

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042315

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.03

(21) Номер заявки
201892338

(22) Дата подачи заявки
2017.04.14

(51) Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) ДОСТАВКА МИКРОДИСТРОФИНА ВЕКТОРОМ НА ОСНОВЕ
АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ
ДИСТРОФИИ

(31) 62/323,163; 62/473,253

(32) 2016.04.15; 2017.03.17

(33) US

(43) 2019.03.29

(86) PCT/US2017/027636

(87) WO 2017/181015 2017.10.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ ЭТ
НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕН'С
ХОСПИТАЛ (US)

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

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

(56) US-A1-20100003218
US-A1-20080249052
WO-A1-2015197232
US-A1-20140256802
US-A1-20140234255
WO-A1-2015110449

(57) Согласно изобретению предложены рекомбинантные AAV-векторы, содержащие миниатюризированный ген микродистрофина человека, и способы применения указанных рекомбинантных векторов для уменьшения или предотвращения фиброза у субъектов, страдающих от мышечной дистрофии.

042315 B1

042315 B1

042315

B1

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/323163, поданной 15 апреля 2016 г., и предварительной заявке США № 62/473253, поданной 17 марта 2017 г., которые обе включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Область изобретения

Согласно изобретению предложены геннотерапевтические векторы, такие как векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), экспрессирующие миниатюризованный ген микродистрофина человека, и способы применения этих векторов для уменьшения и предотвращения фиброза у субъектов, страдающих от мышечной дистрофии. Согласно изобретению также предложены комбинированные способы генной терапии для защиты мышечных волокон от травм, увеличения мышечной силы.

Уровень техники

Важность мышечной массы и силы в повседневной физической деятельности, такой как перемещение и дыхание, а также для метаболизма всего тела, неоспорима. Нарушение мышечной функции вызывает мышечные дистрофии (МД), которые характеризуются слабостью мышц и истощением, и оказывают серьезное влияние на качество жизни. Наиболее хорошо охарактеризованные МД являются результатом мутаций в генах, кодирующих члены дистрофин-ассоциированного белкового комплекса (ДАБК). Эти МД являются результатом слабой прочности мембраны, связанной с потерей сарколеммно-цитоскелетного прикрепления ДАБК. Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) является одним из самых губительных мышечных заболеваний, поражающих 1 из 5000 новорожденных особей мужского пола.

Данная заявка включает в себя два трансляционных подхода к разработке лечения МДД. При МДД фиброзная инфильтрация глубока и является серьезным препятствием для любой потенциальной терапии. Также важно учитывать то, что сама по себе замена генов затруднена тяжестью фиброза, уже присутствующего у очень маленьких детей с МДД. Фактически, биопсии мышц в типичном возрасте постановки диагноза, между 4-5 годами, показывают очень значительные уровни фиброза.

МДД вызван мутациями в гене МДД, приводящими к уменьшению количества мРНК и отсутствию дистрофина, т.е. сарколеммного белка 427 кД, связанного с дистрофин-ассоциированным белковым комплексом (ДАБК) (Hoffman et al., Cell 51(6):919-28, 1987). ДАБК состоит из нескольких белков в мышечной сарколемме, которые образуют структурную связь между внеклеточной матрицей (ВКМ) и цитоскелетом через дистрофии, актин-связывающий белок, и альфа-дистрогликан, ламин-связывающий белок. Функция этих структурных звеньев состоит в стабилизации мембран мышечных клеток во время сокращения и в защите от повреждения, вызванного сокращением. При потере дистрофина, хрупкость мембраны приводит к разрывам сарколеммы и притоку кальция, запускающему активирующиеся кальцием протеазы и сегментный некроз волокон (Straub et al., Curr Opin. Neurol. 10(2): 168-75, 1997). Этот неконтролируемый цикл разрушения и восстановления мышц в конечном счете истощает популяцию мышечных стволовых клеток (Sacco et al., Cell, 2010. 143(7): p. 1059-71; Wallace et al., Annu Rev Physiol, 2009. 71: p. 37-57), что приводит к прогрессирующей мышечной слабости, эндомиоциальному воспалению и фиброзу рубцеванию.

Без стабилизации мембраны дистрофином или микродистрофином МДД будет проявляться в виде неконтролируемых циклов повреждения и восстановления тканей, и в конечном итоге заменит утраченные мышечные волокна фиброзной рубцовой тканью путем пролиферации соединительной ткани. Фиброз характеризуется чрезмерными отложениями белков матрицы ВКМ, включающие в себя коллаген и эластин. Белки ВКМ в основном продуцируются цитокинами, такими как TGF β , который высвобождается активированными фибробластами, реагирующими на стресс и воспаление. Хотя первичным патологическим признаком МДД является разрушение и некроз мышечных волокон, фиброз как патологическое следствие имеет такое же влияние. Чрезмерное продуцирование фиброзной ткани ограничивает восстановление мышц и способствует прогрессирующей мышечной слабости у пациента с МДД. В одном исследовании наличие фиброза в начальных мышечных биопсиях с МДД сильно коррелировало с плохим для двигательной системы исходом при 10-летнем наблюдении (Desguerre et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2009. 68(7): p. 762-7). Эти результаты указывают на фиброз как основной фактор появления мышечной дисфункции при МДД, и подчеркивают необходимость разработки методов лечения, уменьшающие количество фиброзной ткани. Большинство антифиброзных терапий, которые были протестированы на мышцах с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой (mdx), действуют путем блокирования сигнализации фиброзных цитокинов через ингибирование пути TGF β . МикроРНК (миРНК) представляют собой однопепочные РНК из примерно 22 нуклеотидов, которые опосредуют подавление экспрессии генов на пост-транскрипционном уровне путем образования пар с основаниями в пределах 3'-UTR мРНК, ингибируя трансляцию или способствуя разрушению мРНК. Ключевая (seed) последовательность из 7 п.н. на 5'-конце миРНК нацелена на миРНК; дополнительное распознавание обеспечивается остальной частью последовательности-мишени, а также ее вторичной структурой. МиРНК играют важную роль в патологии мышечных заболеваний и имеют профили экспрессии, которые однозначно зависят от конкретного типа мышечной дистрофии (Eisenberg et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(43): p. 17016-21). Все больше доказательств свидетельствует о том, что миРНК вовлечены в фиброзный процесс во многих органах, включая сердце, печень, почки и легкие (Jiang et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(43): p.

