCACATACCGATGCCAGCCTGCCTTCACTGGCAGCT ACCGCTGTGAGGTGTCCACCAAGGACAAATTTGACTGCTC CAACTTCAATCTCACTGTCCACGAGGCCATGGGCACCGGA GACCTGGACCTCCTATCAGCCTTCCGCCGCACGAGCCTGG CTGGAGGTGGTCGGCGGATCAGTGATAGCCATGAGGACA CTGGGATTCTGGACTTCAGCTCACTGCTGAAAAAGAGAG ACAGTTTCCGGACCCCGAGGGACTCGAAGCTGGAGGCAC CAGCAGAGGAGGACGTGTGGGAGATCCTACGGCAGGCAC CCCCATCTGAGTACGAGCGCATCGCCTTCCAGTACGGCGT CACTGACCTGCGCGGCATGCTAAAGAGGCTCAAGGGCAT GAGGCGCGATGAGAAGAAGAGCACAGCCTTTCAGAAGAA GCTGGAGCCGGCCTACCAGGTGAGCAAAGGCCACAAGAT CCGGCTGACCGTGGAAGTGGCTGACCATGACGCTGAGGT CAAATGGCTCAAGAATGGCCAGGAGATCCAGATGAGCGG CAGCAAGTACATCTTTGAGTCCATCGGTGCCAAGCGTACC CTGACCATCAGCCAGTGCTCATTGGCGGACGACGCAGCCT ACCAGTGCCTGGTGGGTGGCGAGAAGTGTAGCACGGAGC TCTTTGTGAAAGAGCCCCCTGTGCTCATCACGCGCCCCCT GGAGGACCAGCTGGTGATGGTGGGGCAGCGGGTGGAGTT TGAGTGTGAAGTATCGGAGGAGGGGGCGCAAGTCAAATG GCTGAAGGACGGGGTGGAGCTGACCCGGGAGGAGACCTT</p>	89

CAAATACCGGTTCAAGAAGGACGGGCAGAGACACCACCT
GATCATCAACGAGGCCATGCTGGAGGACGCGGGGCACTA
TGCACTGTGCACTAGCGGGGGCCAGGCGCTGGCTGAGCT
CATTGTGCAGGAAAAGAAGCTGGAGCCCAGGCAGGAACC
TCCCAAGATCCACCTGGACTGCCCAGGCCGCATAACCAGAC
ACCATTGTGGTTGTAGCTGGAAATAAGCTACGTCTGGACG
TCCCTATCTCTGGGGACCCCGCTCCCCTGTGATCTGGCA
GAAGGCTATCACGCAGGGGAATAAGGCCCCAGCCAGGCC
AGCCCCAGATGCCCCAGAGGACACAGGTGACAGCGATGA
GTGGGTGTTTGACAAGAAGCTGCTGTGTGAGACCGAGGG
CCGGGTCCGCGTGGAGACCACCAAGGACCGCAGCATCTT
CACGGTCGAGGGGGCAGAGAAGGAAGATGAGGGCGTCTA
CACGGTCACAGTGAAGAACCCTGTGGGGCAGGACCAGGT
CAACCTCACAGTCAAGGTCATCGACGTGCCAGACGCACCT
GCGGCCCCCAAGATCAGCAACGTGGGAGAGGACTCCTGC
ACAGTACAGTGGGAGCCGCCTGCCTACGATGGCGGGCAG
CCCATCCTGGGCTACATCCTGGAGCGCAAGAAGAAGAAG
AGCTACCGGTGGATGCGGCTGAACTTCGACCTGATTCAGG
AGCTGAGTCATGAAGCGCGGCGCATGATCGAGGGCGTGG
TGTACGAGATGCGCGTCTACGCGGTCAACGCCATCGGCAT
GTCCAGGCCCAGCCCTGCCTCCCAGCCCTTCATGCCTATC
GGTCCCCCAGCGAACCCACCCACCTGGCAGTAGAGGAC
GTCTCTGACACCACGGTCTCCCTCAAGTGGCGGCCCCCAAG
AGCGCGTGGGAGCAGGAGGCCTGGATGGCTACAGCGTGG
AGTACTGCCCAGAGGGCTGCTCAGAGTGGGTGGCTGCCCT
GCAGGGGCTGACAGAGCACACATCGATACTGGTGAAGGA
CCTGCCACGGGGGCCCCGGCTGCTTTTCCGAGTGCGGGCA
CACAATATGGCAGGGCCTGGAGCCCCTGTTACCACCACG
GAGCCGGTGACAGTGCAGGAGATCCTGCAACGGCCACGG
CTTCAGCTGCCCAGGCACCTGCGCCAGACCATTGAGAAGA
AGGTGCGGGGAGCCTGTGAACCTTCTCATCCCTTTCCAGGG
CAAGCCCCGGCCTCAGGTGACCTGGACCAAAGAGGGGCA
GCCCTGGCAGGCGAGGAGGTGAGCATCCGCAACAGCCC
CACAGACACCATCCTGTTTCATCCGGGCCGCTCGCCGCGTG
CATTGAGCACTTACCAGGTGACGGTGCGCATTGAGAAC
ATGGAGGACAAGGCCACGCTGGTGCTGCAGGTTGTTGAC
AAGCCAAGTCCTCCCAGGATCTCCGGGTGACTGACGCCT
GGGGTCTTAATGTGGCTCTGGAGTGGAAGCCACCCAGG
ATGTCGGCAACACGGAACCTCTGGGGGTACACAGTGCAGA
AAGCCGACAAGAAGACCATGGAGTGGTTCACCGTCTTGG
AGCATTACCGCCGCACCCACTGCGTGGTGCCAGAGCTCAT
CATTGGCAATGGCTACTACTTCCGCGTCTTCAGCCAGAAT
ATGGTTGGCTTTAGTGACAGAGCGGCCACCACCAAGGAG
CCCGTCTTTATCCCCAGACCAGGCATCACCTATGAGCCAC
CCAATAAAGGCCCTGGACTTCTCCGAGGCCCCCAAGCTT
CACCCAGCCCCTGGTGAACCGCTCGGTCATCGCGGGGCTAC
ACTGCTATGCTCTGCTGTGCTGTCCGGGGTAGCCCCAAGC
CCAAGATTTCCTGGTTCAAGAATGGCCTGGACCTGGGAGA

AGACGCCCGCTTCCGCATGTTTCAGCAAGCAGGGAGTGTTG ACTCTGGAGATTAGAAAGCCCTGCCCTTTGACGGGGGCA TCTATGTCTGCAGGGCCACCAACTTACAGGGCGAGGCAC GGTGTGAGTGCCGCCTGGAGGTGCGAGTGCCTCAGTAA

Таблица 4В. Иллюстративные последовательности белков МУВРС3

Название	Последовательности белков	SEQ ID NO
МУВРС3	MPEPGKKPVSAFSKKPRSVEVAAGSPA VFEAETERAGVKVR WQRGGSDISASNKYGLATEGTRHTLTVREVG PADQGSYAVI AGSSKVKFDLKVIEAEKAEPMLAPAPAPAEATGAPGEAPAP AAELGESAPSPKGSSSAALNGPTPGAPDDPIGLFVMRPQDGE VTVGG SITFSARVAGASLLKPPVVKWFKGKWVDLSSKVGQ HLQLHDSYDRASKVYLFELHITDAQPAFTGSYRCEVSTKDK FDCSNFNLTVHEAMGTGDLDLLSAFRRTSLAGGGRRISDSHE DTGILDFSSLLKKRDSFRTPRDSKLEAPAEEDVWEILRQAPPS EYERIAFQYGVTDLRGMLKRLKGMRRDEKKSTAFQKKLEP AYQVSKGHKIRLTVELADHDAEVKWLKNGQEIQMSGSKYIF ESIGAKRTLTI SQCSLADDAAYQCVVGGEKCS TELFVKEPPV LITRPLEDQLVMVGQRVEFECEVSEEGAQVKWLKDGVELTR EETF KYRFKKDGQRHHLIINEAMLEDAGHYALCTSGGQALA ELIVQEKKLEVYQSIADLMVGAKDQAVFKCEVSDENVRGV WLKNGKELVPDSRIK VSHIGRVHKL TIDDVTPADEADYSFVP EGFACNLSAKLHFMEVKIDFVPRQEPPKIHLDCPGRIPDTIVV VAGNKLRLDVPISGDPAPT VIWQKAITQG NKAPARPAPDAPE DTGDSDEWVFDKLLCETEGRV RVETTKDRSIFTVEGAEKE DEGVYTVTVKNPVGEDQVNLTVKVIDVPDAPAAPKISNVE DSCTVQWEPPAYDGGQPILGYILERKKKKS YRWMRLNFDLI QELSHEARRMIEGVVYEMRVYAVNAIGMSRSPASQPFMPI GPPSEPTHLAVEDVSDTTVSLKWRPPERVGAGGLDGYSVEY CPEGCSEWVAALQGLTEHTSIL VKDLPTGARLLFRVRAHNM AGPGAPVTTTEPVTVQEILQRPRLQLPRHLRQTIQKKVGEPV NLLIPFQGKPRPQVTWTKEGQPLAGEEVSIRNSPTDTILFIRA ARRVHSGTYQVTVRIENMEDKATLVLQVVDKPSPPQDLRVT DAWGLNVALEWKPPQDVGNT ELWG YTVQKADKKTMEWF TVLEHYRRTHCVPELIIGNGY YFRVFSQNMVGFSDRAATT KEPVFIPRPGITYEPPNYKALDFSEAPSFTQPLVNRSVIAGYT AMLCCA VRGSPKPKISWFKNGLDLGEDARFRMFSKQGVTLT EIRKPCPFDDGGIYVCRATNLQGEARCECRLEVRVPQ	103
МУВРС3- delC3	MPEPGKKPVSAFSKKPRSVEVAAGSPA VFEAETERAGVKVR WQRGGSDISASNKYGLATEGTRHTLTVREVG PADQGSYAVI AGSSKVKFDLKVIEAEKAEPMLAPAPAPAEATGAPGEAPAP AAELGESAPSPKGSSSAALNGPTPGAPDDPIGLFVMRPQDGE VTVGG SITFSARVAGASLLKPPVVKWFKGKWVDLSSKVGQ	104

	<p>HLQLHDSYDRASKVYLFELHITDAQPAFTGSYRCEVSTKDK FDCSNFNLTVEAMGTGDLDLLSAFRRTSLAGGGRRISDSHE DTGILDFSSLLKKRDSFRTPRDSKLEAPAEEDVWEILRQAPPS EYERIAFQYGVTDLRGMLKRLKGMRRDEKKSTAFQKKLEP AYQVSKGHKIRLTVELADHDAEVKWLKNGQEIQMSGSKYIF ESIGAKRTLTIQCSLADDAAYQCVVGGEKCSTELFVKEPPV YQSIADLMVGAKDQAVFKCEVSDENVRGVWLKNGKELVP DSRIKVSHIGRVHKLTIIDVTPADEADYSFVPEGFACNLSAK LHFMEVKIDFVPRQEPPKIHLDCPGRIPDTIVVVAGNKLRLD VPISGDPAPTVIWQKAITQGNKAPARPAPDAPEDTGDSDEW VFDKLLCETEGRVRVETTKDRSIFTVEGAEKEDEGVYTVT VKNPVGEDQVNLTVKVIDVPDAPAAPKISNVGEDSCTVQWE PPAYDGGQPILGYILERKKKKSYRWMRLNFDLIQELSHEARR MIEGVVYEMRVYAVNAIGMSRSPASQPFMPIGPPSEPTHLA VEDVSDTTVSLKWRPPERVGAGGLDGYSVEYCPEGCSEWV AALQGLTEHTSILVKDLPTGARLLFRVRAHNMAGPGAPVTT TEPVTVQEILQRPRLQLPRHLRQTIQKKVGEPVNLLIPFQGKPRPQVT WTKEGQPLAGEEVSIRNSPTDTILFIRAARRVHSGTYQVT VRIENMEDKATLVLQVVDKPSPPQDLRVTDWGLNVALEW KPPQDVGNTLWGYTVQKADKKTMEWFTVLEHYRRT HCVVPELIIGNGYFRVFSQNMVGFSDRAATTKEPVFI PRPGITYEPPNYKALDFSEAPSFTQPLVNRSVIAGYTAM LCCA VRGSPKPKISWFKNGLDLGEDARFRMFSKQGV LTLEIRKPCPFDDGGIYVC RATNLQGEARCECRLEVRVPQ</p>	
MYBPC3-delC4	<p>MPEPGKKPVS AFSKKPRSVEVAAGSPA VFEAETERAGVKVR WQRGGSDISASNKYGLATEGTRHTLTVRE VGPADQGSYAVI AGSSKVFDLKVIEAEKAEPMLAPAPAPAEATGAPGEAPAP AAELGESAPSPKGSSSAALNGPTPGAPDDPIGLFVMRPQDGE VTVGGSITFSARVAGASLLKPPVVKWFKGKWVDLSSKVGQ HLQLHDSYDRASKVYLFELHITDAQPAFTGSYRCEVSTKDK FDCSNFNLTVEAMGTGDLDLLSAFRRTSLAGGGRRISDSHE DTGILDFSSLLKKRDSFRTPRDSKLEAPAEEDVWEILRQAPPS EYERIAFQYGVTDLRGMLKRLKGMRRDEKKSTAFQKKLEP AYQVSKGHKIRLTVELADHDAEVKWLKNGQEIQMSGSKYIF ESIGAKRTLTIQCSLADDAAYQCVVGGEKCSTELFVKEPPV LITRPLEDQLVMVGQRVEFECEVSEEGAQVKWLKDGVELTR EETFKYRFKKDQQRHHLIINEAMLEDAGHYALCTSGGQALA ELIVQEKKLEPPKIHLDCPGRIPDTIVVVAGNKLRLDVPISGD PAPTVIWQKAITQGNKAPARPAPDAPEDTGDSDEWVFDKLL LCETEGRVRVETTKDRSIFTVEGAEKEDEGVYTVT VKNPVG EDQVNLTVKVIDVPDAPAAPKISNVGEDSCTVQWEPPAYDG GQPILGYILERKKKKSYRWMRLNFDLIQELSHEARRMIEGVV YEMRVYAVNAIGMSRSPASQPFMPIGPPSEPTHLA VEDVSD TTVSLKWRPPERVGAGGLDGYSVEYCPEGCSEWVAALQGL TEHTSILVKDLPTGARLLFRVRAHNMAGPGAPVTTTEPVTV QEILQRPRLQLPRHLRQTIQKKVGEPVNLLIPFQGKPRPQVT WTKEGQPLAGEEVSIRNSPTDTILFIRAARRVHSGTYQVT VRIENMEDKATLVLQVVDKPSPPQDLRVTDWGLNVALEW KPP</p>	105

	QDVGNTTELWGYTVQKADKKTMEWFTVLEHYRRTHCVVPE LIIGNGYFRVFSQNMVGFSDRAATTKEPVFIPRPGITYEPPN YKALDFSEAPSFTQPLVNRSVIAGYTAMLCCA VRGSPKPKIS WFKNGLDLGEDARFRMFSKQGVLTLEIRKPCPFDGGIYVCR ATNLQGEARCECRLEVRVPQ	
MYBPC3- delC4b	MPEPGKKPVSAFSKKPRSVEVAAGSPA VFEAETERAGVKVR WQRGGSDISASNKYGLATEGTRHTLTVREVGPADQGSYAVI AGSSKVKFDLKVIEAEKAEPMLAPAPAPAEATGAPGEAPAP AAELGESAPSPKGSSSAALNGPTPGAPDDPIGLFVMRPQDGE VTVGG SITFSARVAGASLLKPPVVKWFKGKWVDLSSKVGQ HLQLHDSYDRASKVYLFELHITDAQPAFTGSYRCEVSTKDK FDCSNFNLTVHEAMGTGDLDLLSAFRRTSLAGGRRISDSHE DTGILDFSSLLKKRDSFRTPRDSKLEAPAEEDVWEILRQAPPS EYERIAFQYGVTDLRGMLKRLKGMRRDEKKSTAFQKKLEP AYQVSKGHKIRLTVELADHDAEVKWLKNGQEIQMSGSKYIF ESIGAKRTL TISQCSLADDAAYQC VVGGEKCSTELFVKEPPV LITRPLEDQLVMVGQRVEFECEVSEEGAQVKWLKDGVELTR EETF KYRFKKDGQRHHLIINEAMLEDAGHYALCTSGGQALA ELIVQEKKLEPRQEPPKIHLDCPGRIPDTIVVAGNKLRLDVP ISGDPAPT VIWQKAITQGNKAPARPAPDAPEDTGDSDEWVF DKLLCETEGRVRVETTKDRSIFTVEGAEKEDEGVYTVTVK NPVGEDQVNLTVKVIDVPDAPAAPKISNVGEDSCTVQWEP AYDGGQPILGYILERKKKSYRWMRLNFDLIQELSHEARRM IEGVVYEMRVYAVNAIGMSRSPASQPFMPIGPPSEPTHLAV EDVSDTTVSLKWRPPERVGAGGLDGYSVEYCPEGCSEWVA ALQGLTEHTSILVKDLPTGARLLFRVRAHNMAGPGAPVTTT EPVTVQEILQRPRQLPRHLRQTIQKKVGEPVNLLIPFQGKPR PQVTWTKEGQPLAGEEVSIRNSPTDILFIRAARRVHSGTYQ VTVRIENMEDKATLVLQVVDKPSPPQDLRVTDAWGLNVAL EWKPPQDVGNTTELWGYTVQKADKKTMEWFTVLEHYRRTH CVVPELIIGNGYFRVFSQNMVGFSDRAATTKEPVFIPRPGIT YEPPNYKALDFSEAPSFTQPLVNRSVIAGYTAMLCCA VRGSP KPKISWFKNGLDLGEDARFRMFSKQGVLTLEIRKPCPFDGGI YVCRATNLQGEARCECRLEVRVPQ	106

[138] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок представитель 2 подсемейства H калиевых потенциалзависимых каналов (KCNH2), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (например, модифицированным промотором гена сердечного TNNT2), представляет собой *KCNH2* или его мутантную форму,

вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 107). У людей ген *KCNH2* кодирует белок KCNH2 (также известный как hERG1, *например*, SEQ ID NO: 108), который образует калиевый канал с другими белками KCNH2 для транспортировки калия из клеток. В сердечной мышце обильно экспрессируются белки KCNH2, функция которых заключается в перезарядке сердечной ткани после каждого сердечного сокращения для поддержания регулярного ритма. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий KCNH2, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления белок KCNH2 обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 108.

[139] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок представитель 4 подсемейства М катионных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPM4), функционально связанный с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором гена сердечного TNNT2), представляет собой *TRPM4* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 109). У людей ген *TRPM4* кодирует белок TRPM4 (*например*, SEQ ID NO: 110), который функционирует в качестве канала для контроля потока катионов в клетки и из них. Канал TRPM4 обильно экспрессируется в клетках сердца и играет ключевую роль в образовании и передаче электрических сигналов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TRPM4, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах осуществления белок TRPM4 обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 110.

[140] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок десмоглеин 2 (DSG2), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность,

функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором гена сердечного TNNT2), представляет собой *DSG2* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 111). У людей ген *DSG2* кодирует белок (*например*, SEQ ID NO: 112), который представляет собой трансмембранный гликопротеин и компонент десмосом. Десмосомы представляют собой межклеточные контакты, которые обеспечивают прочную адгезию между клетками, придавая тканям механическую прочность. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий *DSG2*, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления белок *DSG2* обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 112.

[141] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок кальций-транспортирующую АТФазу 2 саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума (*ATP2A2*), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *ATP2A2* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 113). У людей ген *ATP2A2* кодирует белок кальциевую АТФазу 2 сарко(эндо)плазматического ретикулума (*SERCA2*) (*например*, SEQ ID NO: 114), который катализирует гидролиз АТФ, сопряженный с транслокацией кальция из цитозоля в просвет саркоплазматического ретикулума. Регуляция поступления ионов кальция в саркоплазматический ретикулум и из него способствует сокращению и расслаблению мышц. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий *ATP2A2*, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления белок *ATP2A2* обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 114.

[142] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность,

кодирующую белок субъединицу альфа-1С кальциевого потенциалзависимого канала (*CACNA1C*), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного *TNNT2*. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором *TNNT2*), представляет собой *CACNA1C* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 115). У людей ген *CACNA1C* кодирует альфа-1-субъединицу белка потенциалзависимого кальциевого канала (*например*, SEQ ID NO: 116), функция которого заключается в опосредовании притока ионов кальция в клетку при поляризации мембраны. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий *CACNA1C*, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления белок *CACNA1C* обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 116.

[143] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок дистрофин (*DMD*), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного *TNNT2*. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором *TNNT2*), представляет собой *DMD* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 117). У людей ген *DMD* кодирует белок *DMD* (*например*, SEQ ID NO: 118), который образует компонент комплекса дистрофин/гликопротеин (*DGC*). *DGC* выступает в качестве якоря, соединяя цитоскелет с внеклеточным матриксом, тем самым укрепляя мышечные волокна и защищая их от повреждений при сокращении и расслаблении мышц. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий *DMD*, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления белок *DMD* обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 118.

[144] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность,

кодирующую белок протеинкиназу DM1 (DMPK), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *DMPK* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 119). У людей ген *DMPK* кодирует белок протеинкиназу миотонической дистрофии (*например*, SEQ ID NO: 120), который играет важную роль в развитии и гомеостазе тканей головного мозга, мышц и сердца. Протеинкиназа миотонической дистрофии ингибирует миозинфосфатазу, которая играет роль в напряжении и расслаблении мышц. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий *DMPK*, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления белок *DMPK* обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 120.

[145] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок гомолог белка 5 эктопических Р-гранул (*EPG5*), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *EPG5* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 121). У людей ген *EPG5* кодирует белок *EPG5* (*например*, SEQ ID NO: 122), который функционирует при аутофагии, способствуя взаимодействию между аутофагосомами и лизосомами. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий *EPG5*, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления белок *EPG5* обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 122.