17016-21). Недавно было показано, что снижение экспрессии miR-29 способствует сердечному фиброзу (Cacchiarelli et al., *Cell Metab*, 2010. 12(4): p. 341-51), и сниженная экспрессия miR-29 была генетически связана с мышцами пациентов-людей с DMD (Eisenberg et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(43): p. 17016-2). Семейство miR-29 состоит из трех членов семьи, экспрессированных из двух бицистронных кластеров мРНК.

MiR-29a ко-экспрессируется с miR-29b (miR-29b-1); miR-29c ко-экспрессируется с второй копией miR-29b (miR-29b-2). Семейство miR-29 имеет общую консервативную ключевую последовательность, а miR-29a и miR-29b отличаются только одной основой от miR-29c. Кроме того, электропорация плазмиды miR-29 (кластер miR-29a и miR-29b-1) в мышцу mdx уменьшала уровни экспрессии компонентов ВКМ, коллагена и эластина, и сильно уменьшала отложение коллагена в срезах мышц в течение 25 дней после обработки (Cacchiarelli et al., *Cell Metab*, 2010. 12(4): p. 341-51).

Аденоассоциированный вирус (AAV) является парвовирусом с дефектной репликацией, чей одноцепочечный ДНК-геном имеет длину около 4,7 т.п.н., включая 145 нуклеотидные инвертированные концевые повторы (ITR). Существует несколько серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV известны. Например, нуклеотидная последовательность генома AAV серотипа 2 (AAV2) представлена в Srivastava et al., *J Virol*, 45: 555-564 (1983), и в скорректированном виде в Ruffing et al., *J Gen Virol*, 15: 3385-3392 (1994). В качестве других примеров полный геном AAV-1 представлен под номером доступа ГенБанка NC_002077; полный геном AAV-3 представлен под номером доступа ГенБанка NC 1829; полный геном AAV-4 представлен под номером доступа ГенБанка NC_001829; геном AAV-5 представлен под номером доступа ГенБанка AF085716; полный геном AAV-6 представлен под номером доступа ГенБанка NC_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 представлены под номерами доступа ГенБанка AX753246 и AX753249 соответственно (см. также патенты США № 7282199 и № 7790449, относящиеся к AAV-8); геном AAV-9 предоставлен в Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 предоставлен в Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 предоставлен в *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). Серотип AAVrh74 описан в Rodino-Klapac et al. *J. Trans. Med.* 5: 45 (2007). цис-Функционирующие последовательности, управляющие репликацией вирусной ДНК (rep), капсидированием/упаковкой, и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR. Три промотора AAV (обозначенные p5, p19 и p40 по их относительному расположению на геномной карте) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены rep и cap. Два промотора rep (p5 и p19) в сочетании с дифференциальным сплайсингом одного интрона AAV (например, по нуклеотидах 2107 и 2227 AAV2) приводят к продуцированию четырех белков rep (rep 78, rep 68, rep 52 и rep 40) из гена rep. Белки Rep обладают несколькими ферментными свойствами, которые в конечном счете отвечают за репликацию вирусного генома. Ген cap экспрессируется из промотора p40 и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты трансляции ответственны за продуцирование трех родственных капсидных белков. Единственный консенсусный сайт полиаденилирования находится в позиции 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

AAV обладает уникальными особенностями, которые делают его привлекательным в качестве вектора доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование клеток AAV в культуре является нецитопатическим, а естественное инфицирование людей и других животных является скрытым и бессимптомным. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что позволяет применять различные типы тканей *in vivo*. Кроме того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и не делящиеся клетки, и может по существу сохраняться в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомный элемент) в течение жизни данных клеток. Провирусный геном AAV остается инфекционным при клонировании ДНК в плазмиды, что делает возможным создание рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV, капсидированием генома и интеграцией, содержатся в ITR генома AAV, возможна замена некоторого или всего содержимого примерно 4,3 т.п.н. генома (кодирующее белки репликации и структурные капсидные белки, гер-сар) на чужеродную ДНК, такую как генная кассета, содержащая промотор, нужную ДНК и сигнал полиаденилирования. Белки гер и сар могут быть предоставлены *in trans*. Еще одна важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно стабильным и крепким вирусом. Он легко выдерживает условия, применяемые для инактивации аденовируса (от 56 до 65°C в течение нескольких часов), делая холодильное хранение AAV менее сложным. AAV даже может быть лиофилизирован. Наконец, AAV-инфицированные клетки не устойчивы к суперинфекции.