[146] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок субъединицу 1 цилиарного комплекса *Evc* (*EVC*),

функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *EVC* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 123). У людей ген *EVC* кодирует белок *EVC* (*например*, SEQ ID NO: 124), который находится главным образом в ресничках и функционирует для передачи информации между клетками. Белок *EVC* также регулирует *Sonic Hedgehog*, который играет роль в росте и дифференцировке клеток. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий *EVC*, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 123. В некоторых вариантах осуществления белок *EVC* обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 124.

[147] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок лимбин, функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *EVC2* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 125). У людей ген *EVC2* кодирует белок лимбин (*например*, SEQ ID NO: 126). Хотя функция лимбина неизвестна, он важен для нормального роста и развития, особенно для развития костей и зубов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий лимбин, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 125. В некоторых вариантах осуществления белок лимбин обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 126.

[148] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок фибриллин-1, функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с

кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *FBN1* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 127). У людей ген *FBN1* кодирует белки фибриллин-1 и аспрозин (*например*, SEQ ID NO: 128). Фибриллин-1 представляет собой гликопротеин, который служит в качестве структурного компонента кальций-связывающих микрофибрилл, обеспечивающих силовую поддержку эластичной и неэластичной соединительной ткани во всем организме. Аспрозин представляет собой гормон, обычно секретируемый белой жировой тканью для регуляции гомеостаза глюкозы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий фибриллин-1, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления белок фибриллин-1 обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 128.

[149] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок нейрофибромин (NF1), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *NF1* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 129). У людей ген *NF1* кодирует белок NF1 (*например*, SEQ ID NO: 130), который функционирует в качестве супрессора опухолей и отрицательного регулятора сигнального пути Ras, стимулирующего рост и деление клеток. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий NF1, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления белок NF1 обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 130.

[150] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок альфа-субъединицу белка натриевых каналов 5 типа (SCN5A), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного

TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *SCN5A* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 131). У людей ген *SCN5A* кодирует белок *SCN5A* (*например*, SEQ ID NO: 132), который представляет собой субъединицу устойчивых к тетродотоксину потенциалзависимых натриевых каналов. *SCN5A* находится главным образом в сердечной мышце и отвечает за начальный подъем потенциала действия на электрокардиограмме. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий *SCN5A*, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 131. В некоторых вариантах осуществления белок *SCN5A* обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 132.

[151] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок гомолог 1 Son of Sevenless (*SOS1*), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *SOS1* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 133). У людей ген *SOS1* кодирует белок *SOS1* (*например*, SEQ ID NO: 134), который функционирует в качестве компонента тримерного комплекса, участвующего в передаче сигналов от Ras к Rac путем стимуляции активности Rac-специфичного фактора обмена гуаниновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий *SOS1*, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах осуществления белок *SOS1* обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 134.

[152] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок рецептор 1 натрийуретического пептида (*NPR1*),

функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *NPR1* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 135). У людей ген *NPR1* кодирует белок NPR1 (также называемый GC-A) (*например*, SEQ ID NO: 136), который представляет собой трансмембранный каталитический рецептор с внутриклеточной гуанилатциклазной активностью. NPR1 служит в качестве рецептора как предсердных, так и мозговых натрийуретических пептидов, которые являются вазоактивными гормонами и играют ключевую роль в сердечно-сосудистом гомеостазе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий NPR1, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления белок NPR1 обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 136.

[153] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок рецепторную тирозиновую протеинкиназу erbB-4 (ERBB4), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой *ERBB4* или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 137). У людей ген *ERBB4* кодирует человеческий белок ERBB4 (*например*, SEQ ID NO: 138), который представляет собой трансмембранный рецептор в семействе эпидермальных факторов роста. Передача сигнала через рецептор ERBB4 индуцирует множество клеточных ответов, в том числе митогенез и дифференцировку. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий ERBB4, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления белок ERBB4 обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 138.

[154] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую вазоактивный интестинальный пептид (VIP), функционально связанную с модифицированным промотором TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой VIP или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 139). У людей ген VIP кодирует вазоактивный интестинальный пептид (*например*, SEQ ID NO: 140), который функционирует в качестве нейромодулятора и нейромедиатора. VIP является сильным сосудорасширяющим средством, регулирует активность гладкой мускулатуры, секрецию эпителиальных клеток и кровотока в желудочно-кишечном тракте. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий VIP, обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 139. В некоторых вариантах осуществления белок VIP обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 140.

[155] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь бета-миозина (MyHC- β), функционально связанную с модифицированным промотором гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, функционально связанная с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2), представляет собой MYH7 или его мутантную форму, вариант или фрагмент (*например*, SEQ ID NO: 141). У людей ген MYH7 кодирует белок MyHC- β (*например*, SEQ ID NO: 142), который представляет собой гексамерный асимметричный моторный белок, образующий большинство толстых филаментов сердечной мышцы. Ферментативная активность АТФазы в миозиновой головке приводит к гидролизу АТФ, что выступает источником энергии для процесса укорочения саркомеров с целью образования внутрижелудочкового давления и силы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий MyHC- β , обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления белок

MyHC- β обладает по меньшей мере 90%, 95%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 142.

III. Векторы

[156] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены векторы для лечения или предупреждения заболевания сердца. В частности, векторы, описанные в данном документе, содержат кардиоспецифический промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим терапевтический белок, где экспрессия терапевтического белка обеспечивает лечение субъекта, нуждающегося в этом (*например*, субъекта с кардиомиопатией). Например, в некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор на основе AAV, содержащий промотор гена сердечного TNNT2, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим белок MYBPC3, для лечения или предупреждения кардиомиопатии.

[157] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит в дополнение к кардиоспецифическим промоторам (*например*, модифицированному промотору гена сердечного тропонина T) и терапевтическим продуктам генов (*например*, белку MYBPC3), описанным в данном документе, маркерный ген, который облегчает идентификацию или отбор клеток, которые были трансфицированы, трансдуцированы или инфицированы. Примеры маркерных генов включают без ограничения гены, кодирующие флуоресцентные белки, *например*, усиленный зеленый флуоресцентный белок, Ds-Red (DsRed: красный флуоресцентный белок (RFP) *Discosoma* sp.; Bevis et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20(11):83-87), желтый флуоресцентный белок, mCherry и голубой флуоресцентный белок; а также гены, кодирующие белки, которые придают устойчивость к средству отбора, *например*, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к пурамицину, ген устойчивости к бластицидину и т. п.

[158] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую размер не более чем приблизительно 4,0 тысячи пар оснований, не более чем приблизительно 4,5 тысячи пар оснований, не более чем приблизительно 5 тысяч пар оснований, не более чем приблизительно 5,1 тысячи пар оснований, не более чем приблизительно 5,2 тысячи

пар оснований, не более чем приблизительно 5,3 тысячи пар оснований, не более чем приблизительно 5,4 тысячи пар оснований или не более чем приблизительно 5,5 тысячи пар оснований. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую размер не более чем приблизительно 4,5 тысячи пар оснований. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую размер не более чем приблизительно 5 тысяч пар оснований. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую размер не более чем приблизительно 5,5 тысячи пар оснований. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую размер не более чем приблизительно 6 тысяч пар оснований.

[159] Способы введения полинуклеотидов в клетку-хозяина известны из уровня области, и любой известный способ можно применять для введения полинуклеотидов, описанных в данном документе, в клетку. Подходящие способы включают, *например*, инфицирование вирусом или бактериофагом, трансфекцию, конъюгацию, слияние протопластов, липофекцию, электропорацию, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную полиэтиленимином (PEI), трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, трансфекцию, опосредованную липосомами, технологию генной пушки, осаждение фосфатом кальция, прямую микроинъекцию, доставку нуклеиновых кислот, опосредованную наночастицами, способы микрофлюидной доставки и т. п.

A. Невирусные векторы

[160] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описанные в данном документе, доставляются в клетку в невирусном векторе, таком как транспозон, наночастица (*например*, липидная наночастица), липосома, экзосома, аттенуированная бактерия или вирусоподобная частица. В некоторых вариантах осуществления невирусный вектор представляет собой частицу, подобную вирусу млекопитающих. Например, можно получить частицу, подобную вирусу млекопитающих (*например*, путем очистки «пустой» частицы, подобной вирусу млекопитающих, с последующей сборкой частицы, подобной вирусу млекопитающих, *ex vivo* с желаемым грузом). Невирусный вектор также может быть

сконструирован таким образом, чтобы он содержал в своем составе нацеливающиеся лиганды для изменения специфичности к ткани-мишени.

В. Вирусные векторы

[161] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор, *например*, лентивирусный вектор. Используемый в данном документе термин «ретровирус» или «ретровирусный» относится к РНК-вирусу, который осуществляет обратную транскрипцию своей геномной РНК в линейную двухнитевую копию ДНК и затем ковалентно интегрирует свою геномную ДНК в геном хозяина. Ретровирусные векторы являются обычным инструментом для доставки генов (Miller, *Nature*. 357: 455-460 (2000)). После интеграции вируса в геном хозяина его называют «провирусом». Провирус служит матрицей для РНК-полимеразы II и управляет экспрессией молекул РНК, кодируемых вирусом. В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор изменен таким образом, что он не интегрируется в геном клетки-хозяина.

[162] Иллюстративные ретровирусы (семейство Retroviridae) включают без ограничения: (1) вирусы из рода Gammaretrovirus, такие как вирус лейкоза мышей Молони (M-MuLV), вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV) и вирус лейкоза кошачьих (FLV), (2) вирусы из рода Spumavirus, такие как вирус пеннестости обезьян, (3) вирусы из рода Lentivirus, такие как вирус иммунодефицита человека 1 и вирус иммунодефицита обезьян.

[163] Используемый в данном документе термин «лентивирусный» или «лентивирус» относится к группе (или роду) сложных ретровирусов. Иллюстративные лентивирусы включают без ограничения ВИЧ (вирус иммунодефицита человека, в том числе ВИЧ 1 типа и ВИЧ 2 типа; вирус висна-маэди (VMV); вирус артрита-энцефалита коз (CAEV); вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV).

[164] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор. Генетическая организация аденовируса включает линейный двухнитевой ДНК-вирус размером примерно 36 т. о., что позволяет заменять большие фрагменты аденовирусной ДНК чужеродными последовательностями размером вплоть до 7 т. о. (Grunhaus et al., *Seminar in Virology* 200(2):535-546, 1992)).

[165] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AVV), такой как вектор на основе AAV, выбранный из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 или химерного AAV, полученного из них.

[166] В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии на основе AAV псевдотипирован для улучшения нацеливания. Стратегия псевдотипирования может способствовать переносу генов и поддержке экспрессии в типе клеток, являющихся клетками-мишенями. Например, геном AAV2 может быть упакован в капсид другого серотипа AAV, такого как AAV5, AAV7 или AAV8, с образованием псевдотипированных векторов, таких как AAV2/5, AAV2/7 и AAV2/8 соответственно, как описано в Balaji et al. *J Surg Res. Sep*; 184(1): 691–698 (2013). В некоторых вариантах осуществления AAV9 можно применять для направления экспрессии в миофибробластоподобных линиях дифференцировки, как описано в Piras et al. *Gene Therapy* 23:469–478 (2016). В некоторых вариантах осуществления применяют AAV1, AAV6 или AAV9, а в некоторых вариантах осуществления AAV сконструирован, как описано в Asokari et al. *Hum Gene Ther. Nov*; 24(11): 906–913 (2013); Pozsgai et al. *Mol Ther. Apr* 5; 25(4): 855-869 (2017); Kotterman, M.A. and D.V. Schaffer Engineering Adeno-Associated Viruses for Clinical Gene Therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15:445-451 (2014); а также US20160340393A1 Schaffer и соавт. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой AAV, сконструированный для увеличения инфекционности в отношении клеток-мишеней, как описано в US 20180066285A1.

C. Регуляторные элементы

[167] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий один или более регуляторных элементов,

функционально связанных с полинуклеотидом, кодирующим терапевтические белок или нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент представляет собой кардиоспецифический промотор (*например*, модифицированный промотор TNNT2), функционально связанный с терапевтическим белком или нуклеиновой кислотой для лечения заболевания сердца.

[168] Используемый в данном документе термин «регуляторный элемент» относится к нетранслируемым областям вектора (*например*, к точке начала репликации, кассетам селекции, промоторам, энхансерам, сигналам инициации трансляции (последовательности Шайна-Дальгарно или последовательности Козак), интронам, последовательности полиаденилирования, 5'- и 3'-нетранслируемым областям), которые взаимодействуют с белками клетки-хозяина для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут различаться по их силе и специфичности. Элемент, регулирующий транскрипцию, может быть функциональным в эукариотической клетке (*например*, в клетке млекопитающего) либо в прокариотической клетке (*например*, в клетке бактерии или археи). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность, кодирующая терапевтические продукты генов (*например*, терапевтические белок или нуклеиновую кислоту), описанные в данном документе, функционально связана с несколькими контролирующими элементами, которые обеспечивают экспрессию полинуклеотида как в прокариотических, так и в эукариотических клетках.

[169] Используемый в данном документе термин «сайт начала транскрипции» или «TSS» относится к первой паре оснований, транскрибируемой под действием РНК-полимеразы при инициации транскрипции РНК-полимеразой. TSS отличается от стартового кодона (канонически ATG), который должен располагаться ниже TSS в транскрибируемой области полинуклеотида. Местоположение сайта начала транскрипции может быть определено экспериментально или путем предсказания с применением любого из различных алгоритмов предсказания. Аннотированные TSS доступны в Eukaryotic Promoter Database и в геномном браузере UCSC. Множество TSS для TNNT2 идентифицированы в геномном браузере UCSC.

[170] Как используется в данном документе, TSS для TNNT2 определяется как последовательность, идентифицируемая по букве С на 5'-конце мотива, идентифицированного в dbTSS: CTCCATC.

[171] Термин «модифицированный промотор гена сердечного TNNT2», используемый в данном документе, относится к промотору, который содержит полинуклеотидную последовательность из по меньшей мере 200 пар оснований, которая содержит один или более непрерывных или прерывистых полинуклеотидных сегментов, каждый из которых обладает 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с соответствующим сегментом TNNT2p-600, представленным в таблице 1 под SEQ ID NO: 1. Поскольку он является «промотором», модифицированный промотор гена сердечного TNNT2 должен быть способен стимулировать инициацию транскрипции под действием РНК-полимеразы в клетке-хозяине или клетке-мишени в TSS или вблизи него в промоторе (*т. е.* в TTS или вблизи него в TNNT2, как определено в данном документе) или, если эндогенный TSS TNNT2 отсутствует в модифицированном промоторе гена сердечного TNNT2, то в гетерологичном TSS на не более чем 100 пар оснований ниже (с 3'-стороны в смысловой цепи) в направлении нижерасположенного (3') конца модифицированного промотора гена сердечного TNNT2. Аналогичным образом, модифицированный промотор гена сердечного TNNT2 может содержать только последовательности, расположенные выше TSS в TNNT2, или еще может содержать TSS из TNNT2.

[172] Длина промотора (*например*, модифицированного промотора гена сердечного TNNT2), промотора, «имеющего» столько пар оснований, как используется в данном документе, определяется в соответствии с количеством пар оснований в полинуклеотидной последовательности промотора от его 5'-конца до его 3'-конца, включая конечные точки и включая любые промежуточные последовательности, которые не выравниваются с последовательностью эталонного промотора (*например*, эндогенного промотора гена сердечного TNNT2 из человека или другого организма). 5'-конец и 3'-конец промотора определяются как последняя пара оснований в любом направлении, совпадающая с соответствующей последовательностью в последовательности эталонного промотора при выравнивании последовательностей с помощью алгоритма BLAST или его

эквивалента. Таким образом, длина промотора в векторе может быть определена путем поиска в базе данных нуклеотидов, содержащей геном эталонного организма, с использованием полинуклеотидной последовательности вектора и идентификации одной или более выровненных областей, которые охватывают приблизительно 1-5 т. о. эндогенного гена или находятся в их пределах, или путем выравнивания вектора с предварительно определенным эталонным промотором. Если промотор выравнивается с эталонным геномом или последовательностью эталонного промотора в виде непрерывного сегмента, то длина промотора представляет собой регистрируемую длину выравнивания (3'-концевое положение минус 5'-концевое положение + 1, если не включен TSS). Если промотор выравнивается по нескольким сегментам (*например*, 2, 3, 4 или 5 сегментам), то длину промотора можно рассчитать как 3'-концевое положение наиболее близкого к 3'-концу сегмента эталонного генома или последовательности эталонного промотора минус 5'-концевое положение наиболее близкого к 5'-концу сегмента эталонного генома или последовательности эталонного промотора плюс 1, если TSS не включен (таким образом, расчетная длина включает обе конечные точки). Например, длина промотора, который простирается от пары оснований за 100 п. о. до TSS (-100 п. о.) до 5 п. о. до TSS (-5 п. о.), составляет $-5 - (-100) + 1 = 100 - 5 + 1 = 96$ п. о. TSS пронумерован как +1 п. о. Таким образом, длина промотора, который простирается от пары оснований за 100 п. о. до TSS (-100 п. о.) до 5 п. о. после TSS (+5 п. о.), составляет $+5 - (-100) = 100 + 5 = 105$ п. о.

[173] Термин «энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать усиленную транскрипцию, и в некоторых случаях может функционировать независимо от их ориентации относительно другой контролирующей последовательности. Энхансер может функционировать кооперативно или аддитивно с промоторами и/или другими энхансерными элементами. Энхансер может перекрываться с промотором или располагаться выше или ниже промотора. В некоторых вариантах осуществления модифицированный промотор гена сердечного TNNT2 содержит один или более энхансеров. В некоторых вариантах осуществления модифицированный промотор гена сердечного TNNT2 не содержит энхансер.

[174] В дополнение к модифицированному промотору гена сердечного TNNT2 или вместо него в некоторых вариантах осуществления используются другие промоторы для эукариот, в том числе без ограничения немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV), промотор вируса обезьян 40 (SV40) (*например*, ранний и поздний промоторы SV40), промотор вируса некроза селезенки (SFFV), длинные концевые повторы (LTR) из ретровируса (*например*, промотор LTR вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV) или LTR вируса саркомы Рауса (RSV)), промотор вируса простого герпеса (HSV) (гена тимидинкиназы), промоторы H5, P7.5 и P11 вируса осповакцины, промотор гена фактора элонгации 1-альфа (EF1 α), промотор гена белка 1 раннего ростового ответа (EGR1), промотор гена H-ферритина (FerH), промотор гена L-ферритина (FerL), промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), промотор гена эукариотического фактора инициации трансляции 4A1 (EIF4A1), промотор гена белка теплового шока 5 размером 70 кДа (HSPA5), промотор гена представителя 1 белков теплового шока бета размером 90 кДа (HSP90B1), промотор гена белка теплового шока размером 70 кДа (HSP70), промотор гена β -кинезина (β -KIN), локус ROSA26 человека (Irions et al., *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477-1482 (2007)), промотор гена убиквитина С (UBC), промотор гена фосфоглицераткиназы-1 (PGK), энхансер цитомегаловируса/промотор гена β -актина курицы (CAG), промотор гена β -актина и энхансер вируса миелопролиферативной саркомы с удаленной областью отрицательного контроля и замененным сайтом связывания праймера dl587rev (MND), а также промотор гена металлотioneина-I мыши. Вектор может также содержать сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и терминатор транскрипции. Вектор может также содержать полинуклеотидные последовательности для усиления экспрессии. Вектор также может содержать полинуклеотидные последовательности, кодирующие белковые метки (*например*, 6xHis-метку, гемагглютининовую метку, зеленый флуоресцентный белок и т. д.), которые слиты с сайт-направленным модифицирующим полипептидом, что таким образом приводит к образованию химерного полипептида.

[175] В некоторых вариантах осуществления промоторы по настоящему изобретению являются тканеспецифическими. Термин «тканеспецифический

промотор» означает полинуклеотидную последовательность, которая служит в качестве промотора, *т. е.*, регулирует экспрессию выбранной полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с промотором, и которая влияет на экспрессию выбранной полинуклеотидной последовательности в конкретных клетках ткани, таких как миоциты или клетки миокарда. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор представляет собой кардиоспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления кардиоспецифический промотор представляет собой промотор TNNT2 или модифицированный промотор TNNT2. Тканеспецифический промотор вызывает экспрессию функционально связанного полинуклеотида или продукта гена, кодируемого этим полинуклеотидом, в ткани, представляющей интерес, на 5х, 10х, 20х, 25х или более высоких уровнях, чем в эталонной ткани.

[176] В некоторых вариантах осуществления векторы, описанные в данном документе, содержат сигнал терминации транскрипции. Элементы, управляющие эффективной терминацией и полиаденилированием гетерологичных транскриптов нуклеиновых кислот, обеспечивают увеличение экспрессии гетерологичных генов. Сигналы терминации транскрипции обычно находятся ниже сигнала полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления векторы содержат последовательность полиаденилирования с 3'-стороны от полинуклеотида, кодирующего полипептид, который должен экспрессироваться. Термин «поли(А)-сайт» или «поли(А)-последовательность», используемый в данном документе, обозначает последовательность ДНК, которая управляет как терминацией, так и полиаденилированием формирующегося РНК-транскрипта с помощью РНК-полимеразы II. Последовательности полиаденилирования могут способствовать стабильности мРНК посредством добавления поли(А)-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности и, таким образом, содействовать увеличению эффективности трансляции. Расщеплением и полиаденилированием управляет поли(А)-последовательность в РНК. Сердцевинная поли(А)-последовательность пре-мРНК млекопитающих имеет два элемента распознавания, фланкирующие сайт расщепления/полиаденилирования. Обычно практически инвариантный гексамер AAUAAA располагается на 20-50 нуклеотидов выше более варибельного элемента, богатого остатками U или GU. Расщепление формирующегося транскрипта

происходит между этими двумя элементами и сопряжено с присоединением вплоть до 250 аденозиновых остатков к 5'-продукту расщепления. В конкретных вариантах осуществления сердцевинная поли(А)-последовательность представляет собой оптимальную поли(А)-последовательность (например, ААТAAA, АТТAAA, АGТAAA). В конкретных вариантах осуществления поли(А)-последовательность представляет собой поли(А)-последовательность SV40, поли(А)-последовательность бычьего гормона роста (BGHrA), поли(А)-последовательность β-глобина кролика (rβgrA), их варианты или другую подходящую гетерологичную или эндогенную поли(А)-последовательность, известную из уровня техники.

IV. Вирусный геном рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), кассета экспрессии и вирионы rAAV

[177] В настоящем изобретении предусмотрена кассета экспрессии, содержащая полинуклеотид, кодирующий трансген, например, последовательность, кодирующая полипептид MYBPC3 или его функциональный вариант. Трансгенная полинуклеотидная последовательность в кассете экспрессии может представлять собой, например, открытую рамку считывания, кодирующую белок. Кассета экспрессии может содержать необязательно промотор, функционально связанный с трансгеном, необязательно интронную область, необязательно сигнал полиаденилирования (поли(А)), необязательно посттранскрипционный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) и необязательно сигнал терминации транскрипции. Кассета экспрессии может быть фланкирована одним или более инвертированными концевыми повторами (ITR). Кассета экспрессии, фланкированная одним или более ITR, в данном документе называется «вирусным геномом». ITR в кассете экспрессии служат в качестве маркеров, используемыми для вирусной упаковки кассеты экспрессии (Clark et al. *Hum Gene Ther.* 6:1329-41 (1995)). Иллюстративные и неограничивающие варианты осуществления вирусных геномов по настоящему изобретению показаны на **фиг. 1А**, **фиг. 1С** и **фиг. 2А**. Полинуклеотид, кодирующий кассету экспрессии, обеспечивает функцию экспрессии трансгена в клетке-хозяине. Кассета экспрессии может быть интегрирована в геном клетки-хозяина, например, путем инфицирования клетки-хозяина вирионом rAAV, содержащим капсидный белок, и вирусным геномом, содержащим кассету экспрессии.

[178] Промоторная последовательность кассеты экспрессии в случае ее присутствия контролирует экспрессию полинуклеотида, кодирующего трансген, например, последовательности, кодирующей MYBPC3 или его функциональный вариант. Можно использовать различные промоторы. Промотор может быть специфичным для определенного типа клеток. Конститутивные промоторы используются в кассетах экспрессии и могут представлять собой, например, энхансер цитомегаловируса, слитый с промотором β -актина курицы (CAG), промотор вируса обезьян 40 (SV40) и промотор гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) (Damdindorj et al. *PLoS One*. 9:e106472 (2014)). Также можно использовать и другие промоторы, специфичные для определенного типа клеток. Промоторы, специфичные для клеток сердца, могут представлять собой, например, промотор MLC2v (Phillips et al. *Hypertension*. 39:651-5 (2002)) и промотор гена сердечного тропонина Т (cTnT) (Konkalmatt et al. *Circ Cardiovasc Imaging*. 6:478–486 (2013)).

[179] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены промоторы, оптимизированные для экспрессии, специфичной для клеток сердца, и по длине для размещения трансгенов определенного размера. В одном варианте осуществления промотор генома вектора на основе rAAV, описанного в данном документе, представляет собой полинуклеотид, имеющий от 300 п. о. до 500 п. о.

[180] Иллюстративные последовательности кассеты экспрессии и вирусного генома по настоящему изобретению можно найти в таблице 5. В некоторых вариантах осуществления кассета экспрессии содержит полинуклеотидную последовательность, которая обладает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99 или SEQ NO: 101. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит полинуклеотидную последовательность, которая обладает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100 или SEQ NO: 102. В другом варианте кассета экспрессии может быть сегментирована в соответствии с областями полинуклеотидов, фланкирующими трансген. Полинуклеотидная последовательность, простирающаяся от 5'-конца кассеты до 5'-конца трансгена, в данном документе называется 5'-сегментом кассеты экспрессии. Полинуклеотидная последовательность, простирающаяся от 3'-конца трансгена до 3'-конца кассеты

экспрессии, в данном документе называется 3'-сегментом кассеты экспрессии. В одном варианте осуществления 5'-сегмент кассеты экспрессии содержит полинуклеотидную последовательность, которая обладает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 93. В одном варианте осуществления 3'-сегмент кассеты экспрессии содержит полинуклеотидную последовательность, которая обладает по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 94.

[181] Способность экспрессировать крупные трансгены, доставляемые векторами на основе гAAV или вирионами гAAV, ограничена. Размеры геномов векторов на основе гAAV характеризуются максимальной длиной последовательности, составляющей приблизительно 5 т. о., что предусматривает ограничение длины всех элементов, требуемых в кассете экспрессии, в том числе регуляторных элементов, *например*, промотора, и трансгена, *например*, MYBPC3. Геномы векторов гAAV, превышающие размер 5 т. о., приводят к усечению генома вектора во время упаковки вириона гAAV и снижению или устранению экспрессии трансгена (Wu et al. *Mol Ther.* 18:80-86 (2010)). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены геномы векторов гAAV, которые оптимизированы для переноса крупных трансгенов. Длина элементов генома вектора была уменьшена для размещения более крупного трансгена. В одном варианте осуществления 5'-сегмент и 3'-сегмент кассеты экспрессии в совокупности содержат не более 0,8 т. п. о. или не более 0,9 т. п. о. В другом варианте осуществления 5'-ITR, 5'-сегмент, 3'-сегмент и 3'-ITR в совокупности содержат 1,2 т. п. о. или содержат не более 1,3 т. п. о. В одном варианте осуществления 5'-сегмент содержит не более 500 п. о. или не более 480 п. о. В одном варианте осуществления 3'-сегмент содержит не более 200 п. о. или не более 150 п. о. В другом варианте осуществления геном вектора содержит не более 4,7 т. п. о., 4,8 т. п. о., 4,9 т. п. о. или 5,0 т. п. о. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий продукт гена, содержит от 3 т. о. до 11 т. о., от 3 т. п. о. до 5 т. п. о., от 3,5 т. п. о. до 4,5 т. п. о. или от 3,7 т. п. о. до 4 т. п. о. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий продукт гена, содержит от 3,7 т. п. о. до 3,9 т. п. о. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий продукт гена, содержит 3,8 т. п. о.

Таблица 5. Иллюстративная кассета экспрессии и вирусные геномы

Название	Последовательность ДНК	SEQ ID NO
Вирусный геном (промотор 600 п. о.)	Ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctcgggcgaccttggctgccccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgccaactccatcctaggggttcctttagttaaagattaaccgcatgctacttatctacgtagccatgctctagg aagatcgggaattcgcccttaagtcatggagaagaccaccttcagatgtcctcactggggc tggcagagccggcaacctgcccaggctgctcagtcattaggagccagtagcctggaag atgtctttacccccagcatcagttcaagtggagcagcacataactcttgccctctgcttcaa gattctgggtgctgagacttatggagtgtctggagggtgcctctgcccccaacctgctccc agctggccctcccaggcctgggtgctggcctctgctttatcaggattctcaagagggacag ctggtttatgtgcatgactgttccctgcatatctgctctggttttaaatagcttatctgagcagct ggaggaccacatgggcttatatggcgtgggtacatgttctctgtagcctgtccctggcacct gccaaaatagcagccaacacccccacccccaccgcatccccctgccccaccgctcccc tgtcgcacattctccctcgcagggtggctcaccaggccccagcccacatgctgcttaa agccctctccatcctctgctcaccagtcctcctgagactgagcagacgctccagccac caagcttaataaaagatctttttcattagatctgtgtgtggtttttgtgtgctggggactcga gtaagggcgaattcccgataaggatcttctagagcatggctacgtagataagtagcatggc gggtaactaactacaaggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgct cgtcgtcactgaggccgggagccaaaggctgcccgcgcccgggctttgccccggc ggctcagtgagcgagcgagcgcgag	98
Кассета экспрессии (промотор 600 п. о.)	Tgtagtaaatgattaaccgcatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcggaat tcgcccttaagtcatggagaagaccaccttcagatgtcctcactggggctggcagagcc ggcaacctgcccaggctgctcagtcattaggagccagtagcctggaagatgctttacc ccagcatcagttcaagtggagcagcacataactcttgccctctgcttccaagattctggtgct gagacttatggagtgtctggagggtgcctctgcccccaacctgctcccagctggccctc ccaggcctgggtgctggcctctgctttatcaggattctcaagagggacagctggtttatgtt gcatgactgttccctgcatatctgctctggttttaaatagcttatctgagcagctggaggaccaca tgggcttatatggcgtgggtacatgttctctgtagcctgtccctggcacctgccaaaatagca gccaacacccccacccccaccgcatccccctgccccaccgctccccctgctcgcacattcc tccctcgcagggtggctcaccaggccccagcccacatgctgcttaaaagccctctccatc ctctgctcaccagtcctcctgagactgagcagacgctccagccaccaagcttaataaa agatctttttcattagatctgtgtgtggtttttgtgtgctggggactcaggttaagggcgaat tcccgataaggatcttctagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggttaactaacta ctaca	99
Вирусный геном (промотор 400 п. о.)	Ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctcgggcgacctt tggctgccccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgccaactccatca ctaggggttcctttagttaaagattaaccgcatgctacttatctacgtagccatgctctagg aagatcgggaattcgcccttaagtgcttctgcccccaacctgctcccagctggccctccc aggcctgggtgctggcctctgctttatcaggattctcaagagggacagctggtttatgttgc atgactgttccctgcatatctgctctggttttaaatagcttatctgagcagctggaggaccatgg gcttatatggcgtgggtacatgttctctgtagcctgtccctggcacctgccaaaatagcagc caacacccccacccccaccgcatccccctgccccaccgctccccctgctcgcacattctcc ctccgcagggtggctcaccaggccccagcccacatgctgcttaaaagccctctccatcctc tgcctcaccagtcctcctgagactgagcagacgctccagccaccaagcttaataaaag atctttttcattagatctgtgtgtggtttttgtgtgctggggactcaggttaagggcgaattc ccgataaggatcttctagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggttaactaact	100

	acaaggaaccctagtgatggagtggccactcctctctgcgcgctcgctcgtcactgag gccgggacgacaaaggctgcccagcggcgggctttgcccgggaggcctcagtgagcga gcgagcgcgcag	
Кассета экспрессии (промотор 400 п. о.)	Tgtagtaatgattaaccgcatgctactatctacgtagccatgctctaggaagatcggaat tcgcccttaagttgcttctgcccccaacctgctcccagctggccctcccaggcctgggtt gctggcctctgctttatcaggattctcaagaggacagctggttatggtgcatgactgtccct gcatactgctctggttttaaatagcttctgagcagctggaggaccacatgggcttatatggc gtgggtacatgttctgtagccttgcctggcacctgcaaaaatagcagccaacaccccc caccaccgcatccccctgcccaccctgctcgcacattctccctccgcagg gctggctcaccaggccccagcccacatgctgcttaaagccctctccatcctctgctcacc cagtcctccgctgagactgagcagacgctccagccaccaagcttaataaaagatctttat cattagatctgtgtgtttgtgtgctggggactcgagttaagggcgaattcccgataag gatcttctagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggtaatcattaactaca	101
Вирусный геном + трансен МУВРС3 (промотор 400 п. о.)	ctgcgcgctcgctcgtcactgaggccgcccgggcaaaagcccgggctggggcgacctt ggtcggcggcctcagtgagcagcagcgcgcagagaggagtggccaactccatcac taggggttcctttagtaatgattaaccgcatgctactatctacgtagccatgctctagga agatcggaattgcccttaagttgcttctgcccccaacctgctcccagctggccctcca ggcctgggttgcctctgctttatcaggattctcaagaggacagctggttatggtgcat gactgtccctgcatactgctctggttttaaatagcttctgagcagctggaggaccacatgg gcttatatggcgtgggtacatgttctgtagccttgcctggcacctgcaaaaatagcagc caacacccccaccaccgcatccccctgcccaccctgctcgcacattctcc ctccgcagggtggctcaccaggccccagcccacatgctgcttaaagccctctccatctc tgctcaccagtcctccgctgagactgagcagacgctccagccaccatgctgagccgg ggaagaagccagctcagcttttagcaagaagccacggcagtggaagtggccgcaggca gcccctgctgttcgaggccgagacagagcgggaggagtgaggctgctggcagcgc ggaggcagtgacatcagcgcagcaacaagtacggcctggccacagagggcacacggc atacgtgacagtgcggaagtgggcctgcccagccagggatcttacgcagtcattgctgg ctcctcaaagtgcaagttcgacctcaaggtcatagaggcagagaaggcagagccatgctg gcccctgcccctgcccctgctgaggccactggagcccctggagaagccccggccccagc cgctgagctgggagaaagtgccccaaagtcctcaaaaggtcaagctcagcagctctcaatgt cctaccctggagccccgatgacccttgccctctctgctgctgagccacaggatggcg aggtgaccgtgggtggcagcatcacttctcagcccgcgtggccggcgcagcctctga agccgctgtgtcaagtgggtcaagggcaaatgggtggacctgagcagcaaggtgggccc agcacctgcagctgcacgacagctacgaccgcccagcaaggtctatctgttcgagctgca catcaccgatcccagcctgcttcaactgagcagctaccgctgtgaggtgtccaccaaggac aaattgactgctcaactcaatctcactgtccacgaggccatgggcaccggagacctgga cctctatcagcctccgcccagcagcctggctggaggtggtcggcgatcagtgatagc catgaggacactgggattctggactcagctcactgctgaaaaagagagacagttccggac cccgagggactcgaagctggaggcaccagcagaggaggacgtgtgggagatctacgg caggcaccatctgagtacgagcgcacgctccctccagctacggcgtcactgacctgcgcg gcatgctaaagaggctcaaggcctgagggcgcgatgagaagaagagcacagccttcaga agaagctggagccggcctaccaggtgagcaaggccacaagatccggctgacctggaa ctggctgacctgagctgaggtcaaatggctcaagaatggccaggagatccagatgagc	102

ggcagcaagtacatctttgagtcacatcggtgccaagcgtaccctgaccatcagccagtgtc
 attggcggacgacgcagcctaccagtgcgtggtgggtggcgagaagtgtagcacggagct
 cttgtgaaagagccccctgtgctcatcacgcgcccttggaggaccagctggtgatggtgg
 ggcagcgggtggagttttagtgtgaagtatcggaggagggggcgcaagtcaaatggctga
 aggacggggtggagctgaccgggaggagacctcaaataccggttcaagaaggacggg
 cagagacaccacctgatcatcaacgagggccatgctggaggacgcggggcactatgactg
 tgcactagcgggggcccagggcgtggctgagctcattgtcaggaaaagaagctggagggtg
 taccagagcatcgcagacctgatggtggggcgaaaggaccaggcgggtgttcaaatgtgag
 gtctcagatgagaatgttcggggtgtgtggctgaagaatgggaaggagctggtgccgcaca
 gccgataaagggttcccacatcgggggggtccacaaactgaccattgacgacgtcacacc
 tcccagcagggctgactacagctttgtgcccaggggcttcgctgcaacctgtcagccaag
 ctccactcatggaggtaagattgacttcgtaccaggcaggaacctccaagatccacct
 ggactgcccaggccgcataccagacaccattgtggtgtagctggaaataagctacgtctgg
 acgtccctatctctggggacccccgctcccactgtgatctggcagaaggctatcacgcaggg
 gaataaggccccagccagggcagccccagatgccccagaggacacaggtgacagcgat
 gagtgggtgttgacaagaagctgctgtgtgagaccgagggccgggtccgcgtggagacc
 accaaggaccgcagcatctcacggtcagggggcagagaaggaaagatgagggcgtcta
 cacggtcacagtgaagaacctgtggggcagggaccaggtcaacctcacagtaaggatcat
 cgactgcccagacgcacctgcggcccccaagatcagcaactgggagaggactcctgca
 cagtacagtgggagccgctgctacgatggcgggcagcccactctgggtacatctgg
 agcgcaagaagaagaagactaccggtggatgcggctgaacttcgacctgattcaggagc
 tgagtcatgaagcggcgcatgatcagggcggtgtgtacgagatgcgctctacgcggt
 caacgccatcggcatgtccagggcccagccctgctcccagcccttcatgectatcggtcccc
 ccagcgaaccaccacctggcagtagaggacgtctctgacaccaggtctccctcaagtg
 gcggccccagagcgcgtgggagcaggaggcctggatggctacagcgtggagtactgcc
 cagagggctgctcagagtgggtggctgccctgcaggggctgacagagcacacatcgatac
 tggtaaggacctgcccacggggggcccggctgctttccgagtgcgggcacacaatatggc
 agggcctggagcccctgttaccaccagggagccggtgacagtgcaggagatcctgcaacg
 gccacggcttcatctgcccagggacctgcgcagaccattcagaagaaggctggggagc
 ctgtgaaccttctcatcccttccagggcaagccccggcctcaggtgacctggaccaagag
 gggcagcccctggcagggcagggaggtgagcatccgcaacagccccacagacaccatcct
 gttcatccgggcccgtcgcgcgtgcattcaggcacttaccaggtgacgggtgcattgaga
 acatggaggacaaggccacgctggtgctgcaggtgtgtgacaagccaagtctccccagga
 tctccgggtgactgacgcctggggcttaatgtggctctggagtgaagccaccaggtg
 tcggcaacacggaactctgggggtacacagtgcagaaagccgacaagaagaccatggag
 tggttaccgtcttggagcattaccgcccaccactgcgtggtgcccagagctcatcattggc
 aatggctactactccgcgtcttaccagcagaatatggttggctttagtgacagagcggccacc
 accaaggagcccgtcttaccagaccagggcaccctatgagccaccaactataaggc
 cctggacttctccagggccccagcttaccagccccctggtaaccgctcgggtatcgcg
 ggctacactgctatgctctgctgtgctgctcggggtagccccagccccagatttctggttc
 aagaatggcctggacctgggagaagacgcccgttccgcatgttcagcaagcagggagtg
 ttgactctggagattagaaagccctgccccctttagcggggcactatgtctgcagggccacc
 aacttacagggcgaggcacgggtgtgagtgccgctggaggtgcgagtgccctcagtaagc
 ttaataaaagatcttatttccattagatctgtgtgtggttttgtgtgctggggactcgagtaag
 ggcgaattcccagataaggatcttccatagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggt
 aatcattaactacaaggaaccctagtgtgagttggccactccctctctgcgcgtcgtc
 gctcactgaggccggggcgaccaaaggctgcccagcggcgggcttggcccggggcggcct
 cagtgagcggagcggcgagcgcgag

<p>Кассета экспрессии + трансген МУВРС3 (промотор 400 п. о.)</p>	<p>tgtagttaatgattaaccgccaatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcggaatt cgcccttaagtgcctctgcccccaacctgctcccagctggccctcccaggcctgggttg ctggcctctgctttatcaggattctcaagagggacagctggttatgttgcactgttcctg catatctgctctggttttaatagcttatctgagcagctggaggaccacatgggcttatatggcg tgggtacatgttctgtagccttgcctggcacctgccaaaatagcagccaacaccccc acccccaccgccaatccccctgccccaccgtcccctgtgcacattcctcctccgcaggg ctggctcaccaggccccagcccacatgctgcttaaagccctctccatcctctgectacca gtccccgctgagactgagcagacgctccagccaccatgctgagccggggaagaagcc agtctcagcttttagcaagaagccacggtcagtggaaagtggccgaggcagccctgcccgtg ttcagggccgagacagagcgggaggtgaaggtgctgctggcagcgcggaggcagtg acatcagcgcagcaacaagtacggcctggccacagagggcacacggcatacgtgaca gtgcccgaagtgggcccctgcccagccagggatcttacgcagtcattgctgctcctcaagg tcaagttcgacctcaaggtcatagaggcagagaaggcagagcccattgctggcccctgccc ctgcccctgctgaggccactggagccccctggagaagccccggccccagccgctgagctg ggagaaagtgccccaaagtccaaagggtcaagctcagcagctctcaatggtcctaccctg gagccccgatgacccattggcctctctgctgatcgggccacaggtggcgaggtgaccgt gggtggcagcatcaccctctcagcccgcgtggccggcgccagcctcctgaagccgctgt ggtaagtggttcaaggcaaatgggtggacctgagcagcaaggtggccagcacctgca gtgcacgacagctacgaccgcccagcaaggtctatctgttcgagctgcacatcccgat gcccagcctgcccactggcagctaccgctgtgaggtgtccaccaaggacaaattgactg ctccaactcaatctcactgtccacgaggccatgggcaccggagacctggacctctatcag ccttccgcccagcagcctggctggaggtggctggcgatcagtgatagccatgaggaca ctgggattctggactcagctcactgctgaaaaagagagacagttccggacccccgagggg ctcgaagctggaggcaccagcagaggagcagctgtgggagatctacggcagggcacc catctgagtacgagcgcacgctccagtagggcgtcactgacctgcccggcatgctaaag aggctcaaggccatgaggcgcgatgagaagaagagcacagccttcagaagaagctgga gccggcctaccaggtgagcaaggccacaagatccggctgaccgtggaactggctgacc atgacgctgaggtcaaatggctcaagaatggccaggagatccagatgagcggcagcaagt acatctttgagtccatcggtgccaagcgtaccctgaccatcagccagtctcattggcggac gacgcagcctaccagtgctggtgggtggcgagaagtgtagcacggagctctttgtgaaag agccccctgtgctcatcacgcgcccctggaggaccagctggtgatggtggggcagcggg tggagtttgagtgtgaagtatcggaggagggggcgcaagtcaaatggctgaaggacgggg tggagctgacccgggaggagacctcaaataccggtcaagaaggacggggcagagacac cacctgatcatcaacgaggccatgctggaggacgccccgactatgactgtgactagcg ggggccaggcgtggctgagctcattgtgcaggaaaagaagctggaggtgtaccagagca tcgcagacctgatgggtggcgcaaaggaccaggcgggttcaaatgtgaggtctcagatga gaatgttcgggtgtgtggctgaagaatgggaaggagctgggtgcccagacgccgataaa gggtcccacatcgggcccgtccaaaactgaccattgacgacgtcacacctgcccagca ggctgactacagctttgtccccagggtctgcccctgcaacctgtcagccaagctccactcat ggaggtcaagattgacttctaccaggcaggaacctcccagatccacctggactgccc ggccgcataccagacaccattgtggtgttagctggaataagctacgtctggacgtccctatc tctggggacccccgctcccactgtgatctggcagaaggctatcacgcagggggaataaggccc cagccaggccagccccagatgccccagaggacacaggtgacagcagatgagtggtgtttg acaagaagctgctgtgtgagaccgagggccgggtccgctggagaccaccaaggaccgc agcatctcacggtcagggggcagagaagggaagatgagggcgtctacacggtcacagt aagaacctgtggcgaggaccaggtcaacctcacagtcaaggtcatcgacgtgcccagac gcacctgcccggcccccaagatcagcaacgtgggagaggactcctgcacagtacagtggga gccgctgcccacgatggcggcgagccatcctgggctacatcctggagcgaagaagaa</p>	<p>95</p>
--	---	-----------