Многочисленные исследования продемонстрировали долгосрочную (больше чем 1,5 года) опосредованную рекомбинантным AAV экспрессию белка в мышцах; см., Clark et al., *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14082-14087 (1996); and Xiao et al., *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996); см. также, Chao et al., *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) and Chao et al., *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Более того, поскольку мышца сильно васкуляризирована, трансдукция рекомбинантным AAV приводит к появлению трансгенных продуктов в кровеносной системе после внутримышечной инъекции, как описано в Herzog et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5804-5809 (1997) и Murphy et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:

13921-13926 (1997). Кроме того, Lewis et al., J Virol, 76: 8769-8775 (2002) продемонстрировали, что волокна скелетных мышц обладают необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, свертывания и секреции антител, что указывает на то, что мышца способна к устойчивой экспрессии секретируемых белковых терапевтических агентов.

Функциональное улучшение у пациентов, страдающих от МДД и других мышечных дистрофий, требует как восстановления генов, так и уменьшения фиброза. Существует необходимость в способах уменьшения фиброза, которые могут быть объединены со способами восстановления генов для более эффективного лечения МДД и других мышечных дистрофий. Молекула miR29 является потенциальным регулятором гена и идеальным кандидатом для снижения мышечного фиброза.

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к способам генной терапии, которые непосредственно уменьшают три основных компонента соединительной ткани (коллаген 1, коллаген 3 и фибронектин) путем доставки микроРНК miR29. В данной системе miR29 связывается с 3'-UTR гена коллагена и фибронектина для того, чтобы снизить экспрессию. Изобретение относится к геннотерапевтическим векторам, например на основе AAV, экспрессирующим направляющую цепь микроРНК miR29, и способу доставки miR29 в мышцу для уменьшения и/или предотвращения фиброза.

Кроме того, согласно данному изобретению предложены комбинированные терапии, и подходы к восстановлению и предотвращению фиброза с использованием геннотерапевтических векторов, доставляющих miR-29 для подавления фиброза, наряду с микродистрофином для устранения дефекта гена, наблюдаемого при МДД. Как показано в примерах 5-7, комбинированное лечение приводит к большему снижению фиброза, увеличению размера мышц и увеличению мышечной силы.

В одном варианте осуществления, согласно изобретению предложен gAAV-вектор, экспрессирующий miR-29. Например, gAAV-вектор содержит полинуклеотидную последовательность, экспрессирующую miR29c, такую как нуклеотидная последовательность, содержащая направляющую цепь-мишень miR-29c SEQ ID NO: 3, направляющую цепь miR-29c SEQ ID NO: 4, и природный каркас и петлю-настебле miR-30 (SEQ ID NO: 5). Иллюстративная полинуклеотидная последовательность, содержащая кДНК miR-29c в каркасе miR-30, представлена в виде SEQ ID NO: 2 (фиг. 1).

Иллюстративный gAAV согласно данному изобретению представляет собой pAAV.ЦМВ.Mir29C, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1; причем промотор ЦМВ охватывает нуклеотиды 120-526, интрон EF1a охватывает нуклеотиды 927-1087 и нуклеотиды 1380-1854, направляющая цепь miR-29c охватывает нуклеотиды 1257-1284, и shRNA-miR29-c с первичной ключевой последовательностью охватывает нуклеотиды 1088-1375, а последовательность поли-А охватывает нуклеотиды 1896-2091. В одном аспекте изобретения, gAAV-векторы согласно данному изобретению представляют собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

Другой иллюстративный gAAV согласно данному изобретению представляет собой pAAV.MHC.Mir29C, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12; причем энхансер МКК охватывает нуклеотиды 190-395, промотор МНС охватывает нуклеотиды 396-753, интрон EF1a охватывает нуклеотиды 1155-1315 и нуклеотиды 1609-2083, направляющая цепь miR-29c охватывает нуклеотиды 1487-1512, и shRNA-miR29-c с первичной ключевой последовательностью охватывает нуклеотиды 1316-1608, а последовательность поли-А охватывает нуклеотиды 2094-2146. В одном аспекте, gAAV-векторы согласно данному изобретению представляют собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

В другом аспекте изобретения, gAAV-векторы согласно данному изобретению могут быть функционально связаны с регуляторным элементом, специфичным для мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор MEF, мышечную креатинкиназу (МКК), tМКК (усеченную МКК), тяжелую цепь миозина (МНС), C5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышечной креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

Например, любой из gAAV-векторов согласно данному изобретению функционально связан с регуляторным элементом, специфичным для мышц, содержащим нуклеотидную последовательность энхансера МКК SEQ ID NO: 10 и/или промоторную последовательность МКК SEQ ID NO: 11.

Согласно данному изобретению также предложены фармацевтические композиции (иногда именуемые в данном документе просто "композициями"), содержащие любой из gAAV-векторов согласно данному изобретению.

В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы получения gAAV-векторной частицы, включающие культивирование клетки, трансфицированной любым gAAV-вектором согласно данному изобретению, и извлечение частиц gAAV из супернатанта трансфицирован-

ных клеток. Согласно данному изобретению также предложены вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных AAV-векторов согласно данному изобретению.

В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы уменьшения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества любого гAAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего miR-29. Например, любой из гAAV согласно данному изобретению вводится субъектам, страдающим от мышечной дистрофии, для уменьшения фиброза и, в частности, уменьшает фиброз в скелетных мышцах или в сердечной мышце субъекта. Данные способы могут дополнительно включать стадию введения гAAV экспрессирующего микродистрофин.

"Фиброз" относится к избыточному или нерегулируемому отложению компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), и аномальным процессам восстановления в тканях после повреждения, включая скелетные мышцы, сердечную мышцу, печень, легкие, почки и поджелудочную железу. Компоненты ВКМ, которые осаждаются, включают фибронектин и коллаген, например коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3.

В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы предотвращения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества любого рекомбинантного AAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего miR-29. Например, любой из гAAV изобретения вводят субъектам, страдающим от мышечной дистрофии, чтобы предотвратить фиброз, например, гAAV согласно данному изобретению, экспрессирующий miR-29, вводят до того, как фиброз обнаруживается у субъекта. Кроме того, гAAV согласно данному изобретению, экспрессирующий miR-29, вводят субъекту, подверженному риску развития фиброза, например, страдающему от мышечной дистрофии или диагностированному с мышечной дистрофией, например МДД. гAAV согласно данному изобретению вводят субъекту, страдающему от мышечной дистрофии, чтобы предотвратить новый фиброз у данных субъектов. Данные способы могут дополнительно включать стадию введения экспрессирующего микродистрофин гAAV.

Согласно данному изобретению также предложены способы увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего от мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества любого из гAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR-29. Данные способы могут дополнительно включать стадию введения гAAV, экспрессирующего микродистрофин.

Термины "комбинированная терапия" и "комбинированное лечение" относятся к введению гAAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего miR-29, и гAAV-вектора, экспрессирующего микродистрофин.

В любом из способов согласно данному изобретению субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как МДД, мышечной дистрофии Беккера или любой другой дистрофии, связанной с дистрофином. Кроме того, в любом из способов согласно данному изобретению субъект может страдать от дистрофинопатии.

В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены рекомбинантные AAV-векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок микродистрофина. Согласно данному изобретению предложен гAAV, содержащий: а) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 7 и кодирующую функциональный белок микродистрофина, б) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 или с) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9.

Иллюстративный гAAV, экспрессирующий микродистрофин, согласно данному изобретению представляет собой рAAV.msk-микродистрофин, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, и показан на Рис. 10 и 11. Данный гAAV-вектор содержит промотор МКК, последовательность химерного интрона, кодирующую последовательность гена микродистрофина, полиА, устойчивость к ампициллину и каркас плазмиды рGEX с сайтом начала репликации рBR322. В одном аспекте изобретения, рекомбинантные AAV-векторы согласно данному изобретению представляют собой AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

Согласно данному изобретению предложены гAAV-векторы, кодирующие белок микродистрофина, который, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более характерно по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93% или 94% и еще более характерно по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по последовательности идентичен SEQ ID NO: 8, причем белок сохраняет активность микродистрофина. Белок микродистрофина обеспечивает прочность мышечной мембраны во время сокращения мышц, например, микродистрофин действует как амортизатор при сокращении мышц.

Согласно данному изобретению предложены гAAV-векторы, экспрессирующие белок микродистрофина, содержащие нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более характерно по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93% или 94% и еще более характерно по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7,

и кодирует функциональный белок микродистрофин.

Согласно данному изобретению предложены gAAV-векторы, экспрессирующие микродистрофин, содержащие нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 7 или ее комплементарными вариантами, и кодирует функциональный белок микродистрофин.

Термин "жесткий" применяется для обозначения условий, которые обычно подразумеваются в данной области техники как жесткие. Жесткость гибридизации в основном определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих агентов, таких как формамид. Примеры жестких условий гибридизации и промывок представляют собой 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при 65-68°C, или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия, и 50% формамида при температуре 42°C; см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Могут также быть использованы более жесткие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокая концентрация формамида, или другой денатурирующий агент) однако будет затронута скорость гибридизации. В случаях, когда речь идет о гибридизации дезоксиолигонуклеотидов, дополнительные иллюстративные условия жесткой гибридизации включают в себя промывку 6x SSC 0,05% пирогосфата натрия при 37°C (для 14-основных олигонуклеотидов), 48°C (для 17-основных олигонуклеотидов), 55°C (для 20-основных олигонуклеотидов) и 60°C (для 23-основных олигонуклеотидов).

Другие агенты могут быть включены в гибридизационные и промывочные буферы с целью уменьшения неспецифической и/или фоновой гибридизации. Примеры представляют собой 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,1% поливинилпирролидона, 0,1% пирогосфата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, NaDodSO₄, (SDS), фиколл, раствор Денхардта, разрушенная ультразвуком ДНК спермы лосося (или другая не комплементарная ДНК) и сульфат декстрана, хотя могут быть применены и другие подходящие агенты. Концентрация и типы этих добавок могут быть изменены без существенного влияния на жесткость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8-7,4, однако в типичных условиях ионной силы скорость гибридизации практически не зависит от pH; см. Anderson et al., *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Специалистами в данной области техники могут быть скорректированы условия гибридизации, чтобы приспособить эти переменные и позволить ДНК с различной степенью родственности последовательно формировать гибриды.

В другом аспекте, gAAV-векторы, экспрессирующие микродистрофин, содержат кодирующую последовательность гена микродистрофина, функционально связанную с регуляторным элементом, специфичным для мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный для скелетных мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор MEF, мышечную креатинкиназу (МКК), tМКК (усеченную МКК), тяжелую цепь миозина (МНС), C5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышечной креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

Кроме того, согласно данному изобретению предложены gAAV-векторы, экспрессирующие микродистрофин, содержащий специфический для мышцы регуляторный элемент, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

Согласно данному изобретению также предложены фармацевтические композиции (или иногда называемые в данном документе просто "композиции"), содержащие любой из gAAV-векторов согласно данному изобретению.