	<p>gaagagctaccggtggatgCGGctgaacttcgacctgattcaggagctgagtcatgaagcg CGGcgcatgatcgagggcggtgttacgagatgCGGctctacCGGtcaacgccatcggc atgtccaggcccagccctgCctcccagcccttcctatgcctatcggtccccccagcgaaccac ccacctggcagtagaggacgtctctgacaccacgggtctccctcaagtggcgccccccaga gCGGctgggagcaggaggcctggatggctacagcgtggagtactgcccagagggctgct cagagtgggtggctgccctgCaggggctgacagagcacacatcgatactgggtgaaggacc tgcccacgggggcccggctgctttccgagtCGGgacacacaatatggcagggcctggag cccctgttaccaccacggagccgggtgacagtgCaggagatcctgcaacggccacggcttc agctgcccaggcacctgCGccagaccattcagaagaaggTCggggagcctgtgaaccttct catccctttcagggaagccccggcctcaggtgacctggaccaaagaggggagccct ggcagggcaggaggtgagcatccgcaacagccccacagacaccatcctgttcatccgggc cgctgcccCGctgCattcaggcacttaccaggtgacggTgcgCattgagaacatggaggac aaggccacgctggTgctgCaggtgtgacaagccaagtcctcccaggatctccgggtga ctgacgCctggggctttaatgtggctctggagtggaaGCCacccccaggatgTcggaacac ggaactctgggggtacacagtgCagaaagccgacaagaagaccatggagtggTtaccgt cttggagcattaccCGcCaccactgCgtggTgCagagctcatcattggcaatggctact acttccgCgtcttCagccagaatatggtTgctttagtgacagagCGGCCaccaccaaggag cccgtctttatcccagaccaggcacacctatgagccaccaactataaggccctggacttc tccgagggcccaagcttCaccagccccctggTgaaccgctcggTcatcCGGGctacactg ctatgctctgctgTgctgTccggggtagccccaaGCCaaagatttctggTtcaagaatggc tggaacctgggagaagacgcccgttccgcatgttCagcaagcagggagTgttactctgga gattagaaagccctgccccttgacgggggcatctatgctgCagggccaccaacttacagg gCgaggcacggTgtgagTgCcgCctggaggtgCgagTgCctcagTaaagcttaataaaaga tctttatttCattagatctgTgtgtTgtttttgtgTgctggggactcGagTtaagggcgaattcc cgataaggatcttCtagagcatggctacgtagataagtagcatggCGggTtaatcattaacta ca</p>	
5'-сегмент – неполный вирусный геном (промотор 400 п. о.)	<p>TgtagttaatgattaaccCGcatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcggaat tcgcccttaagttgCcttctgcccccaaccctgctcccagctggccctcccaggcctgggtt gctggcctctgctttatcaggattctcaagaggacagctggTttatgttgcagactgttccct gcatactgctctggtttaaatagcttatctgagcagctggaggaccacatgggcttatatggc gtgggtacatgttctgtagccttgcctggcacctgcaaaaatagcagccaacaccccc caccaccCGccatccccctgccccaccgTccccctgTgcacattctcctcCGcagg gctggtcaccaggccccagccacatgCctgcttaagccctctccatcctctgCctcacc cagTccccgctgagactgagcagacgCctccagccacc</p>	93
3'-сегмент – неполный вирусный геном	<p>AgcttaataaaagatctttatttCattagatctgTgtgtTgtttttgtgTgctggggactcGagT taagggcgaattcccGataaggatcttCtagagcatggctacgtagataagtagcatggcg ggTtaatcattaactaca</p>	94

[182] В некоторых аспектах настоящего изобретения вирион гAAV используется для доставки кассет экспрессии, описанных в данном документе, в клетки сердца субъекта, *например*, для лечения кардиомиопатии. Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрен вирион гAAV, при этом вирион гAAV содержит капсид AAV и кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид, кодирующий трансген, функционально связанный с промотором.

[183] Вирионы гAAV по настоящему изобретению содержат капсидный белок. Капсидные белки представляют собой структурные белки, которые составляют собранную икосаэдрическую упаковку вириона гAAV, содержащего кассету экспрессии. Капсидные белки классифицируются по серотипу. Серотипы капсидов дикого типа в вирионах гAAV могут представлять собой, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 или AAV12 (Naso et al. *BioDrugs* 31:317–334 (2017)). Типы сконструированных капсидов включают химерные капсиды и мозаичные капсиды (Choi et al. *Curr Gene Ther.* 5: 299–310 (2005)). Капсиды выбирают для вирионов гAAV на основании их способности трансдуцировать определенные типы тканей или клеток (Liu et al. *Curr Pharm Des.* 21:3248-56 (2015)).

[184] Можно использовать любой капсидный белок, который может способствовать трансдукции клеток сердца вирионом гAAV для доставки трансгена, как описано в данном документе. Капсидные белки, используемые в вирионах гAAV для доставки трансгена в клетки сердца, приводящей к высокой экспрессии, могут представлять собой, например, AAV4, AAV6, AAV7, AAV8 и AAV9 (Zincarelli et al. *Mol. Ther.* 16:P1073-1080 (2008)). Искусственные капсиды, такие как химерные капсиды, полученные с помощью комбинаторных библиотек, также можно использовать для доставки трансгена в клетки сердца, приводящей к высокой экспрессии (см. US 63/012703, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки). Другие капсидные белки с различными характеристиками также можно использовать в вирионах гAAV по настоящему изобретению. Векторы на основе AAV и их капсиды представлены в публикациях патентов США №№ US10011640B2; US7892809B2, US8632764B2, US8889641B2, US9475845B2, US10889833B2, US10480011B2 и US10894949B2, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки; и международных патентных публикациях №№ WO2020198737A1, WO2019028306A2, WO2016054554A1, WO2018152333A1, WO2017106236A1, WO2008124724A1, WO2017212019A1, WO2020117898A1, WO2017192750A1, WO2020191300A1 и WO2017100671A1, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

[185] В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV по настоящему изобретению содержат сконструированный капсидный белок. Сконструированные

капсидные белки могут быть получены из исходного капсида, *например*, дикого типа, и содержат, *например*, вариант полипептидной последовательности относительно последовательности исходного капсида в одном или более сайтах. *Например*, варианты сайтов исходного капсида могут иметь место в сайте VR-IV, сайте VR-V, сайте VR-VII и/или сайте VR-VIII (см., *например*, Büning and Srivastava. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 12:248-265 (2019)).

[186] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок представляет собой химерный капсидный белок AAV5/AAV9. В некоторых вариантах осуществления химерный капсидный белок содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или больше полипептидных сегментов, полученных из капсидного белка AAV5 (SEQ ID NO: 144). В некоторых вариантах осуществления химерный капсидный белок содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или больше полипептидных сегментов, полученных из капсидного белка AAV9 (SEQ ID NO: 143). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полипептидный сегмент получен из капсидного белка AAV5, и по меньшей мере один полипептидный сегмент получен из капсидного белка AAV9.

[187] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок представляет собой комбинированный капсидный белок. Как используется в данном документе, «комбинированный капсидный белок» относится к химерному капсидному белку AAV5/AAV9, который дополнительно содержит аминокислотные видоизменения относительно исходной химерной последовательности в одном или более сайтах. В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов исходной химерной последовательности выбраны из тех, которые эквивалентны сайту VR-IV, сайту VR-V, сайту VR-VII и сайту VR-VIII капсидного белка AAV9.

[188] В некоторых вариантах осуществления вирионы rAAV содержат сконструированный капсидный белок, выбранный из таблицы 6.

Таблица 6. Сконструированные капсидные белки

Сконструированный капсид	SEQ ID NO:
CR9-01	145
CR9-07	146
CR9-08	147
CR9-09	148
CR9-10	149
CR9-11	150
CR9-13	151
CR9-14	152
CR9-15	153
CR9-16	154
CR9-17	155
CR9-20	156
CR9-21	157
CR9-22	158
ZC23	159
ZC24	160
ZC25	161
ZC26	162
ZC27	163
ZC28	164
ZC29	165
ZC30	166
ZC31	167
ZC32	168
ZC33	169
ZC34	170
ZC35	171
ZC40	172
ZC41	173
ZC42	174
ZC43	175
ZC44	176
ZC45	177
ZC46	178
ZC47	179
ZC48	180
ZC49	181
ZC50	182
TN47-07	183

Сконструированный капсид	SEQ ID NO:
TN47-10	184
TN47-13	185
TN47-14	186
TN47-17	187
TN47-22	188
TN40-07	189
TN40-10	190
TN40-13	191
TN40-14	192
TN40-17	193
TN40-22	194
TN44-07	195
TN44-10	196
TN44-13	197
TN44-14	198
TN44-17	199
TN44-22	200

[189] В некоторых вариантах осуществления гAAV является дефектным по репликации в том смысле, что вирион гAAV не может независимо дополнительно реплицироваться и упаковывать свой геном. Например, в случае, когда на клетку сердца нацеливаются вирионы гAAV, трансген экспрессируется в целевой клетке сердца, однако вследствие того, что в целевой клетке сердца отсутствуют гены гер и сар AAV, а также гены, отвечающие за вспомогательные функции, гAAV не способен реплицироваться.

[190] В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV по настоящему изобретению, инкапсулирующие кассеты экспрессии, описанные в данном документе, могут быть получены посредством получения без вирусов-помощников. гAAV являются вирусами с дефицитом репликации, и им обычно требуются компоненты живого вируса-помощника, такого как аденовирус, в клетке-хозяине для упаковки инфекционных вирионов гAAV. гAAV являются вирусами с дефицитом репликации и обычно требуют компонентов живого вспомогательного вируса, такого как аденовирус, в клетке-хозяине для упаковки инфекционных вирионов гAAV. В системе без вирусов-помощников пакующая линия клеток-хозяев котрансфицируется тремя плазмидами. Первая плазида может содержать продукты генов аденовируса (*например*, гены РНК E2A, E4 и VA), необходимые для упаковки вирионов гAAV. Вторая плазида может содержать требуемые гены AAV (*например*, гены REP и CAP). Третья плазида содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, представляющий интерес, и промотор, фланкированный ITR. Пакующая линия клеток-хозяев может представлять собой, *например*, клетки-хозяева AAV-293. Подходящие клетки-хозяева содержат дополнительные компоненты, требуемые для упаковки инфекционных вирионов гAAV, которые не поставляются плазмидами. В некоторых вариантах осуществления гены CAP могут кодировать, *например*, капсидные белки AAV, описанные в данном документе.

IV. Способы лечения

[191] В настоящем изобретении также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие геномы векторов на основе гAAV или вирионы гAAV, раскрытые в данном документе, и один или более фармацевтически приемлемых

носителей, разбавителей или наполнителей. В конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит геном вектора на основе гAAV или вирион гAAV, описанный в данном документе, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический белок или нуклеиновую кислоту, функционально связанную с кардиоспецифическим промотором (*например*, модифицированным промотором TNNT2). Например, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой вектор на основе AAV9, содержащий модифицированный промотор гена сердечного TNNT2 (SEQ ID NO: 3), функционально связанный с белком MYBPC3 (SEQ ID NO: 86). Предусмотрены фармацевтические композиции, *например*, для применения в предупреждении или лечении кардиомиопатии, которые содержат терапевтически эффективное количество вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический белок или нуклеиновую кислоту, которые могут восстанавливать сократительную функцию сердца.

[192] В настоящем изобретении предусмотрены способы обеспечения экспрессии полинуклеотида в клетке. Способ может включать, например, обеспечение трансдукции клетки-мишени вирионами гAAV, геномами векторов на основе гAAV или кассетами экспрессии, описанными в данном документе. Клетка-мишень может представлять собой, например, без ограничения, клетку сердца, мышечную клетку, кардиомиоцит, полученный из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC-CM), кардиомиоцит или *MYBPC3*^{-/-} iPSC-CM. В одном аспекте способ обеспечения экспрессии белка MYBPC3 в клетке включает обеспечение трансдукции клетки-мишени или популяции клеток-мишеней вирионом гAAV или геномами векторов на основе гAAV, описанными в данном документе. В одном варианте осуществления клетка представляет собой *MYBPC3*^{-/-} клетку. В одном варианте осуществления клетка содержит инактивирующую мутацию в одной или обеих копиях эндогенного гена *MYBPC3*.

[193] Композиции, описанные в данном документе, можно использовать в способе лечения субъекта с заболеванием сердца или сердечным состоянием. «Лечение» или «лечение состояния или субъекта, нуждающегося в этом» относится к (1) принятию мер для получения благоприятных или желаемых результатов, в том числе клинических результатов, таких как уменьшение интенсивности проявления

симптомов; (2) предупреждению заболевания, например, обеспечению отсутствия развития клинических симптомов заболевания у пациента, который может быть предрасположен к заболеванию, но который еще не испытывает или у которого еще не проявляются симптомы заболевания; (3) подавлению заболевания, например, прекращению или уменьшению интенсивности развития заболевания или его клинических симптомов; (4) облегчению течения заболевания, например, обеспечению регрессии заболевания или его клинических симптомов; или (5) задержке начала проявления заболевания. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают без ограничения стимуляцию сокращения сердечных саркомеров.

[194] Субъекты, нуждающиеся в лечении с применением композиций и способов по настоящему изобретению, включают без ограничения индивидуумов с врожденным пороком сердца, индивидуумов, страдающих дегенеративным мышечным заболеванием, индивидуумов, страдающих состоянием, которое приводит к ишемии тканей сердца (*например*, индивидуумов с заболеванием коронарных артерий) и т. п. В некоторых примерах способ применим для лечения дегенеративного мышечного заболевания или состояния (*например*, семейной кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, гипертрофической кардиомиопатии, рестриктивной кардиомиопатии или заболевания коронарных артерий с развитием в его результате ишемической кардиомиопатии). В некоторых примерах рассматриваемый способ применим для лечения индивидуумов, имеющих сердечное или сердечно-сосудистое заболевание или нарушение, например, сердечно-сосудистое заболевание, аневризму, стенокардию, аритмию, атеросклероз, нарушение мозгового кровообращения (инсульт), цереброваскулярное заболевание, врожденный порок сердца, застойную сердечную недостаточность, миокардит, поражение клапанов сердца, заболевание коронарных артерий, дилатационную диастолическую дисфункцию, эндокардит, высокое кровяное давление (гипертензию), кардиомиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию, рестриктивную кардиомиопатию, заболевание коронарных артерий с развитием в его результате ишемической кардиомиопатии, пролапс митрального клапана, инфаркт миокарда (сердечный приступ) или венозную тромбоэмболию. В некоторых примерах субъект страдает кардиомиопатией или имеет риск ее развития.

[195] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в данном документе, можно применять для предупреждения и/или лечения форм кардиомиопатии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, можно применять для лечения форм кардиомиопатии, связанных с мутациями сердечного миозинсвязывающего белка С (MYBPC3), таких как гипертрофическая кардиомиопатия и семейная гипертрофическая кардиомиопатия. Кардиомиопатия, которую лечат с помощью композиций и способов, описанных в данном документе, может также включать формы кардиомиопатии, ассоциированные с легочной эмболией, венозным тромбозом, инфарктом миокарда, транзиторной ишемической атакой, нарушением со стороны периферических сосудов, атеросклерозом, ишемической болезнью сердца и/или другим повреждением миокарда или сосудистым заболеванием. В некоторых вариантах осуществления формы кардиомиопатии, которые лечат с помощью композиций и способов, описанных в данном документе, могут включать заболевания сердца, ассоциированные с гиперсократимостью ткани миокарда, такие как сердечная недостаточность, связанная с гиперсократимостью левого желудочка.

[196] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, могут обеспечивать индуцирование выявляемой экспрессии терапевтического белка или нуклеиновой кислоты (*например*, белка MYBPC3) или их мутантной формы, варианта или фрагмента для модулирования сократительной функции ткани миокарда у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления количество, концентрацию и объем композиции, которая модулирует сократительную функцию в ткани миокарда, вводимой субъекту, можно контролировать и/или оптимизировать для значительного улучшения функциональных параметров сердца при одновременном смягчении неблагоприятных побочных эффектов.

[197] Количество композиции, которая модулирует сократительную функцию, вводимой в ткань миокарда, также может представлять собой количество, требуемое для достижения выявляемой экспрессии терапевтического белка или нуклеиновой кислоты (*например*, белка MYBPC3) или их мутантной формы, варианта или фрагмента в сердце; сохранения и/или улучшения сократительной

функции; задержки появления кардиомиопатии или обращения вспять патологического течения болезни; увеличения жизнеспособности миоцитов; улучшения функции миофиламентов; подавления гипертрофии левого желудочка; регрессии гипертрофии сердца, нормализации систолической и диастолической функции сердца; а также восстановления нормального поведения поперечных мостиков на уровне миофиламентов.

[198] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в данном документе, приводят к выявляемой экспрессии белка MYBPC3 или его мутантной формы, варианта или фрагмента в клетке сердца субъекта, получающего лечение. В некоторых вариантах осуществления введение генома вектора на основе гAAV или вириона гAAV, описанных в данном документе, вызывает специфичную экспрессию белка MYBPC3 в сердце субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение генома вектора на основе гAAV или вириона гAAV, описанных в данном документе, вызывает низкую или невыявляемую экспрессию MYBPC3 в скелетной ткани, головном мозге и/или печени субъекта, где субъект необязательно страдает кардиомиопатией или имеет риск ее развития.

[199] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в данном документе, приводят к выявляемой экспрессии белка KCNH2 или его мутантной формы, варианта или фрагмента в клетке сердца субъекта, получающего лечение.

[200] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в данном документе, приводят к выявляемой экспрессии белка TRPM4 или его мутантной формы, варианта или фрагмента в клетке сердца субъекта, получающего лечение.

[201] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в данном документе, приводят к выявляемой экспрессии белка DSG2 или его мутантной формы, варианта или фрагмента в клетке сердца субъекта, получающего лечение.

[202] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в данном документе, приводят к выявляемой экспрессии белка ATP2A2

или его мутантной формы, варианта или фрагмента в клетке сердца субъекта, получающего лечение.

[203] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, раскрытые в данном документе, приводят к выявляемой экспрессии CACNA1C, DMD, DMPK, EPG5, EVC, EVC2, FBN1, NF1, SCN5A, SOS1, NPR1, ERBB4, VIP или MYH7 или их мутантной формы, варианта или фрагмента в клетке сердца субъекта, получающего лечение.

[204] «Выявляемая экспрессия», как правило относится к экспрессии, составляющей по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20% или больше по сравнению с контрольным субъектом или тканью, не обработанными вектором. В некоторых вариантах осуществления выявляемая экспрессия означает экспрессию, в 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза или 3 раза более высокую, чем в случае контроля без вектора. Экспрессию можно оценить посредством вестерн-блоттинга, как описано в следующем примере, или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), или других способов, известных из уровня техники. В некоторых случаях экспрессию измеряют количественно, используя калибровочную кривую. Калибровочные кривые могут быть построены с использованием очищенного белка, *например*, очищенного белка MYBPC3, посредством способов, описанных в примерах или известных из уровня техники. В качестве альтернативы экспрессию терапевтического продукта гена можно оценить путем количественного определения соответствующей мРНК.

[205] В некоторых вариантах осуществления выявляемая экспрессия терапевтического продукта гена в ткани сердца имеет место при дозах в геномах векторов (vg) на килограмм массы субъекта (кг), составляющих 3×10^{14} vg/кг или меньше, 2×10^{14} vg/кг или меньше, 1×10^{14} vg/кг или меньше, 9×10^{13} vg/кг или меньше, 8×10^{13} vg/кг или меньше, 7×10^{13} vg/кг или меньше, 6×10^{13} vg/кг или меньше, 5×10^{13} vg/кг или меньше, 4×10^{13} vg/кг или меньше, 3×10^{13} vg/кг или меньше, 2×10^{13} vg/кг или меньше или 1×10^{13} vg/кг или меньше.

[206] В различных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, содержат вирионы гAAV или геномы векторов на их основе, описанные в данном документе, и одно или более фармацевтически приемлемых

вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут включать основы (*например*, носители, разбавители и наполнители), которые являются фармацевтически приемлемыми для состава, пригодного для инъекции. Это могут быть, в частности, изотонические стерильные солевые растворы (фосфат мононатрия или динатрия, хлорид натрия, калия, кальция или магния и т. п. или смеси таких солей) или сухие, особенно лиофилизированные, композиции, которые при добавлении, в зависимости от конкретного случая, стерилизованной воды или физиологического раствора позволяют приготовить растворы для инъекций. Иллюстративные фармацевтические формы, пригодные для инъекционного применения, включают, *например*, стерильные водные растворы или дисперсии; составы, содержащие кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий.

[207] В различных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат приблизительно 1×10^8 копий геномов на миллилитр (GC/мл), приблизительно 5×10^8 GC/мл, приблизительно 1×10^9 GC/мл, приблизительно 5×10^9 GC/мл, приблизительно 1×10^{10} GC/мл, приблизительно 5×10^{10} GC/мл, приблизительно 1×10^{11} GC/мл, приблизительно 5×10^{11} GC/мл, приблизительно 1×10^{12} GC/мл, приблизительно 5×10^{12} GC/мл, приблизительно 5×10^{13} GC/мл, приблизительно 1×10^{14} GC/мл или приблизительно 5×10^{14} GC/мл вирусного вектора (*например*, вириона гAAV).

[208] В различных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат приблизительно 1×10^8 вирусных геномов на миллилитр (vg/мл), приблизительно 5×10^8 vg/мл, приблизительно 1×10^9 vg/мл, приблизительно 5×10^9 vg/мл, приблизительно 1×10^{10} vg/мл, приблизительно 5×10^{10} vg/мл, приблизительно 1×10^{11} vg/мл, приблизительно 5×10^{11} vg/мл, приблизительно 1×10^{12} vg/мл, приблизительно 5×10^{12} vg/мл, приблизительно 5×10^{13} vg/мл, приблизительно 1×10^{14} vg/мл или приблизительно 5×10^{14} vg/мл вирусного вектора (*например*, вириона гAAV).

[209] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят в общем объеме, составляющем приблизительно

1 мл, 5 мл, 10 мл, приблизительно 20 мл, приблизительно 25 мл, приблизительно 30 мл, приблизительно 35 мл, приблизительно 40 мл, приблизительно 45 мл, приблизительно 50 мл, приблизительно 55 мл, приблизительно 60 мл, 65 мл, приблизительно 70 мл, приблизительно 75 мл, приблизительно 80 мл, приблизительно 85 мл, приблизительно 90 мл, приблизительно 95 мл, приблизительно 100 мл, приблизительно 105 мл, приблизительно 110 мл, приблизительно 115 мл, приблизительно 120 мл, приблизительно 125 мл, приблизительно 130 мл, приблизительно 135 мл, приблизительно 140 мл, приблизительно 145 мл, приблизительно 150 мл, приблизительно 155 мл, приблизительно 160 мл, приблизительно 165 мл, приблизительно 170 мл, приблизительно 175 мл, приблизительно 180 мл, приблизительно 185 мл, приблизительно 190 мл, приблизительно 200 мл, приблизительно 205 мл, приблизительно 210 мл, приблизительно 215 мл или приблизительно 220 мл.

[210] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение вириона гAAV, кодирующего MYVPC3, в дозе, составляющей приблизительно 1×10^8 копий геномов на миллилитр (GC/мл), приблизительно 5×10^8 GC/мл, приблизительно 1×10^9 GC/мл, приблизительно 5×10^9 GC/мл, приблизительно 1×10^{10} GC/мл, приблизительно 5×10^{10} GC/мл, приблизительно 1×10^{11} GC/мл, приблизительно 5×10^{11} GC/мл, приблизительно 1×10^{12} GC/мл, приблизительно 5×10^{12} GC/мл, приблизительно 5×10^{13} GC/мл, приблизительно 1×10^{14} GC/мл или приблизительно 5×10^{14} GC/мл вириона гAAV.

[211] В предпочтительных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают внутривенное введение вириона гAAV, кодирующего MYVPC3, в дозе, составляющей приблизительно 3×10^{12} GC/мл, приблизительно 3×10^{13} GC/мл, приблизительно 1×10^{14} GC/мл или приблизительно 3×10^{14} GC/мл вириона гAAV.

[212] В предпочтительных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение путем локализованной доставки в сердце вириона гAAV, кодирующего MYVPC3, в дозе, составляющей приблизительно 3×10^{11} GC/мл, приблизительно 3×10^{12} GC/мл, приблизительно 1×10^{13} GC/мл или приблизительно 3×10^{13} GC/мл вириона гAAV.

[213] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение вириона rAAV, кодирующего МУВРС3, в дозе, составляющей приблизительно 1×10^8 вирусных геномов на миллилитр (vg/мл), приблизительно 5×10^8 vg/мл, приблизительно 1×10^9 vg/мл, приблизительно 5×10^9 vg/мл, приблизительно 1×10^{10} vg/мл, приблизительно 5×10^{10} vg/мл, приблизительно 1×10^{11} vg/мл, приблизительно 5×10^{11} vg/мл, приблизительно 1×10^{12} vg/мл, приблизительно 5×10^{12} vg/мл, приблизительно 5×10^{13} vg/мл, приблизительно 1×10^{14} vg/мл или приблизительно 5×10^{14} vg/мл вириона rAAV.

[214] В предпочтительных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают внутривенное введение вириона rAAV, кодирующего МУВРС3, в дозе, составляющей приблизительно 3×10^{12} vg/мл, приблизительно 3×10^{13} vg/мл, приблизительно 1×10^{14} vg/мл или приблизительно 3×10^{14} vg/мл вириона rAAV.

[215] В предпочтительных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают введение путем локализованной доставки в сердце вириона rAAV, кодирующего МУВРС3, в дозе, составляющей приблизительно 3×10^{11} vg/мл, приблизительно 3×10^{12} vg/мл, приблизительно 1×10^{13} vg/мл или приблизительно 3×10^{13} vg/мл вириона rAAV.

[216] Количество копий геномов на миллилитр можно определить с помощью количественной полимеразной цепной реакции (qPCR) с использованием калибровочной кривой, построенной с помощью эталонного образца с известной концентрацией полинуклеотидного генома вируса. В случае AAV в качестве эталонного образца часто используют плазмиду-переносчика, используемую для создания вириона rAAV, но можно использовать и другие эталонные образцы.

[217] В качестве альтернативы или дополнительно концентрацию вирусного вектора можно определить путем измерения титра вектора в линии клеток. Титр вируса обычно выражается в виде количества вирусных частиц (vp) на единицу объема (*например*, vp/мл). В различных вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат приблизительно 1×10^8 вирусных частиц на миллилитр (vp/мл), приблизительно 5×10^8 vp/мл, приблизительно 1×10^9 vp/мл, приблизительно 5×10^9 vp/мл,

приблизительно 1×10^{10} вр/мл, приблизительно 5×10^{10} вр/мл, приблизительно 1×10^{11} вр/мл, приблизительно 5×10^{11} вр/мл, приблизительно 1×10^{12} вр/мл, приблизительно 5×10^{12} вр/мл, приблизительно 5×10^{13} вр/мл, или приблизительно 1×10^{14} вр/мл, или приблизительно 5×10^{14} вирусного вектора (*например*, вириона гAAV).

[218] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий контейнер, в котором размещена фармацевтическая композиция, описанная в данном документе.

[219] Вирионы гAAV или геномы векторов на их основе по настоящему изобретению можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, путем системного применения, *например*, путем внутривенной, внутриартериальной или внутрибрюшинной доставки вектора по аналогии с тем, что было показано на животных моделях (Katz et al., 2012, *Gene Ther.* 19:659-669). В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV или геномы векторов на их основе по настоящему изобретению обеспечивают лечение или предупреждение гипертрофической кардиомиопатии, где вектор вводят системно.

[220] В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV или геномы векторов на их основе по настоящему изобретению могут быть доставлены путем прямого введения в ткань сердца, *например*, путем внутрикоронарного введения. В некоторых вариантах осуществления векторы вводят в виде однократной дозы путем антеградной инфузии через эпикардальную коронарную артерию в течение 10-минутного периода в лаборатории катетеризации сердца после ангиографии (чрескожная внутрикоронарная доставка без окклюзии сосуда баллонным катетером) с использованием стандартных проводниковых или диагностических катетеров 5F или 6F (Jaski et al., 2009, *J Card Fail.* 15: 171-181).

[221] Субъекты, которые подходят для лечения с применением композиций и способов по настоящему изобретению, включают индивидуумов (*например*, субъектов-млекопитающих, таких как люди, приматы, отличные от человека, домашние млекопитающие, экспериментальные субъекты-млекопитающие, отличные от человека, такие как мыши, крысы и т. д.) с сердечным состоянием.

[222] В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV или геномы векторов на их основе по настоящему изобретению можно применять для лечения

субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор можно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении сердечно-сосудистого заболевания. В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV или геномы векторов на их основе вводят субъекту для лечения кардиомиопатии. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор вводят системно. В других вариантах осуществления вирусный вектор доставляется путем прямого введения в ткань сердца.

[223] Вирионы гAAV или геномы векторов на их основе можно вводить различными путями, в том числе без ограничения путем прямой инъекции в сердце или катетеризации сердца. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическую композицию, содержащую вирион гAAV, кодирующий MYBPC3, вводят путем внутрисердечной катетерной доставки посредством ретроградной инфузии через коронарный синус (RCSI). В качестве альтернативы вирусный вектор можно вводить системно, как, например, путем внутривенной инфузии. При использовании прямой инъекции ее можно выполнять путем хирургической операции на открытом сердце либо путем минимально инвазивной хирургической операции. В некоторых случаях вирусный вектор доставляется в перикардальное пространство путем инъекции или инфузии.

[224] Вирусный вектор, вводимый субъекту, можно отследить различными способами. Например, рекомбинантные вирусы, помеченные маркером или экспрессирующие его (такой как зеленый флуоресцентный белок или бета-галактозидаза), могут быть легко выявлены. Рекомбинантные вирусы могут быть сконструированы таким образом, чтобы они вызывали экспрессию в клетке-мишени маркерного белка, такого как белок, экспрессируемый на поверхности, или флуоресцентный белок. В качестве альтернативы инфицирование клеток-мишеней рекомбинантными вирусами можно выявить по экспрессии ими клеточного маркера, который не экспрессируется у животного, используемого для тестирования (например, антигена, специфичного для человека, при инъекции клеток экспериментальному животному). Наличие и фенотип клеток-мишеней можно оценить с помощью флуоресцентной микроскопии (*например*, по зеленому флуоресцентному белку или бета-галактозидазе), с помощью иммуногистохимического анализа (*например*, с использованием антитела к антигену

человека), с помощью ELISA (с использованием антитела к антигену человека) или с помощью анализа методом RT-PCR с использованием праймеров и условий гибридизации, которые обуславливают специфичность амплификации в отношении РНК, указывающей на сердечный фенотип.

[225] Все патенты, патентные публикации и другие публикации, упомянутые и идентифицированные в настоящем описании, по отдельности и явным образом включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Конструкция генома вектора для крупных грузов

[226] Цель этого исследования заключалась в оценивании вектора, имеющего делеции в некодирующих частях вектора, по сравнению с исходным вектором. Было неожиданно продемонстрировано, что делеция в некодирующих областях приводит к увеличению эффективности вектора.

[227] Для типичных геномов векторов на основе AAV с двумя интактными фланкирующими последовательностями ITR (каждая размером ~ 130 п. о.), промотором, интроном, WPRE и сигналом полиаденилирования, а также стандартными *цис*-регуляторными последовательностями для оптимальной экспрессии трансгена требуется приблизительно 1,8-2,0 т. п. о. некодирующей последовательности ДНК. Трансгены размером приблизительно 3,0 т. п. о. или больше, такие как трансген MYBPC3 размером 3,8 т. п. о., приводят к тому, что геном вектора превышает размер 5,0 т. п. о. Например, Mearini et al., *Nat Commun* 5:5515 (2014) сообщают о векторе на основе AAV, кодирующем MYBPC3, с размером генома вектора 5,4 т. п. о. Без последовательностей ITR это составляет приблизительно 5,2 т. п. о.

[228] Была создана репортерная система для тестирования того, будет ли вектор на основе AAV допускать наличие укороченных некодирующих областей. Традиционный вектор на основе AAV, имеющий промотор CAG, интрон, WPRE и стандартную поли(А)-последовательность, модифицировали с удалением WPRE (589 п. о.) и укорочением поли(А)-последовательности (удаление 170 п. о.) (фиг. 1А). Экспрессия репортера GFP, клонированного в сайт множественного

клонирования (MCS), сохранялась, но незначительно снижалась в случае делеции или укорочения этих элементов векторов (**фиг. 1B**). Вектор дополнительно усекали путем делеции интрона и части последовательности с 3'-стороны от 5'-ITR (**фиг. 1C**). Конечный геном вектора имел размер приблизительно 1,1 т. п. о. (0,8 т. п. о. без ITR).

Пример 2. Экспрессия трансгена MYBPC3 в индуцированных кардиомиоцитах *in vitro*

[229] Цель этого исследования заключалась в получении улучшенного тканеспецифического промотора для экспрессии терапевтического продукта гена в индуцированных кардиомиоцитах *in vitro* с использованием векторной системы на основе AAV. Обеспечивали дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (iPSC) в кардиомиоциты с применением мезодермальной индукции, кардиальной специализации и метаболической селекции, как описано ранее (Tohyama et al. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):127-37; Lian et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(27):E1848-57; Burridge PW, Holmstrom A, Wu JC. *Curr Protoc Hum Genet*. 2015;87:21.3.1-15.) Процедуры вирусной трансдукции iPSC-СМ проводили с помощью AAV6 при указанных значениях множественности инфицирования.

[230] Кассеты экспрессии генов, изображенные на **фиг. 2A**, были сконструированы для векторной системы на основе AAV для лечения кардиомиопатии. Вектор на основе AAV, в основе которого лежит вектор, изображенный на **фиг. 1C**, содержал несколько *цис*-регуляторных элементов, в том числе два инвертированных концевых повтора (ITR, каждый размером 260 п. о.), сигнал полиаденилирования (A, 49 п. о.) и полноразмерный (SEQ ID NO: 1) или модифицированный промотор гена сердечного тропонина Т (TNNT2) (SEQ ID NO: 2—4). WPRE не был включен, и как поли(A)-сигнал, так и последовательность с 3'-стороны от 5'-ITR были укорочены. Модифицированные промоторы TNNT2 содержали делеции размером 100-200 п. о. на 5'-конце (вышерасположенном) промотора TNNT2 дикого типа. Миозинсвязывающий белок С человека (MYBPC3, SEQ ID NO: 86) с длиной полинуклеотидной последовательности 3,825 т. п. о. тестировали в качестве терапевтического продукта гена в кардиомиоцитах, полученных из iPSC.

[231] Чтобы определить, могут ли промоторы TNNT2 дикого типа или модифицированные промоторы TNNT2 индуцировать выявляемую экспрессию белка MYBPC3, кардиомиоциты, полученные из *MYBPC3*^{-/-} iPSC, трансдуцировали частицами AAV6 при MOI 6×10^4 . Клетки анализировали в отношении экспрессии белка MYBPC3 с помощью иммунофлуоресценции или вестерн-блоттинга через 5-15 дней после инфицирования.

[232] На **фиг. 2B** показано, что вектор на основе AAV, содержащий промотор TNNT2 дикого типа (SEQ ID NO: 1), управляет экспрессией белка MYBPC3 в саркомерах кардиомиоцитов, полученных из *MYBPC3*^{-/-} iPSC.

[233] На **фиг. 3A – фиг. 3C** показано, что вектор на основе AAV, содержащий модифицированный промотор TNNT2 размером 400 п. о. (SEQ ID NO: 3), управляет экспрессией белка MYBPC3 на более высоком уровне, чем промотор TNNT2 дикого типа размером 600 п. о. (SEQ ID NO: 1) либо модифицированный промотор TNNT2 размером 500 п. о. (SEQ ID NO: 2), в трансдуцированных кардиомиоцитах, полученных из *MYBPC3*^{-/-} iPSC. В отличие от этого, кардиомиоциты, полученные из *MYBPC3*^{-/-} iPSC, трансфицированные плазмидой (а не трансдуцированные вирусом), кодирующей MYBPC3 под контролем промотора TNNT2 дикого типа размером 600 п. о. (SEQ ID NO: 1) либо модифицированного промотора TNNT2 размером 400 п. о. (SEQ ID NO: 3), демонстрировали сходную экспрессию белка MYBPC3.

Пример 3. Модель тяжелой гипертрофической кардиомиопатии на *Mybpc3*^{-/-} мышцах

[234] Гомозиготные мыши с нокаутом *Mybpc3* (КО) были получены в генетическом окружении C57BL/6 путем делеции первого и второго экзонов с помощью CRISPR-Cas9 с парными gRNA (**фиг. 4A**). У мышей с КО проявлялись тяжелые дефициты сердечной функции (**фиг. 4C** и **фиг. 4D**) и выраженная гипертрофия сердца (**фиг. 4E-4G**) в возрасте двух недель, несмотря на нормальные менделевские соотношения и массу тела, сравнимую с массой тела однопометных животных дикого типа (**фиг. 4B**). В этой модели гипертрофия сердца была более тяжелой, чем в других моделях (Schlossarek et al. *Basic Res. Cardiol.* 107:1-13 (2012)). У мышей с КО авторов настоящего изобретения проявлялась тяжелая HCM с ранним началом у молодых особей (мышей в возрасте двух недель), что моделирует HCM с

началом в детском возрасте у людей, а также HCM на поздней стадии у взрослых. См. Lekanne Deprez et al., *J Med Genet* 43:829-832 (2006); Xin et al., *Am J Med Genet Part A* 143A:2662-2667 (2007); Zahka et al., *Heart* 94:1326-1330 (2008); Marziliano et al., *Neonatology* 102:254-258 (2012); Wessels et al., *Eur J Hum Genet* 23:922-928 (2015).

Пример 4. Экспрессия трансгена MYBPC3 в ткани сердца *in vivo*

[235] Цель этого исследования заключалась в изучении экспрессии терапевтического белка *in vivo* с использованием векторной системы на основе AAV, содержащей модифицированный кардиоспецифический промотор.

[236] Взрослым мышам проводили ретроорбитальную инъекцию рекомбинантного вируса AAV9, содержащего промотор TNNT2 дикого типа размером 600 п. о. (SEQ ID NO: 1) либо модифицированный промотор TNNT2 размером 400 п. о. (SEQ ID NO: 3), функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим MYBPC3. Образцы тканей из сердца, скелетной мышцы (передней большеберцовой мышцы), печени и головного мозга в целом собирали через 2 недели после инфицирования. Из всех тканей экстрагировали РНК, из нее синтезировали кДНК и анализировали с помощью qRT-PCR с использованием праймеров, специфичных к MYBPC3 человека.

[237] Как показано на **фиг. 5**, мыши, которым инъецировали вектор на основе AAV9, содержащий промотор дикого типа либо модифицированный промотор TNNT2, демонстрировали высокие уровни мРНК MYBPC3 в ткани сердца по сравнению с тканью скелета, головного мозга или печени. Модифицированный промотор TNNT2 размером 400 п. о. демонстрировал увеличенную экспрессию мРНК MYBPC3 в ткани сердца по сравнению с промотором TNNT2 дикого типа размером 600 п. о.

[238] Как показано на **фиг. 6А-6В**, взрослым мышам путем инъекции в хвостовую вену внутривенно вводили дозу вектора на основе AAV9, содержащего кассету с модифицированным промотором TNNT2 размером 400 п. о. Образцы тканей из сердца и печени собирали через 4 недели после инъекции. Абсолютное количественное определение вирусных геномов на микрограмм геномной ДНК проводили путем оценки с помощью qPCR с использованием линейаризованных стандартов. Из всех тканей экстрагировали РНК, из нее синтезировали кДНК и

анализировали с помощью qRT-PCR с использованием праймеров, специфичных к *МУВРС3* человека. Неожиданно промотор TNNT2 размером 400 п. о. сохранял высокую селективность в отношении сердца: несмотря на то, что в печени было выявлено в 100 раз больше геномов векторов, чем в сердце, через 4 недели после инъекции у взрослых животных, получавших дозу (фиг. 6А, логарифмический масштаб), экспрессия трансгена в печени составляла менее 1/10000 от экспрессии в сердце (фиг. 6В, логарифмический масштаб).

[239] В совокупности эти результаты указывают на то, что промотор TNNT2 дикого типа с делецией размером 200 п. о., *т. е.* модифицированный промотор TNNT2 размером 400 п. о. (SEQ ID NO: 3), эффективно управляет экспрессией белка МУВРС3 в кардиомиоцитах с высокой селективностью, несмотря на делецию значительной части промоторной последовательности.

Пример 5. Спасение сердечной функции у *Mybpc3*-нулевых мышей

[240] Этот пример демонстрирует функциональное спасение при потере функции *Mybpc3* у мышей с использованием вектора, предназначенного для крупных грузов, описанного в примере 1, и модифицированного промотора hTNNT2 размером 400 п. о., описанного в примерах 2 и 3.

[241] Промотор hTNNT2 размером 400 п. о. и ген *Mybpc3* мыши клонировали в вектор, показанный на фиг. 1С. Этот вектор был упакован с использованием капсида AAV9 для получения тестируемого вектора.

[242] В первом эксперименте гомозиготным *Mybpc3*^{-/-} мышам в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию 1E14 vg·кг⁻¹ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS. Ткань сердца собирали спустя две недели (в возрасте четырех недель) вместе с тканью однопометных животных дикого типа. Экспериментальный вектор достигал уровней экспрессии белка МУВРС3, соответствующих дикому типу, у *Mybpc3*^{-/-} мышей через две недели после инъекции (фиг. 7). Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что тестируемый вектор был способен обеспечивать экспрессию МУВРС3 на физиологических уровнях у молодых животных при дозе, составляющей всего 1E14 vg·кг⁻¹.