В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы получения gAAV-векторной частицы, включающие культивирование клетки, которая была трансфицирована любым gAAV-вектором согласно данному изобретению, и извлечения частиц gAAV из супернатанта трансфицированных клеток. Согласно данному изобретению также предложены вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных AAV-векторов согласно данному изобретению.

Согласно данному изобретению также предложены способы получения функционального белка микродистрофина, включающие инфицирование клетки-хозяина рекомбинантным AAV-вектором, экспрессирующим микродистрофин согласно данному изобретению, и экспрессию функционального белка микродистрофина в клетке-хозяине.

В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы уменьшения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение терапевтически эффективного количества любого gAAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего микродистрофин. Например, любой из gAAV согласно данному изобретению вводят субъектам, страдающим от мышечной дистрофии или дистрофинопатии, для уменьшения фиброза и, в частности, уменьшает фиброз в скелетной мышце или в сердечной мышце субъекта.

В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы предотвращения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение терапевтически эффективного количества любого рекомбинантного AAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего микродистрофин. Например, любой из гAAV согласно данному изобретению вводят субъектам, страдающим от мышечной дистрофии или дистрофинопатии, чтобы предотвратить фиброз, например, гAAV согласно данному изобретению, экспрессирующий микродистрофин, вводят до того, как фиброз обнаруживается у субъекта. Кроме того, гAAV согласно данному изобретению, экспрессирующий микродистрофин, вводят субъекту, подверженному риску развития фиброза, например, страдающему от мышечной дистрофии или диагностированному с мышечной дистрофией, например МДД или мышечной дистрофией Беккера. гAAV согласно данному изобретению вводят субъекту, страдающему от дистрофинопатии или дистрофинопатической мышечной дистрофией, чтобы предотвратить новый фиброз у данных субъектов.

Согласно данному изобретению также предложены способы увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего от мышечной дистрофии или дистрофинопатии, включающие введение терапевтически эффективного количества любого из гAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR-29.

Любой из вышеперечисленных способов, включающих стадию введения гAAV, экспрессирующего miR-29c согласно данному изобретению, может включать в себя дополнительную стадию введения любого из гAAV, экспрессирующих описанный в данном документе микродистрофин. Термины "комбинированная терапия" и "комбинированное лечение" относятся к введению гAAV-вектора согласно данному изобретению, экспрессирующего miR-29, и гAAV-вектора, экспрессирующего микродистрофин.

В способах введения гAAV-вектора, экспрессирующего miR-29, и гAAV-вектора, экспрессирующего белок микродистрофин, эти гAAV-векторы могут вводиться одновременно, или вводиться последовательно, причем гAAV-вектор, экспрессирующий miR29, вводят непосредственно перед гAAV, экспрессирующим белок микродистрофин, или вводятся последовательно, при этом гAAV-вектор, экспрессирующий miR29, вводят непосредственно после гAAV, экспрессирующего белок микродистрофин. Альтернативно, способы согласно данному изобретению осуществляют так, что AAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, вводят в течение около 1-5 ч, или 5-12 ч, или 12-15 ч, или 15-24 ч после введения гAAV, экспрессирующего miR-29, или способы согласно данному изобретению осуществляют так, что AAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, вводят в течение около 1-5 ч, или 5-12 ч, или 12-15 ч, или 15-24 ч до введения гAAV, экспрессирующего miR-29. Альтернативно, способы согласно данному изобретению осуществляют так, что AAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, вводят в пределах около 1, или 6, или 12, или 24 ч после введения гAAV, экспрессирующего miR-29, или способы согласно данному изобретению осуществляют так, что AAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, вводят в пределах около 1, или 6, или 12, или 24 ч до введения гAAV, экспрессирующего miR-29.

Изобретение предусматривает введение любого из AAV-векторов согласно данному изобретению пациентам с диагностированной дистрофинопатией или мышечной дистрофией, такой как МДД или мышечная дистрофия Беккера, до того, как у субъекта обнаруживают фиброз, или до того, как у субъекта была уменьшена мышечная сила, или до того, как у субъекта была уменьшена мышечная масса.

Изобретение также предусматривает введение любого из гAAV согласно данному изобретению субъекту, страдающему от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДД или мышечная дистрофия Беккера, у которого уже развился фиброз, чтобы предотвратить новый фиброз у данных субъектов. Изобретение также предусматривает введение любого из гAAV согласно данному изобретению пациенту, страдающему от мышечной дистрофии, у которого уже уменьшилась мышечная сила или уменьшилась мышечная масса, чтобы защитить мышцу от дальнейшего повреждения.

В любом из способов согласно данному изобретению гAAV-вектор вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

Кроме того, в любом из способов согласно данному изобретению гAAV-вектор или композицию вводят системно. В качестве примеров, гAAV-вектор или композиция вводится парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации.

В другом варианте осуществления, согласно данному изобретению предложена композиция, содержащая любой из гAAV-векторов, экспрессирующих miR29, или любой из гAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или содержащая как гAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и гAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того, согласно данному изобретению предложены композиции, содержащие любой из рекомбинантных гAAV-векторов, экспрессирующих miR29, или любой из гAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или содержащие как гAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и гAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для уменьшения фиброза у субъекта, страдающего от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДД или мышечная дистрофия Беккера.