[243] Во втором эксперименте первый эксперимент повторяли при более низкой дозе $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$. Гомозиготным *Mybpc3*^{-/-} мышам в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS. Уровни экспрессии сердечного белка MYBPC3, соответствующие дикому типу, выявляли с помощью ELISA у *Mybpc3*^{-/-} мышей через две и шесть недель после инъекции (фиг. 8). Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что тестируемый вектор был способен обеспечивать экспрессию MYBPC3 на физиологических уровнях у молодых животных при дозе, составляющей всего $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$

[244] В третьем эксперименте сердечную функцию оценивали с применением анализов, имеющих отношение к гипертрофической кардиомиопатии. Гипертрофическая кардиомиопатия физиологически проявляется как (1) увеличение размера сердца, измеряемое как регистрируемое соотношение массы левого желудочка и общей массы тела (LVM/BW) в $\text{мг}\cdot\text{г}^{-1}$; и (2) как фракция укорочения (FAS), измеряемая с помощью эхокардиографии.

[245] Гомозиготным *Mybpc3*^{-/-} мышам в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ тестируемого вектора, кодирующего *Mybpc3*, или среды-носителя HBSS. Дозозависимое спасение сердечной функции наблюдалось при всех тестируемых дозах ($1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$). Соотношение LVM/BM снижалось по сравнению с контролем в виде среды-носителя при всех тестируемых дозах через шесть недель после инъекции (фиг. 9A). FAS (выраженная в виде % процентного изменения внутренних размеров LV между систолой и диастолой, фиг. 9B) и фракция выброса (фиг. 9C) увеличивались по сравнению с контролем в виде среды-носителя при всех тестируемых дозах через шесть недель после инъекции. Через 31 неделю после инъекции наблюдались еще более существенные улучшения в LVM/BM (фиг. 9D), FAS (фиг. 9E), и EF (фиг. 9F). Как согласуется с одинаковыми уровнями экспрессии белка MYBPC3, наблюдаемыми при дозах $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ (см. фиг. 8), у животных, обработанных с помощью $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ или $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, проявляются сходные улучшения показателей гипертрофии, FAS или EF. Даже при дозе, составляющей лишь $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$, все из показателей гипертрофии, FAS и EF улучшаются по сравнению с контролем в виде среды-носителя.

[246] Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что тестируемый вектор был способен обеспечивать спасение сердечной функции у молодых животных при дозе, составляющей всего $1E13$ vg·кг⁻¹.

[247] Спасение функции у молодых мышей с симптомами в случае гипертрофической кардиомиопатии является более сложной задачей, чем предупреждение снижения функции у детенышей, поскольку гипертрофическая кардиомиопатия является прогрессирующим нарушением. У более старших животных проявляется более тяжелое заболевание, чем у более молодых животных. Насколько известно авторам настоящего изобретения, спасение при потере функции MYBPC3 у молодых животных с симптомами никогда ранее не демонстрировалось с помощью AAV. Модель авторов настоящего изобретения также представляет собой модель полной потери функции, вызванной делецией гена *Mybpc3*, а не частичной потери функции вследствие мутации.

[248] Авторы настоящего изобретения сравнили свои результаты с теми, о которых сообщается в Mearini et al., *Nat. Commun.* 5:5515 (2014), где использовали кассету экспрессии размером 5,4 т. о., кодирующую *Mybpc3*, у мышей с однонуклеотидным полиморфизмом в эндогенном гене *Mybpc3*. Mearini и соавт. сообщают о предупреждении высокого LVM/BW в возрасте двух недель у мышей, получавших в качестве новорожденных (а не молодых особей с симптомами) инъекции очень высоких доз ($1E12$ vg и $3E12$ vg, что соответствует $7E14$ vg·кг⁻¹ и $2E15$ vg·кг⁻¹, исходя из средней массы новорожденного 1,5 г) вектора на основе AAV9, кодирующего тот же ген *Mybpc3*. Mearini и соавт. использовали промотор hTNNT2 размером 550 п. о., а не модифицированный промотор hTNNT2 размером 400 п. о. по настоящему изобретению. Вектор Mearini и соавт. не обеспечивает значительное предупреждение снижения FAS даже при $2E15$ vg·кг⁻¹. В отличие от этого, вектор по настоящему изобретению демонстрирует улучшение физиологических параметров у молодых животных (не только новорожденных) при дозах, составляющих по меньшей мере всего от $1E13$ vg·кг⁻¹ до $1E14$ vg·кг⁻¹.

[249] Модификации вектора и промотора приводят к существенному и неожиданному увеличению эффективности вектора.

Пример 6. Непосредственное сравнение кассеты размером 5,4 т. п. о. и кассеты размером 4,7 т. п. о.

[250] В этом примере кассету размером 5,4 т. п. о., кодирующую ген *Mybpc3*, непосредственно сравнивают с кассетой размером 4,7 т. п. о., кодирующей ген *Mybpc3*, у зрелых (в возрасте 2,5 месяца) гомозиготных мышей с заболеванием на поздней стадии.

[251] Гомозиготным *Mybpc3^{-/-}* мышам проводили ретроорбитальную инъекцию $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ или $1E14 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV9, кодирующего *Mybpc3* в окружении кассет размером 5,4 т. п. о. или 4,7 т. п. о. (фиг. 10A), или инъецировали контроль в виде среды-носителя HBSS. При введении дозы даже на этой поздней стадии снижения сердечной функции кассета размером 4,7 т. п. о. обеспечивала значительное улучшение сердечной функции согласно данным о фракции выброса (EF) (фиг. 10B) с явным восстановлением функции выше исходного уровня до введения дозы (фиг. 10C) в отличие от животных, обработанных средой-носителем (Veh) или кассетой размером 5,4 т. п. о. Кроме того, по сравнению с кассетой размером 5,4 т. п. о. кассета размером 4,7 т. п. о. также была способна обеспечивать значительное снижение гипертрофии, на что указывает LVM/BM, через восемнадцать недель после инъекции (фиг. 10D).

[252] Этот пример демонстрирует функциональное спасение при потере функции *Mybpc3* у мышей с использованием модификаций остова вектора и промотора, описанных в примерах 1-3.

[253] Этот пример также демонстрирует, что в сложной модели заболевания — у взрослых гомозиготных *Mybpc3^{-/-}* мышей — вектор размером 5,4 т. п. о. (SEQ ID NO: 201) в низкой дозе не способен вызвать какое-либо физиологическое улучшение; тогда как вектор размером 4,7 т. п. о. согласно настоящему изобретению вызывает статистически значимое улучшение физиологических параметров, связанных с кардиомиопатией, при дозах, составляющих всего $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$.

Пример 7. Более высокая эффективность при использовании улучшенного капсида AAV, кодирующего MYBPC3

[254] Этот пример демонстрирует, как улучшенная эффективность вектора с крупным грузом (пример 1) и модифицированного промотора (примеры 2 и 3),

определенная на основании спасения *Mybpc3^{-/-}* мышей (пример 5), может быть дополнительно улучшена посредством использования сконструированного капсида AAV.

[255] Вариант капсида AAV9 CR9-10 демонстрировал значительно более высокую трансдукцию клеток сердца при системной доставке у взрослых мышей, чем AAV9, с кассетой, кодирующей GFP, согласно определению с помощью ELISA ($p < 0,05$, однофакторный ANOVA; критерий множественных сравнений Даннета) (фиг. 11A).

[256] Во втором эксперименте кассету экспрессии, кодирующую ген *Mybpc3* мыши, упаковывали в AAV9 либо в CR9-10, и сравнивали эффективность спасения сердечной функции у *Mybpc3^{-/-}* мышей. Гомозиготным *Mybpc3^{-/-}* мышам в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $3E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ вектора на основе AAV9, вектора CR9-10 или контроля в виде среды-носителя HBSS. Все тестируемые препараты значительно улучшали сердечную функцию согласно данным о фракции выброса (EF) (фиг. 11B) с явным восстановлением функции выше исходного уровня до введения дозы (ΔEF) (фиг. 11C). Как согласуется с улучшением трансдукции клеток сердца, CR9-10 приводил к более существенному улучшению EF, чем AAV9.

Пример 8. Исследование сконструированных вариантов капсида AAV на приматах, отличных от человека

[257] Биораспределение векторов AAV со сконструированными капсидами (описанными в предварительной заявке на патент США № 63/012703, которая включена в данный документ во всей своей полноте) оценивали у самцов яванских макаков (*Macaca fascicularis*) после внутривенной доставки.

[258] Векторы на основе AAV, полученные с четырнадцатью различными капсидами, в том числе AAV9, объединяли и инъекцировали NHP в дозе $1E13 \text{ vg}\cdot\text{кг}^{-1}$ ($n = 3$). Вирусную ДНК экстрагировали из левого желудочка и печени через месяц после системной доставки. Как согласуется с результатами у мышей, CR9-10 демонстрировал увеличенную трансдукцию клеток сердца по сравнению с AAV9 (фиг. 12A). Кроме того, многие варианты приводили к снижению вирусной нагрузки

на печень по сравнению с AAV9 (фиг. 12B), обеспечивая улучшение соотношения трансдукции клеток левого желудочка и инфицирования печени (фиг. 12C).

Пример 10. Спасение сердечной функции с помощью гена MYBPC3 человека у *Mybpc3*-нулевых мышей

[259] Этот пример демонстрирует способность гена *MYBPC3* человека обеспечивать спасение *Mybpc3*^{-/-} мышей.

[260] Гомозиготным *Mybpc3*^{-/-} мышам в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию AAV9, кодирующего ген *Mybpc3* мыши (m*Mybpc3*) (при 1E14 vg·кг⁻¹), AAV9, кодирующего ген *MYBPC3* человека (h*MYBPC3*) (при 1E14 vg·кг⁻¹), или среды-носителя HBSS. Размер и функцию сердца отслеживали посредством эхокардиографии в течение вплоть до восьми месяцев после инъекции. Результаты указывают на то, что AAV9-опосредованное замещение сердечного *MYBPC3* на m*Mybpc3* и h*MYBPC3* у *Mybpc3*^{-/-} мышей приводило к восстановлению размера и функции сердца. Фракция выброса (EF) значительно улучшалась при использовании ортологов *MYBPC3* как человека, так и мыши, при этом m*Mybpc3* обеспечивал достижение более существенного улучшения EF по сравнению с h*MYBPC3* (фиг. 13A). Важно отметить, что h*MYBPC3* обладал точно такой же эффективностью, как и m*Mybpc3*, в снижении гипертрофии сердца с течением времени, о чем свидетельствует масса левого желудочка, нормализованная по массе тела (LVM/BW) (фиг. 13B). Это было дополнительно подтверждено сопоставимым уменьшением толщины задней стенки левого желудочка во время диастолы (LVPW;d) (фиг. 13C). Важно отметить, что все улучшения демонстрировали надежную стабильность в течение до 8 месяцев после инъекции.

[261] Во втором исследовании эффективность h*MYBPC3* оценивали в диапазоне доз вируса. Гомозиготным *Mybpc3*^{-/-} мышам в возрасте двух недель проводили ретроорбитальную инъекцию 1E13 vg·кг⁻¹, 1E14 vg·кг⁻¹ и 3E14 vg·кг⁻¹ тестируемого вектора, кодирующего ген *MYBPC3* человека, или среды-носителя HBSS. Дозозависимое улучшение сердечной функции наблюдалось при всех тестируемых дозах (1E13 vg·кг⁻¹, 1E14 vg·кг⁻¹ и 3E14 vg·кг⁻¹) через четырнадцать недель после инъекции, на что указывает EF (фиг. 14A), при значительном улучшении по сравнению с исходным уровнем до введения дозы для видов

обработки при $1E14$ vg·кг-1 и $3E14$ vg·кг-1 (фиг. 14B). Для видов обработки при $1E14$ vg·кг-1 и $3E14$ vg·кг-1 также наблюдалось значительное снижение гипертрофии сердца согласно данным о LVM/BW (фиг. 14C). Таким образом, авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что тестируемый вектор hMYBPC3 был способен обеспечивать сохранение сердечной функции у взрослых животных при дозе, составляющей всего $1E13$ vg·кг-1.

Пример 11. Лечение гипертрофической кардиомиопатии (HCM)

[262] Кардиомиопатия является главной причиной внезапной остановки сердца у детей младше 18 лет. Гипертрофическая кардиомиопатия (HCM) поражает 0,5 миллиона американцев и потенциально приводит к сердечной недостаточности или внезапной смерти. Мутации потери функции в *миозинсвязывающем белке C3* — *MYBPC3* — являются наиболее распространенной генетической причиной HCM. Большинство мутаций *MYBPC3*, вызывающих HCM, приводят к усечениям посредством нонсенс-мутаций, мутаций сдвига рамки считывания или мутаций сайтов сплайсинга. Патофизиологические процессы в саркомерах у большинства пациентов с HCM с мутациями *MYBPC3* по-видимому, обусловлены гаплонедостаточностью, поскольку общее количество белка MYBPC3, включенного в состав саркомеров, падает значительно ниже нормы. Снижение уровней MYBPC3 в саркомерах приводит к снижению ингибирования миозина, и при этом большее количество миозиновых головок вступает в контакт с актиновым филаментом, что приводит к гиперсократимости.

[263] Наиболее очевидным путем лечения гаплонедостаточности является восстановление образования недостающего продукта гена; в данном случае MYBPC3 дикого типа. Таким образом, авторы настоящего изобретения успешно сконструировали вектор на основе AAV (TN-201) с превосходными свойствами для селективного восстановления образования MYBPC3 в кардиомиоцитах при системной доставке. Важно отметить, что авторы настоящего изобретения впервые продемонстрировали с помощью AAV способность как суррогатной молекулы мышцы, так и TN-201 устранять сердечную дисфункцию и гипертрофию в симптоматической мышечной модели заболевания.

[264] Исследования эффективности с подбором оптимальной дозы демонстрировали восстановление уровней белка MYBPC3 дикого типа и достижение предельного улучшения сердечной функции при клинически значимой дозе 3E13 vg/kg. Кроме того, пилотные исследования безопасности на взрослых мышах и детенышах мышей, которым инъецировали >10X эффективную дозу, не демонстрировали клинических наблюдений, изменений сердечной функции и гистопатологических данных. Важно отметить, что авторы настоящего изобретения определили, что TN-201, полученный с использованием высокомасштабируемой платформы Sf9, приводит к столь же сильной эффективности в модели заболевания *Mybpc3^{-/-}*. Наконец, авторы настоящего изобретения установили, что наблюдаемая ими эффективность является достаточно значимой для обеспечения стабильного благоприятного эффекта в течение вплоть до 8 месяцев после инъекции, а также для устранения сердечной дисфункции даже при гомозиготном заболевании на поздней стадии.

Пример 12. Клинические исследования

[265] Фармацевтическую композицию, содержащую вирионы rAAV, кодирующие MYBPC3, описанные в данном документе, вводят внутривенно или ретроградно через коронарный синус (RCSI). Функциональная эффективность определяется по оценкам функционального состояния сердца (*например*, согласно функциональной классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации NYHA; кардиопульмональному нагрузочному тесту CPET), опросникам качества жизни (*например*, по клиническому баллу качества жизни согласно Канзасскому опроснику для больных с кардиомиопатией KCCQ-CSS), данным визуализации сердца (*например*, эхокардиографии), сердечным биомаркерам (*например*, тропонину и NT-про-BNP), сердечному ритму и иммунологическим оценкам, оценке функционального состояния сердца (*например*, согласно Педиатрическому межведомственному реестру устройств для механической поддержки кровообращения PEDIMACS; классификации Росса) и/или значительным нежелательным сердечно-сосудистым явлениям (MACE) (общая смерть, трансплантация сердца, начало приема инотропных препаратов, начало искусственной вентиляции легких или механическая поддержка кровообращения). Клинические исследования могут включать мониторинг безопасности и длительной

эффективности (*например*, нежелательных явлений, тяжелых нежелательных явлений, электрокардиограммы, уровней ферментов сердца, биомаркеров, функционального состояния, функции/массы левого желудочка (LV), качества жизни, биохимического анализа сыворотки крови, функциональных проб печени) ежегодно в течение вплоть до 10 лет.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный промотор гена сердечного тропонина Т, содержащий полинуклеотид, имеющий от 300 п. о. до 500 п. о.

2. Промотор по п. 1, где полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1—85.

3. Промотор по п. 1, где полинуклеотид содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 3.

4. Промотор по п. 1, где полинуклеотид обладает по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью последовательности с геномной полинуклеотидной последовательностью:

(i) выше сайта начала транскрипции гена тропонина Т с включением этого сайта или

(ii) от -450 п. о. до +1 п. о., от -350 п. о. до +1 п. о., от -250 п. о. до +1 п. о., от -450 п. о. до +50 п. о., от -350 п. о. до +50 п. о. или от -250 п. о. до +50 п. о. относительно сайта начала транскрипции гена тропонина Т;

где ген тропонина Т необязательно представляет собой ген тропонина Т человека.

5. Промотор по любому из пп. 1—4, где промотор представляет собой:

(i) промотор, специфичный для мышц; и/или

(ii) промотор, специфичный для клеток сердца; и/или

(iii) промотор, специфичный для кардиомиоцитов.

6. Промотор по любому из пп. 1—5, где промотор обладает такой же специфичностью для типа клеток, что и:

(i) нативный промотор гена тропонина Т размером приблизительно 600 п. о. и/или

(ii) эталонный промотор, содержащий SEQ ID NO: 1.

7. Промотор по любому из пп. 1—6, где промотор обеспечивает экспрессию продукта гена, функционально связанного с ним, на уровне, на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30% более высоком, чем нативный промотор гена тропонина Т; где нативный промотор гена тропонина Т необязательно представляет собой эталонный промотор, содержащий SEQ ID NO: 1.

8. Вектор, содержащий промотор по любому из пп. 1—7, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим продукт гена.

9. Вектор по п. 8, где вектор представляет собой вирусный вектор; где необязательно:

вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), и/или где вирусный вектор имеет предел упаковки, составляющий не более чем приблизительно 5,5 т. о.;

где вектор на основе AAV необязательно представляет собой AAV9 или его вариант.

10. Вектор по п. 8 или п. 9, где продукт гена выбран из:

(i) белков MYBPC3, KCNH2, TRPM4, DSG2 и ATP2A2 или

(ii) белков CACNA1C, DMD, DMPK, EPG5, EVC, EVC2, FBN1, NF1, SCN5A, SOS1, NPR1, ERBB4, VIP и MYH7.

11. Вектор по любому из пп. 8—10, где продукт гена представляет собой Cas9, необязательно выбранный из SpCas9, St1Cas9 и SaCas9.

12. Вектор по любому из пп. 8—11, где вектор содержит полинуклеотид, кодирующий второй продукт гена; где второй продукт гена необязательно представляет собой функциональную РНК, необязательно микроРНК или направляющую РНК.

13. Выделенная клетка, содержащая промотор по любому из пп. 1—7.

14. Выделенная клетка по п. 13, где выделенная клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или выделенный кардиомиоцит.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по любому из пп. 8—12.

16. Композиция для клеточной терапии, содержащая клетку по п. 13 или п. 14.

17. Геном вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий полинуклеотид *MYBPC3*, кодирующий белок MYBPC3 или его функциональный вариант, и промотор, где промотор представляет собой модифицированный промотор гена сердечного тропонина Т по любому из пп. 1—7.

18. Геном вектора на основе гAAV по п. 17, где полинуклеотид *MYBPC3* содержит по меньшей мере приблизительно 3,5 т. о., содержит приблизительно 3,8 т. о., представляет собой полноразмерный MYBPC3 или представляет собой усеченный MYBPC3.

19. Геном вектора на основе гAAV по п. 17 или п. 18, где MYBPC3 представляет собой MYBPC3 человека.

20. Геном вектора на основе гAAV по любому из пп. 17—19, где вектор обеспечивает экспрессию MYBPC3 на приблизительно таком же, на по меньшей мере приблизительно 10% более высоком или на по меньшей мере приблизительно 20% более высоком уровне, чем эталонный вектор на основе AAV, содержащий нативный промотор гена тропонина Т размером приблизительно 600 п. о.

21. Геном вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий кассету экспрессии, содержащую в направлении от 5' к 3' 5'-сегмент, содержащий промотор; полинуклеотид, кодирующий продукт гена; и 3'-сегмент, содержащий поли(А)-сигнал, при этом кассета экспрессии необязательно фланкирована одним или обоими из 5'-инвертированного концевых повтора (ITR) и 3'-ITR,

где полинуклеотид, кодирующий продукт гена, содержит от 3 т. о. до 11 т. о., от 3 т. о. до 5 т. о., от 3,5 т. о. до 4,5 т. о. или от 3,7 т. о. до 4 т. о.; и

где:

а) 5'-сегмент и 3'-сегмент в совокупности содержат не более 0,8 т. п. о. или не более 0,9 т. п. о.;

b) 5'-ITR, 5'-сегмент, 3'-сегмент и 3'-ITR в совокупности содержат не более 1,2 т. п. о., не более 1,3 т. п. о.; и/или

с) геном вектора содержит не более 4,7 т. п. о., не более 4,8 т. п. о., не более 4,9 т. п. о., не более 5,0 т. п. о. или не более 5,2 т. п. о.

22. Геном вектора на основе гAAV по п. 21, где 5'-сегмент содержит не более 500 п. о. или не более 480 п. о., и/или где 3'-сегмент содержит не более 200 п. о. или не более 150 п. о.

23. Геном вектора на основе гAAV по п. 21 или п. 22, где полинуклеотид, кодирующий продукт гена, содержит от 3,7 т. п. о. до 3,9 т. п. о., необязательно 3,8 т. п. о.

24. Геном вектора на основе гAAV по любому из пп. 21—23, где продукт гена представляет собой MYBPC3 или его функциональный вариант; где необязательно

полинуклеотид, кодирующий MYBPC3, обладает по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 86, по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 86 или представляет собой SEQ ID NO: 86; и/или

MYBPC3 обладает по меньшей мере 90% идентичностью с полипептидной последовательностью под SEQ ID NO: 103, по меньшей мере 95% идентичностью с полипептидной последовательностью под SEQ ID NO: 103 или представляет собой полипептидную последовательность под SEQ ID NO: 103.