Согласно данному изобретению предложены композиции, содержащие любой из гAAV-векторов, экспрессирующих miR29, или любой из гAAV-векторов, экспрессирующих белок микродистрофин, или

содержащие как gAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и gAAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДЦ или мышечная дистрофия Беккера.

В дополнительном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены композиции, содержащие любой из gAAV-векторов, экспрессирующих miR29, или любой из gAAV-векторов, экспрессирующих белок микродистрофин, или содержащие как gAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и gAAV-вектор, экспрессирующий белок микродистрофин, для лечения дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДЦ или мышечная дистрофия Беккера.

Композиции согласно данному изобретению составлены для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Композиция согласно данному изобретению также составлена для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации. Кроме того, любая из композиций составлена для введения субъекту, страдающему от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДЦ, мышечная дистрофия Беккера, или любой другой дистрофией, связанной с дистрофином.

В дополнительном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено применение любого из gAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR29, или любого из gAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или включающее как gAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и gAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для приготовления лекарственного средства для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Например, пациент является нуждающимся в лечении, страдающим от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДЦ, мышечная дистрофия Беккера, или любой другой дистрофии, связанной с дистрофином.

В дополнительном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено применение любого из gAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR29, или любого из gAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или включающее как gAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и gAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для приготовления лекарственного средства для профилактики фиброза у субъекта, страдающего от мышечной дистрофии. В дополнительном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложено применение рекомбинантных AAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR29, или любого из gAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или включающее как gAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и gAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для приготовления лекарственного средства для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего от дистрофинопатии или мышечной дистрофии, такой как МДЦ или мышечная дистрофия Беккера.

Изобретение предусматривает применение любого из AAV-векторов согласно данному изобретению для приготовления лекарственного средства для введения пациенту с диагностированной МДЦ, до того, как у субъекта обнаруживают фиброз, или до того, как у субъекта была уменьшена мышечная сила, или до того, как у субъекта была уменьшена мышечная масса.

Изобретение также предусматривает применение любого из AAV-векторов согласно данному изобретению для приготовления лекарственного средства для введения, чтобы вводить любой из gAAV согласно данному изобретению субъекту, страдающему от мышечной дистрофии, у которого уже развился фиброз, чтобы предотвратить новый фиброз у данных субъектов. Изобретение также предусматривает введение любого из gAAV согласно данному изобретению пациенту, страдающему от мышечной дистрофии, у которого уже уменьшилась мышечная сила или уменьшилась мышечная масса, чтобы защитить мышцу от дальнейшего повреждения.

Согласно данному изобретению предложено применение gAAV-векторов согласно данному изобретению, экспрессирующих miR296, или любого из gAAV-векторов, экспрессирующих микродистрофин, или включающее как gAAV-вектор, экспрессирующий miR-29, так и gAAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофией.

В любом из применений согласно данному изобретению лекарственное средство составляют для внутримышечной инъекции. Кроме того, любое лекарственное средство может быть приготовлено для введения субъекту, страдающему от мышечной дистрофии, такой как МДЦ, или любой другой мышечной дистрофией, связанной с дистрофином.

Кроме того, любое лекарственное средство согласно данному изобретению может представлять собой комбинированную терапию, в которой gAAV-векторы, экспрессирующие miR-29, и gAAV-векторы, экспрессирующие микродистрофин, вводят одновременно, или вводят последовательно, причем gAAV-вектор, экспрессирующий miR29, вводят непосредственно перед gAAV, экспрессирующим микродистрофин, или вводят последовательно, при этом gAAV-вектор, экспрессирующий miR29, вводят непосредственно после gAAV, экспрессирующего микродистрофин. Альтернативно, лекарственное средство включает в себя введение AAV-вектора, экспрессирующего микродистрофин, который вводят в течение около 1-5 ч после введения gAAV, экспрессирующего miR-29, или лекарственное средство содержит AAV-вектор, экспрессирующий микродистрофин, который вводят в течение примерно 1-5 ч до введения gAAV, экспрессирующего miR-29.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана схема gAAV-вектора scAAVCrh.74.ЦМВ.miR29c и нуклеотидная последовательность miR-29c в природном каркасе miR-30, и нуклеотидная последовательность предсказанной структуры шпильки.

На фиг. 2А-2С показано, что инъекция miR-29c в мышцу уменьшает коллаген во всей мышце и восстанавливает экспрессию miR-29c.

На фиг. 3А-3С показано, что инъекция miR-29c улучшает абсолютную мышечную силу (панель А) и удельную мышечную силу (панель В), но не защищает от повреждения, вызванного сокращением (панель С).

На фиг. 4А-4С показано количество мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин, для измерения эффективности доставки трансгена.

На фиг. 5А-5С показано, что совместная доставка miR-29c с микродистрофином уменьшает экспрессию коллагена (панель А) и экспрессию дистрофина, индуцированную фиброзом.

На фиг. 6А-6Д показано, что внутримышечная инъекция miR-29c/микродистрофин ингибирует внеклеточный матрикс (ВКМ) у мышей mdx/utrn^{+/+}, как измерено по коллагену I альфа (панель А), коллагену 3 альфа (панель В), фибронектину (панель С) и TGF-β (панель D).