25. Геном вектора на основе гAAV по любому из пп. 21—24, где промотор представляет собой модифицированный промотор гена сердечного тропонина T по любому из пп. 1—8.

26. Геном вектора на основе гAAV по п. 25, где:

(i) промотор содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью, по меньшей мере 90% идентичностью или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 91; и/или

(ii) поли(A)-сигнал содержит последовательность, состоит по существу из последовательности или состоит из последовательности, которая обладает по

меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 92 или представляет собой ее;

(iii) 5'-сегмент обладает по меньшей мере 80% идентичностью, по меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 93 или представляет собой ее; и/или

(iv) 3'-сегмент обладает по меньшей мере 80% идентичностью, по меньшей мере 90% идентичностью, обладает по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 94 или представляет собой ее.

27. Геном вектора на основе гAAV по любому из пп. 21—26, где кассета экспрессии обладает по меньшей мере 80% идентичностью, по меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 95 или представляет собой ее; и/или где геном вектора на основе гAAV обладает по меньшей мере 80% идентичностью, по меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 102 или представляет собой ее.

28. Геном вектора на основе AAV по любому из пп. 21—27, где 5'-ITR содержит последовательность, которая обладает 95% идентичностью с SEQ ID NO: 96, и/или 3'-ITR содержит последовательность, которая обладает 95% идентичностью с SEQ ID NO: 97.

29. Вирион рекомбинантного AAV (гAAV), содержащий геном вектора на основе гAAV по любому из пп. 17—28 и капсидный белок AAV,

где необязательно вирион гAAV представляет собой вирион серотипа AAV9 или его вариант, и/или капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV9 или его вариант.

30. Способ обеспечения экспрессии белка MYBPC3 в клетке *in vitro* или *ex vivo*, включающий обеспечение трансдукции клетки вирионом гAAV по п. 29 или геномом вектора на основе гAAV по любому из пп. 17—28.

31. Способ по п. 30, где клетка представляет собой MYBPC3^{-/-} клетку.

32. Способ по п. 30 или п. 31, где клетка содержит инактивирующую мутацию в одной или обеих копиях эндогенного гена MYBPC3.

33. Вирион гAAV по п. 29 или геном вектора на основе гAAV по любому из пп. 17—28 для применения в качестве лекарственного препарата.

34. Вирион гAAV по п. 29 или геном вектора на основе гAAV по любому из пп. 17—28 для применения в способе лечения и/или предупреждения кардиомиопатии у субъекта; где кардиомиопатия необязательно представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию.

35. Вирион гAAV по п. 29 или геном вектора на основе гAAV по любому из пп. 17—28 для применения в способе лечения и/или предупреждения заболевания или нарушения, вызываемого мутацией MYBPC3, у субъекта.

36. Вирион гAAV или геном вектора на основе гAAV для применения по п. 34 или п. 35, где способ включает обеспечение экспрессии белка MYBPC3, и/или увеличение активности MYBPC3, и/или усиление сердечной функции в сердце субъекта.

37. Вирион гAAV или геном вектора на основе гAAV для применения по любому из пп. 33—36, где введение вириона гAAV или генома вектора на основе гAAV вызывает специфичную экспрессию MYBPC3 в сердце субъекта.

38. Вирион гAAV или геном вектора на основе гAAV для применения по любому из пп. 33—37, где введение вириона гAAV или генома вектора на основе гAAV вызывает низкую или невыявляемую экспрессию MYBPC3 в скелетной ткани, головном мозге и/или печени субъекта.

39. Вирион гAAV или геном вектора на основе гAAV для применения по любому из пп. 34—38, где субъект содержит мутацию в MYBPC3.

40. Вирион гAAV или геном вектора на основе гAAV для применения по любому из пп. 34—39, где способ включает:

(i) внутривенное введение субъекту вириона гAAV или генома вектора на основе гAAV;

(ii) внутрисердечное введение субъекту вириона гAAV или генома вектора на основе гAAV;

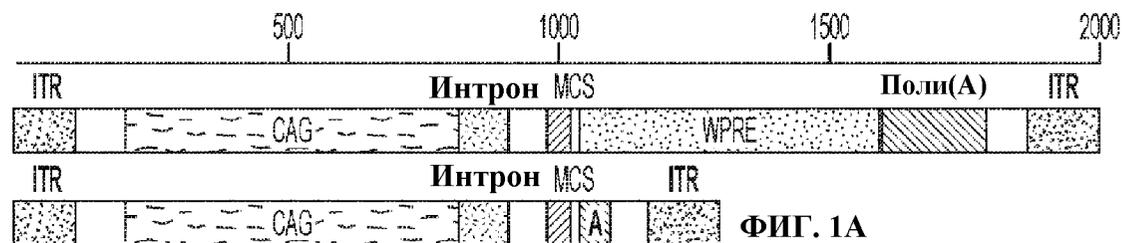
(iii) прямую инъекцию субъекту вириона rAAV или генома вектора на основе rAAV.

41. Вирион rAAV или геном вектора на основе rAAV для применения по любому из пп. 34—40, где субъект является млекопитающим; где субъект обязательно является человеком.

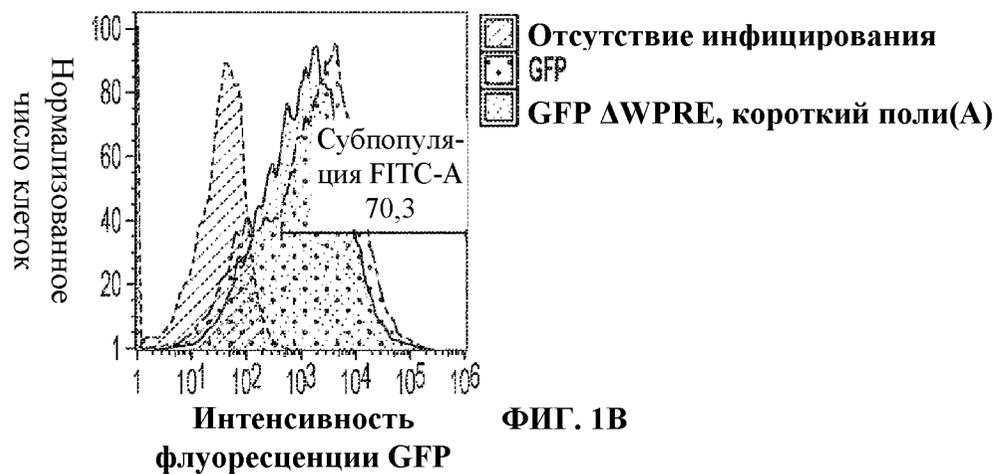
42. Вирион rAAV или геном вектора на основе rAAV для применения по любому из пп. 34—41, где субъект является молодой особью.

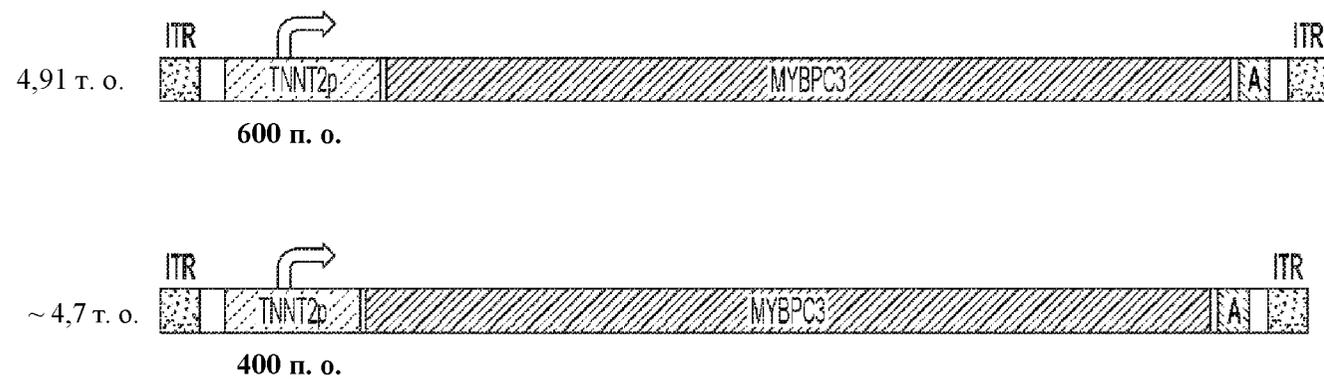
43. Вирион rAAV или геном вектора на основе rAAV для применения по любому из пп. 34—41, где субъект является взрослой особью.

44. Вирион rAAV или геном вектора на основе rAAV для применения по любому из пп. 33—43, где вирион rAAV или геном вектора на основе rAAV вводится в дозе, составляющей от приблизительно 10^{11} vg/кг до приблизительно 10^{14} vg/кг.

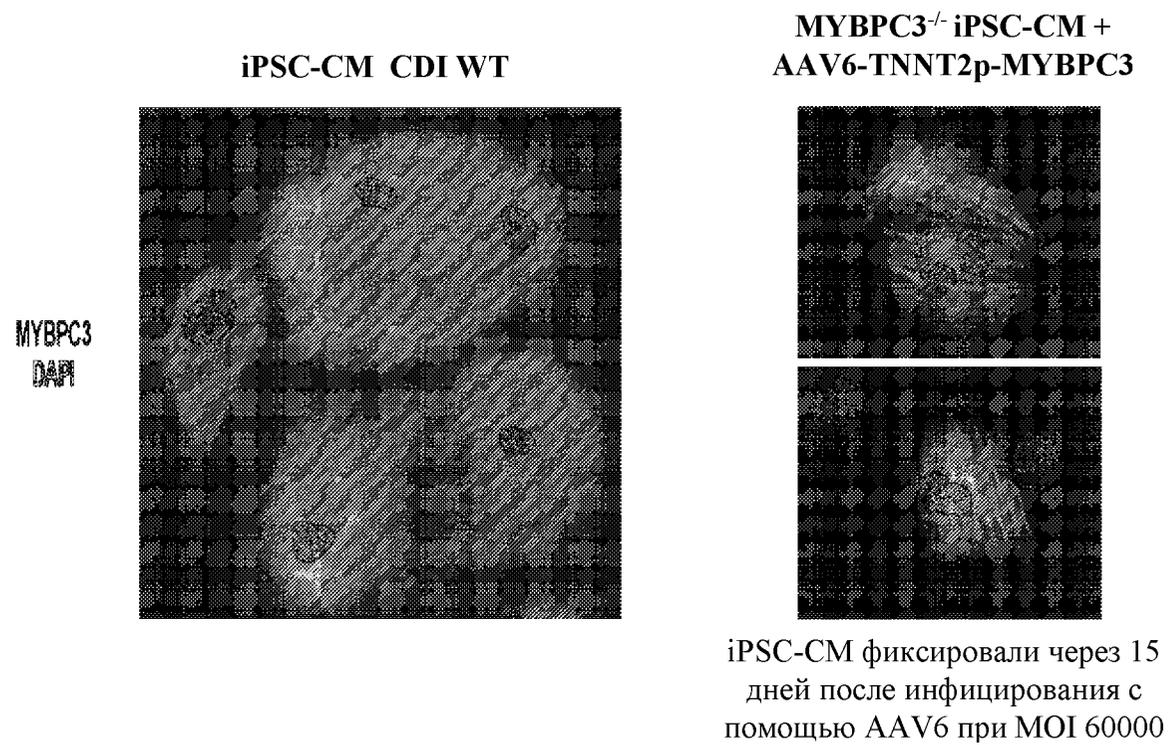


**Сердечные фибробласты
человека**



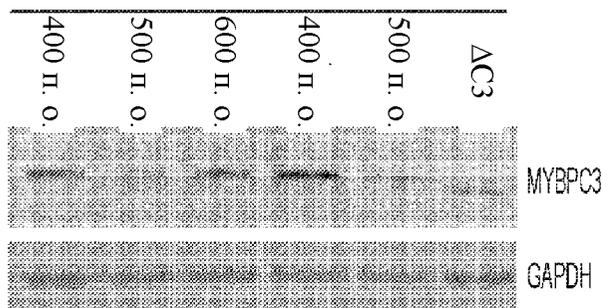


ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

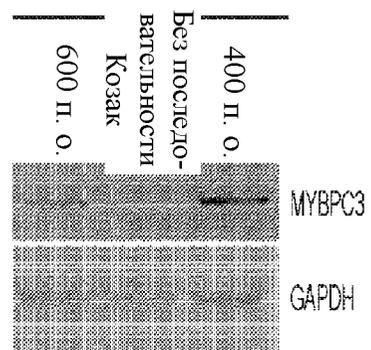
MYBPC3^{-/-} iPSC-CM
TNNT2p-MYBPC3



MYBPC3^{-/-} iPSC-CM собирали через
5 дней после инфицирования с
помощью AAV6 при MOI 60000

ФИГ. 3А

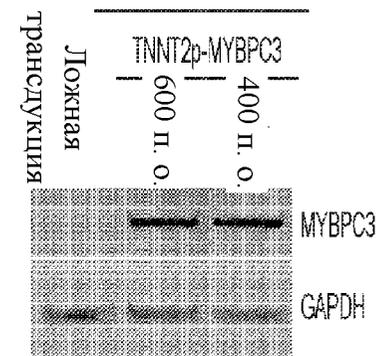
MYBPC3^{-/-} iPSC-CM
TNNT2p-MYBPC3



MYBPC3^{-/-} iPSC-CM собирали через 7 дней после инфицирования с помощью AAV6 при MOI 60000

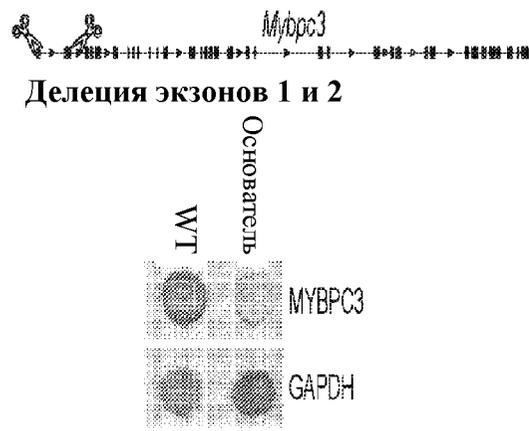
ФИГ. 3В

MYBPC3^{-/-} iPSC-CM

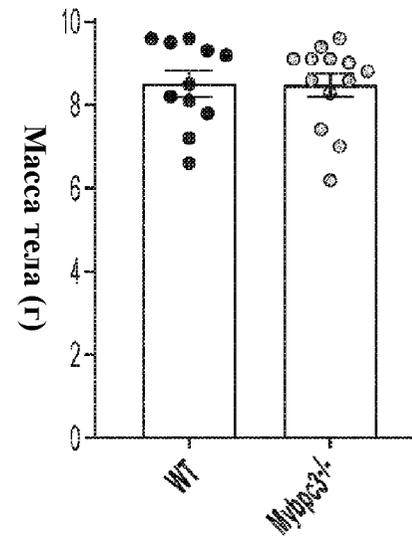


MYBPC3^{-/-} iPSC-CM собирали через 7 дней после трансфекции

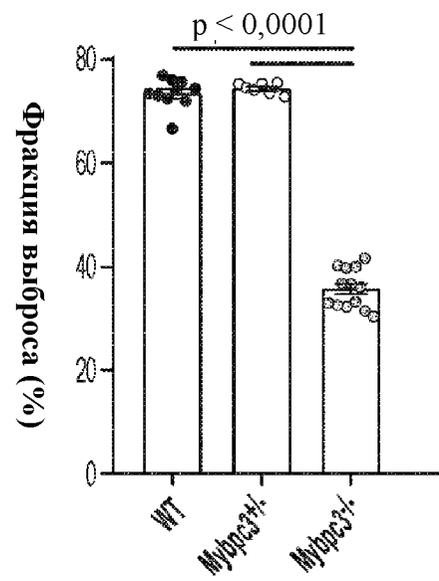
ФИГ. 3С



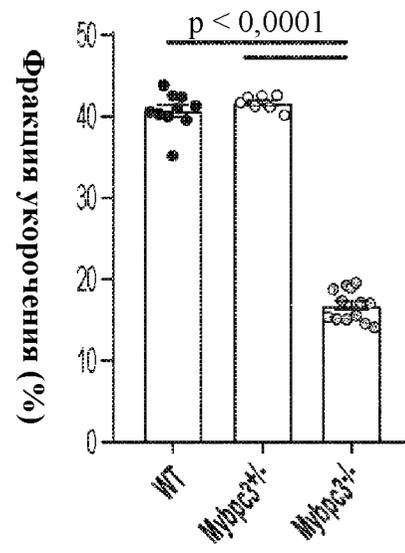
ФИГ. 4А



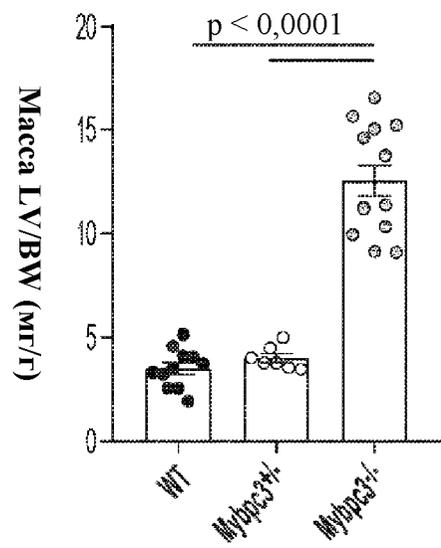
ФИГ. 4В



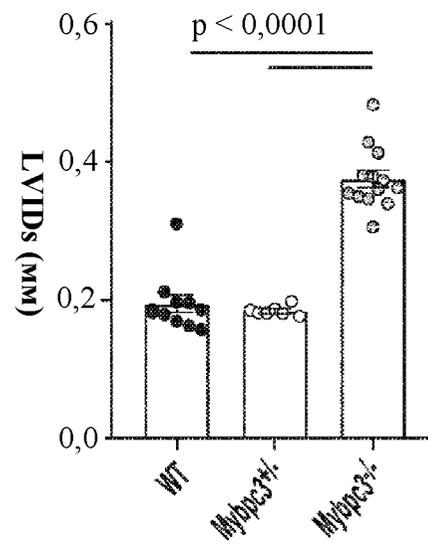
ФИГ. 4С



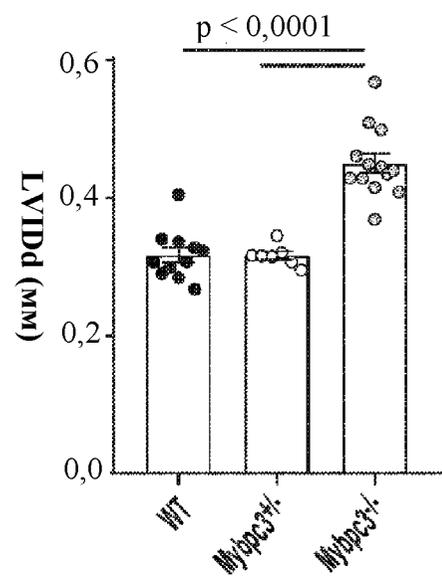
ФИГ. 4D



ФИГ. 4E

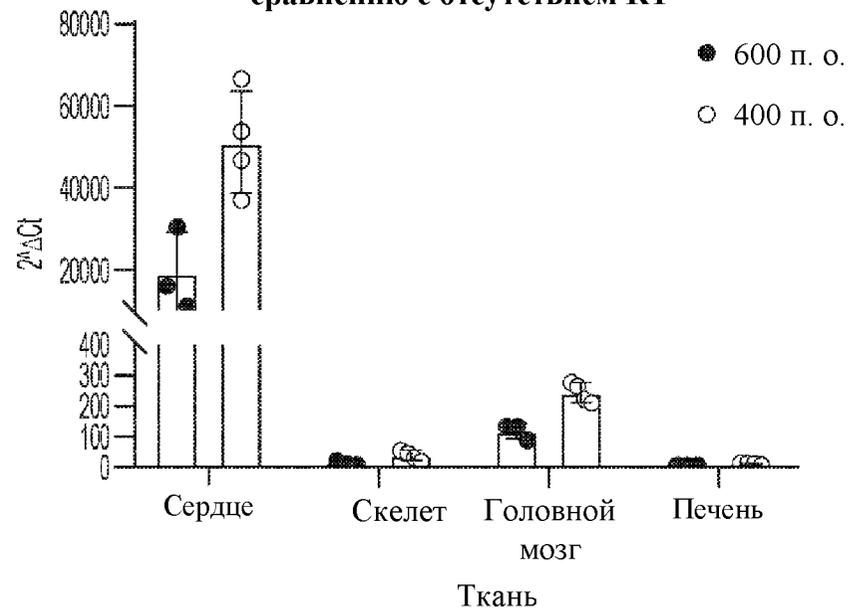


ФИГ. 4F

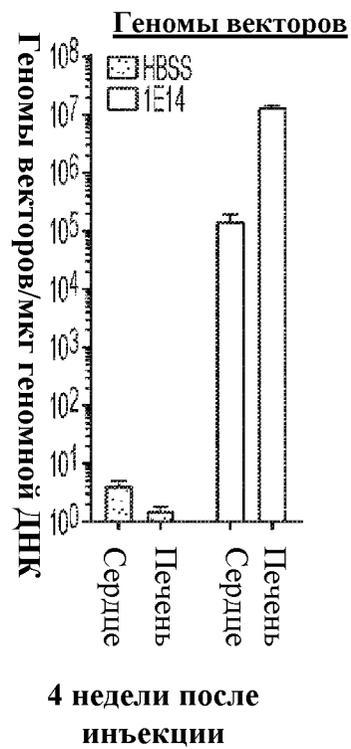


ФИГ. 4G

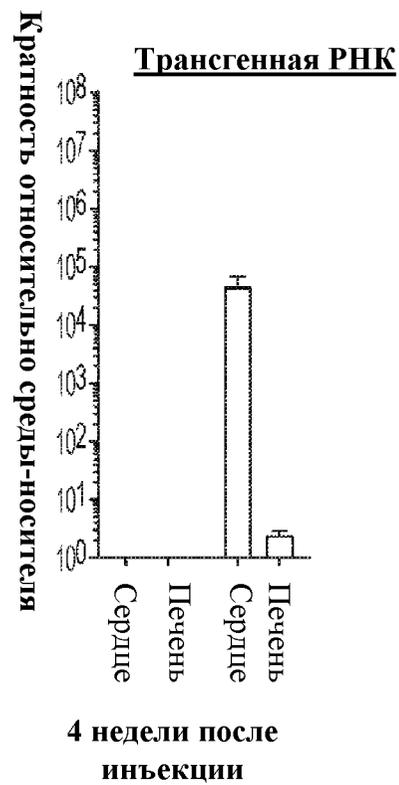
Экспрессия МУВРС3 по сравнению с отсутствием RT