На фиг. 7А-7С показано, что внутримышечная инъекция miR-29c увеличила абсолютную силу (панель А), нормированную удельную силу (панель В) и предоставила защиту от повреждения, вызванного сокращением, в мышце (панель С).

На фиг. 8 показано, что комбинация miR-29c/μ-dys увеличивает размер мышц у мышей, получавших лечение в возрасте 3 месяцев. Показаны срезы обработанных и необработанных икроножных мышц mdx/utrn^{+/+}, окрашенных пикросирус-красным, для окрашивания коллагена. Фиброзные области розовые, а интактные мышцы зеленые. На макроскопическом уровне комбинация miR-29c/μ-dys снижает фиброз и увеличивает общую площадь поперечного сечения.

На фиг. 9А-Ф показано, что обработка miR-29c, совместно доставленным с микродистрофином, увеличивает мышечную гипертрофию и гиперплазию, как показано увеличением общего веса инъектированной икроножной мышцы по сравнению со случаем, когда вводятся отдельно что-то одно (панель А), увеличением средней величины волокна (панель В), увеличением площади поперечного сечения мышцы (панель D; не вводили: 24,6 по сравнению с miR-29c: 26,3 по сравнению с микродис: 26,6 по сравнению с микродис/miR-29c: 33,1) и увеличением количества мышечных волокон (панель Е), но количество мышечных волокон на единицу площади не было затронуто (панель F). Панель С сравнивает контрольных mdx/utrn^{+/+} с обработанным miR-29c/μ-dys mdx/utrn^{+/+}, средний диаметр увеличился с 25,96 до 30,97 мкм.

На фиг. 10А-Г показано, что ранняя обработка комбинированной терапией AAV.miR-29c/микродистрофин более эффективна для уменьшения фиброза и экспрессии ВКМ. На панели А показано окрашивание пикросирус-красным мышцей: дикого типа, неинъектированных, AAV.miR-29c, AAV.микродистрофин и AAV.miR-29c/AAV.микродистрофин, инъектированных в возрасте 4-5 недель, выведенных из исследования двенадцати недель после инъекции. Панель В показывает количественную оценку окрашивания пикросирус-красным, показывая, что совместно обработанная мышца имела 51,1% снижение коллагена по сравнению с неинъектированной икроножной мышцей. Панель С демонстрирует, что ОТ-ПЦР подтверждает увеличение уровней транскрипции miR-29c в обработанных группах. Полуколичественная ОТ-ПЦР показывает значительное снижение уровней коллагена I и III (панелей d, e), fnb (панель f) и TGF-β1 (панель g) в обработанной AAV.miR-29c/AAV.микродистрофин мышце, по сравнению с контралатеральной конечностью и каждой из одиночных терапий. Планки погрешностей, СОС (стандартная ошибка среднего) для n=5 (scAAVrh.74.ЦМВ. miR-29c), n=5 (scAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c/ssAAVrh.74.МКК.микродистрофин), n=6 (ssAAVrh. 74.МКК.микродистрофин), n=9 (мыши mdx/utrn^{+/+}). Односторонний дисперсионный анализ (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

На фиг. 11 показано, что ранняя комбинированная терапия восстанавливает силу и защищает от повреждения, вызванного сокращением. Величина абсолютной (панель А) и нормированной удельной силы (панель В) после тетанического сокращения во всех трех обработанных инъектированных икроножных мышцах была значительно увеличена по сравнению с необработанной мышцей mdx/utrn^{+/+} (панель С). Затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяющихся эксцентрических сокращений. Только у мышей, совместно обработанных miR-29c/микродистрофином и только микродистрофином, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn^{+/+} (синий). Двусторонний дисперсионный анализ демонстрирует значимость в спадающих кривых. Планки погрешностей, СОС для n=5 (rAAVrh.74.ЦМВ. miR-29c), n=6 (rAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c/rAAVrh.74.МКК.микро-дистрофин), n=5 (rAAVrh.7 4.МКК.микродистрофин), n=15 (mdx/utrn^{+/+} мыши). Односторонний дисперсионный анализ (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

На фиг. 12 показано, что комбинированная обработка miR-29c/микродистрофин увеличивает размер мышц у мышей, получавших лечение в возрасте 1 месяца. Обработанные и необработанные икроножные мышцы mdx/utrn^{+/+} нарезали и окрашивали пикросирус-красным для окрашивания коллагена. Фиброзные области розовые, а интактные мышцы зеленые. На макроскопическом уровне комбинация miR-

29с/микродистрофин снижает фиброз и увеличивает общую площадь поперечного сечения.

На фиг. 13А-13G показано, что раннее лечение (на 4-5 неделе) комбинированной терапией AAV.MKK.miR-29с/микродистрофин более эффективно для уменьшения фиброза и экспрессии ВКМ. На панели А показано окрашивание пикросирус-красным неинъектированных мышей и мышей AAV.MKK.miR-29с/AAV.MKK.микродистрофин, инъектированных в возрасте 4-5 недель, выведенных из исследования через 12 недель после инъекции. Первоначальное увеличение, $\times 20$ На панели В показана количественная оценка окрашивания пикросирус-красным, демонстрирующая что совместно обработанная мышца имеет 50,9% уменьшения коллагена по сравнению с необработанной икроножной мышцей. На панели С показана ОТ-ПЦР, подтверждающая увеличение уровней транскрипции miR-29с в обработанной группе. Полуколичественная ОТ-ПЦР демонстрирует значительное уменьшения количества коллагена 1А (Col1A, панель D) и коллагена 3А (Col3A, панель E), фибронектина (Fbn; панель F) и Tgf β 1 (панель G) в обработанных AAV.MKK.miR-29с/AAV.микродистрофин мышцах, по сравнению с обработками контралатеральных конечностей. ($^{**}p<0,05$, $^{****}p<0,0001$).