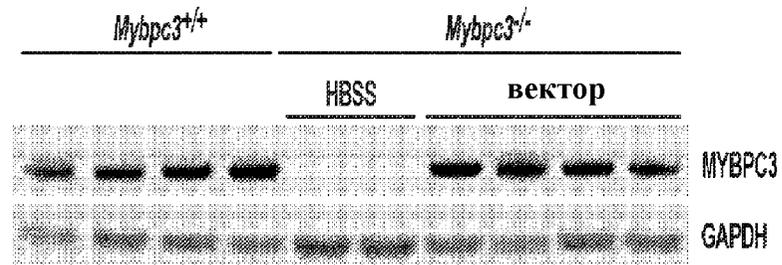
ФИГ. 5



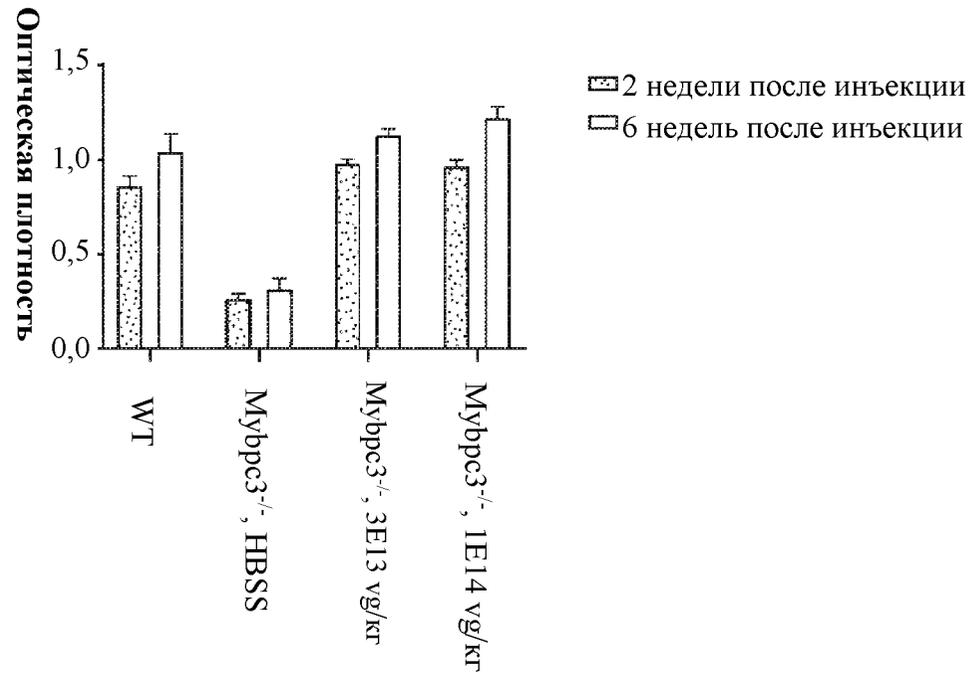
ФИГ. 6А



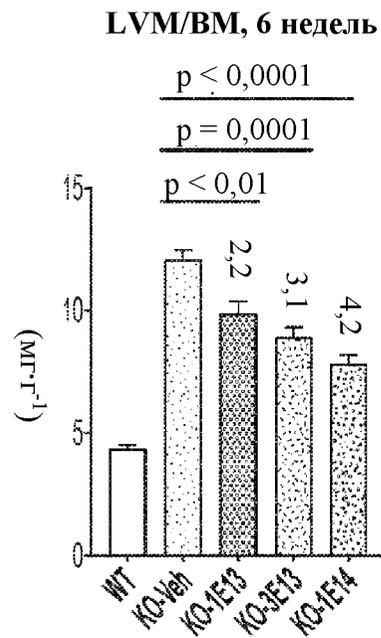
ФИГ. 6В



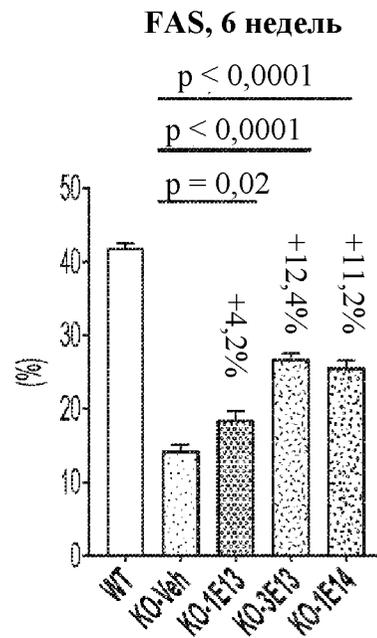
ФИГ. 7



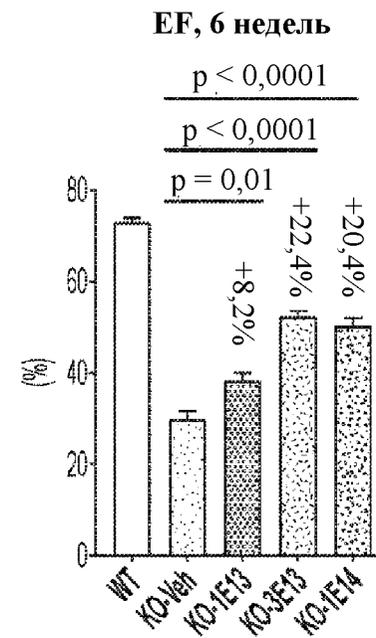
ФИГ. 8



ФИГ. 9А

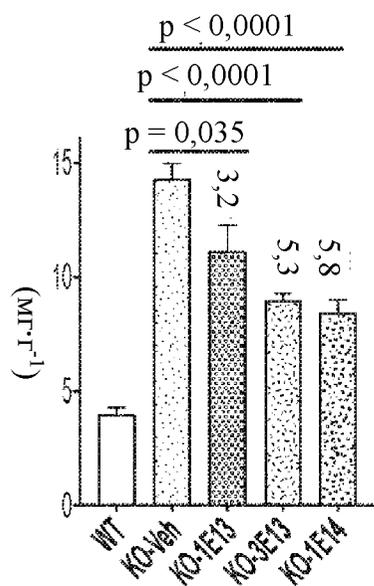


ФИГ. 9В



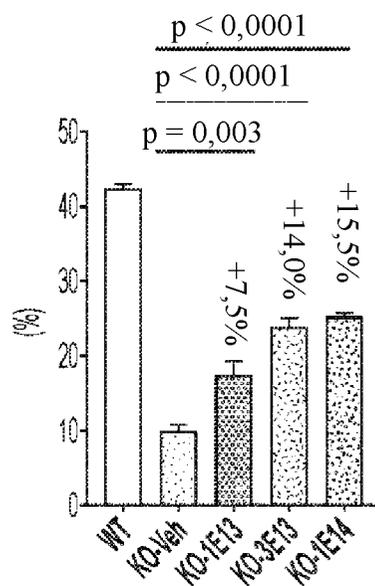
ФИГ. 9С

LVM/BM, 31 неделя



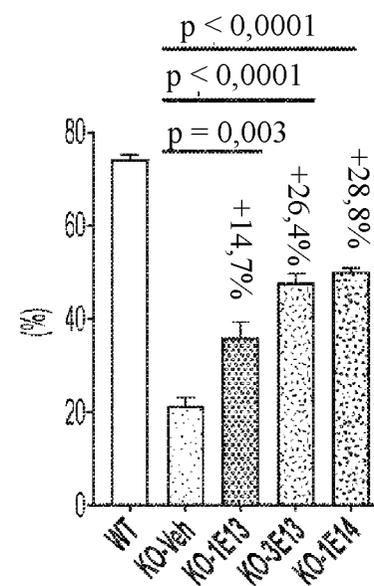
ФИГ. 9D

FAS, 31 неделя

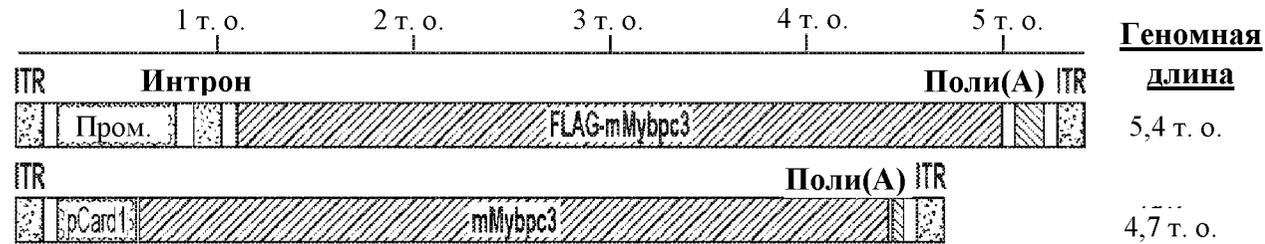


ФИГ. 9E

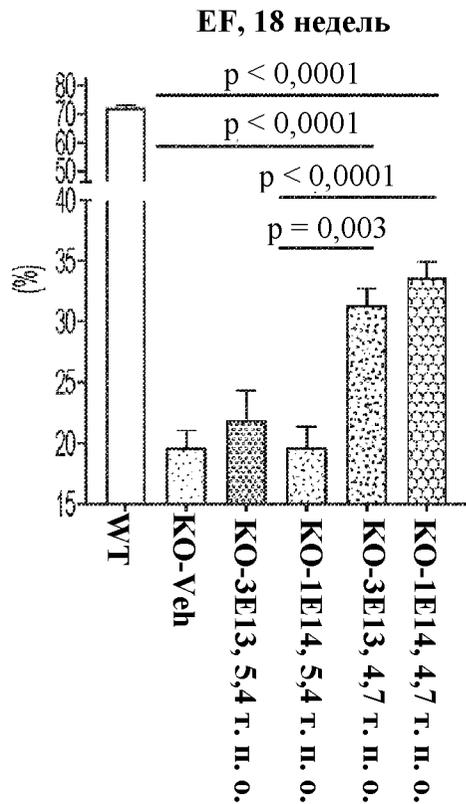
EF, 31 неделя



ФИГ. 9F



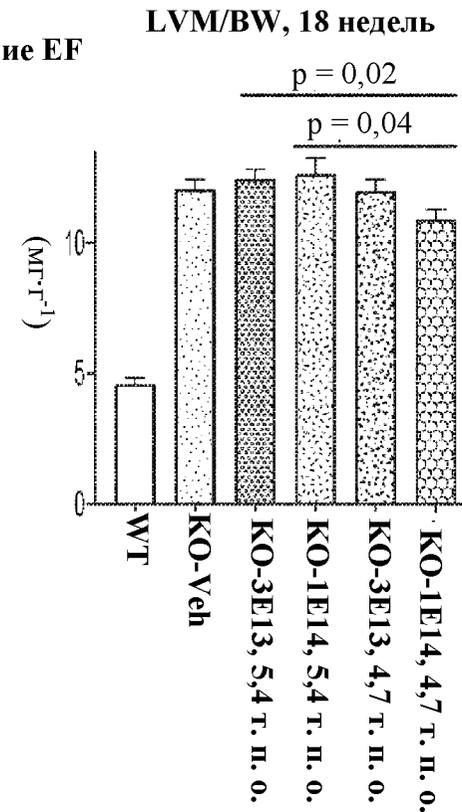
ФИГ. 10А



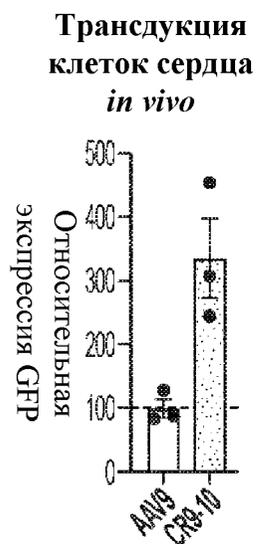
ФИГ. 10В



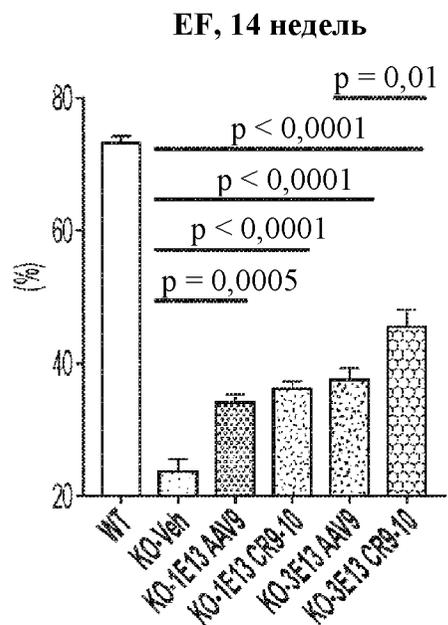
ФИГ. 10С



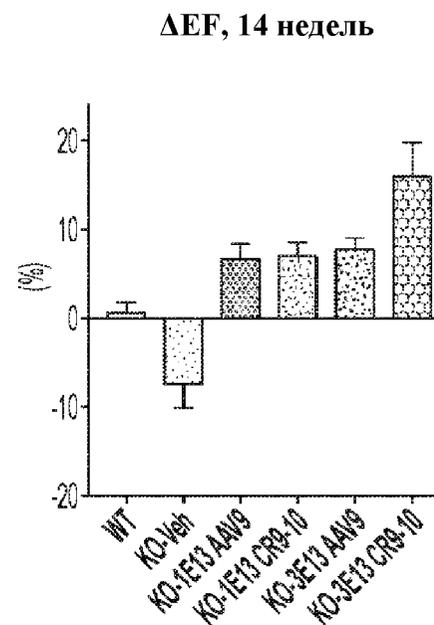
ФИГ. 10D



ФИГ. 11А

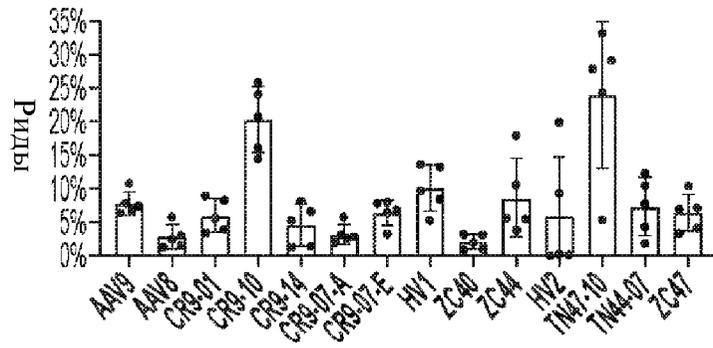


ФИГ. 11В



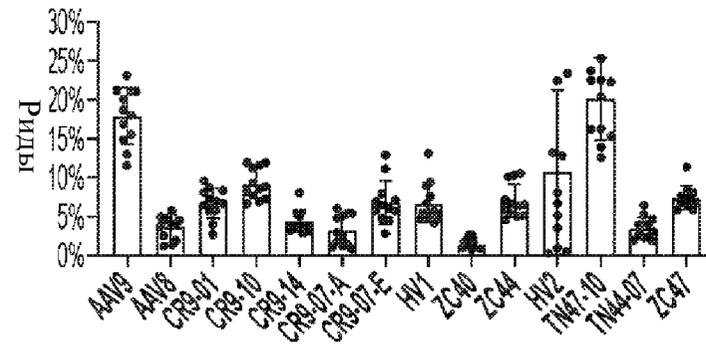
ФИГ. 11С

Трансдукция клеток левого желудочка у NHP



ФИГ. 12А

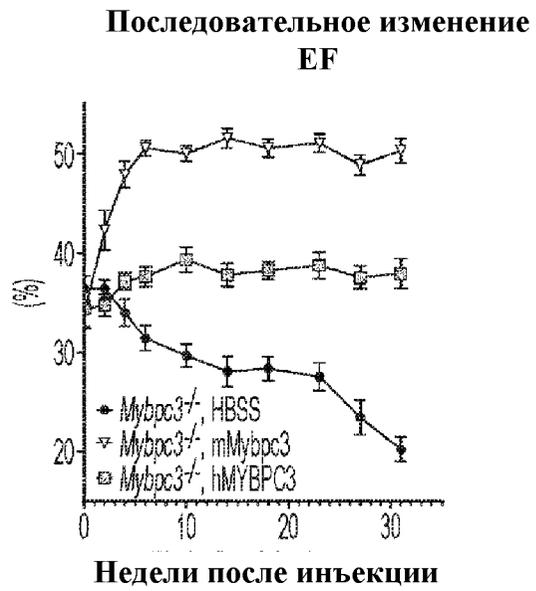
Трансдукция клеток печени у NHP



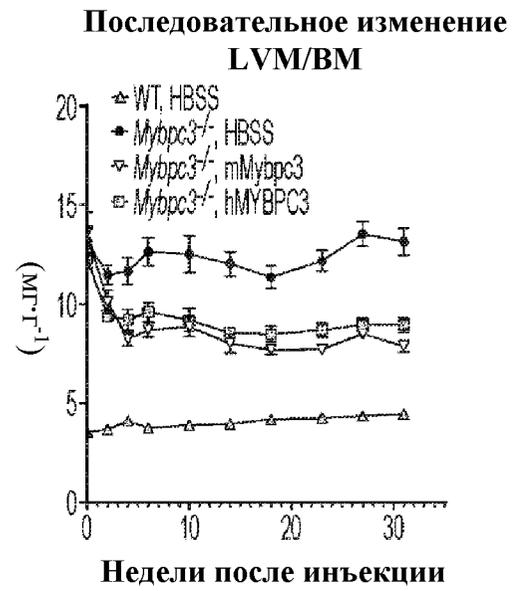
ФИГ. 12В



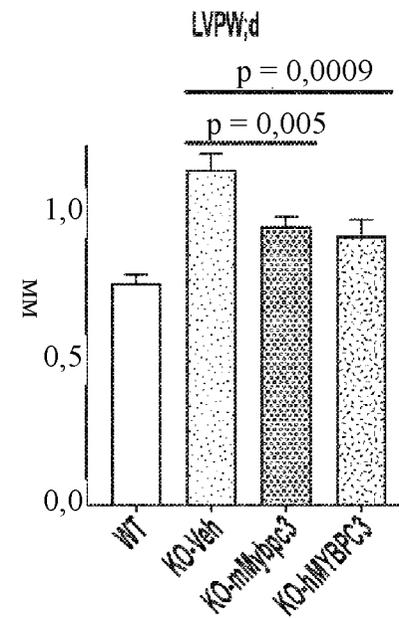
ФИГ. 12С



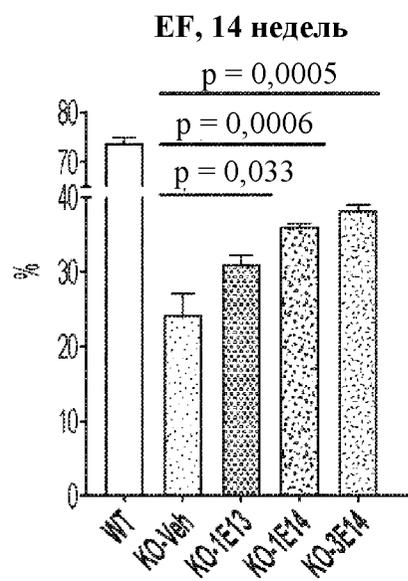
ФИГ. 13А



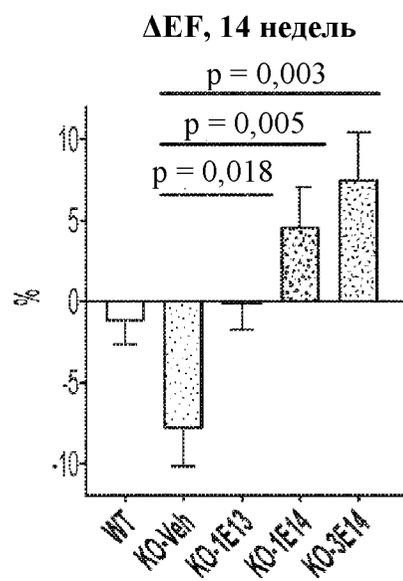
ФИГ. 13В



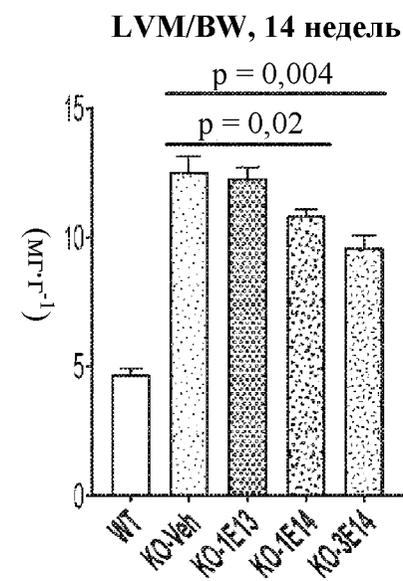
ФИГ. 13С



ФИГ. 14А



ФИГ. 14В



ФИГ. 14С