На фиг. 14А-14G показано, что поздняя обработка (лечение на 12 неделе) комбинированной терапией AAV.MKK.miR-29с/микродистрофин эффективна для снижения фиброза и экспрессии ВКМ. На панели А показано окрашивание пикросирус-красным необработанных, AAV.MKK.miR-29с и AAV.MKK.miR-29с/AAV.микродистрофин через 12 недель после инъекции. Оригинальное увеличение, $\times 20$. На панели В показана количественная оценка окрашивания пикросирус-красным, что демонстрирует, что совместно обработанная мышца имела 30,3% снижение коллагена по сравнению с необработанной икроножной мышцей. На панели С показана ОТ-ПЦР, подтверждающая увеличение уровней транскрипта miR-29с в обработанных группах. Полуколичественная ОТ-ПЦР продемонстрировала значительное снижение количества коллагена 1А (Col1A, панель D), коллагена 3А (Col3A, панель E), фибронектина (Fbn; панель F) и TGF β 1 (панель G) в обработанных AAV.miR-29с/AAV.микродистрофин мышцах, по сравнению с противоположной конечностью. Односторонний дисперсионный анализ. Все данные представляют собой среднее $\pm$ СОС ($^{**}p<0,01$, $^{****}p<0,0001$).

На фиг. 15А-15С показано, что ранняя комбинированная терапия (обработка на 4-5 неделе) восстанавливает силу и защищает от повреждения, вызванного сокращением. Величина абсолютной (панель А) и нормированной удельной силы (панель В) после тетанического сокращения обработанных MKK.miR-29с/микродистрофин икроножных мышц была значительно увеличена по сравнению с необработанной мышцей mdx/utrn $^{+/-}$ (панель С). (С) Затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяющихся эксцентрических сокращений. У мышцей, совместно обработанных miR-29с/микродистрофин и только микродистрофином, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn $^{+/-}$ (красный). Двухсторонний дисперсионный анализ. Все данные представляют собой среднее $\pm$ СОС ($^{****}p<0,0001$).

На фиг. 16А-16С показано, что поздняя комбинированная терапия восстанавливала силу и защищала от повреждений, вызванных сокращением. Величина абсолютной (панель А) и нормированной удельной силы (панель В) после тетанического сокращения инъектированных гAAV.MKK.miR-29с и гAAV, экспрессирующим микродистрофин, икроножных мышц была значительно увеличена по сравнению с необработанной мышцей mdx/utrn $^{+/-}$. На панели С показано, что затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяющихся эксцентрических сокращений. У мышцей, совместно обработанных гAAV.MKK.miR-29с/экспрессирующим микродистрофин гAAV, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn $^{+/-}$ (красный). Двухсторонний дисперсионный анализ. Все данные представляют собой среднее $\pm$ СОС ($^{**}p<0,01$, $^{****}p<0,0001$).

На фиг. 17А-17D показано, что комбинированное лечение увеличивает мышечную гипертрофию через 3 месяца после инъекции. На панели А показано, что гAAV.MKK.miR-29с, совместно доставляемый с гAAV, экспрессирующим микродистрофин, не смог увеличить общую массу инъектированной икроножной мышцы. На панели В показано, что комбинированная обработка гAAV.MKK.miR-29с/экспрессирующим микродистрофин гAAV вызвала увеличение среднего размера волокна. Сравнивая контрольных mdx/utrn $^{+/-}$ с обработанным miR-29с/микродистрофин mdx/utrn $^{+/-}$, средний диаметр увеличился с 28,96 до 36,03 мкм. На панели С показано, что совместная доставка привела к сдвигу в сторону распределения размера волокна как у дикого типа. На панели D показано, что количество мышечных волокон на мм 2 при комбинированной терапии miR-29с/микродистрофин значительно меньше, чем у необработанных мышцей и дикого типа ($^{***}p<0,01$, $^{****}p<0,0001$).

На фиг. 18А, 18В показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1 pAAV.ЦМВ.Mir29с) иллюстративного гAAV-вектора, содержащего зрелую направляющую цепь miR-29с (нуклеотиды 1257-1284) и природный каркас mi-30 (нуклеотиды 1088-1375). Конструкция также содержит промотор ЦМВ (нуклеотиды 120-526), два интрона EF1a в пределах нуклеотидов 927-1087 и 1380-1854, и polA в пределах нуклеотидов 1896-2091.

На фиг. 19 представлена схема гAAV-вектора pAAV.MKK.микродистрофин.

На фиг. 20А-20D показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 9, pAAV.MKK.микродистрофин) иллюстративного гAAV-вектора, экспрессирующего микродистрофин.

На фиг. 21A-21C показана нуклеотидная последовательность нуклеотидной последовательности микродистрофина человека (SEQ ID NO: 7)

На фиг. 22A-22C показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 12 pAAV.MKK.miR29C) иллюстративного gAAV-вектора, содержащего зрелую направляющую цепь miR-29c (нуклеотиды 1487-1512) и природный каркас mi-30 (нуклеотиды 1088-1375). Конструкция также содержит энхансер МКК (нуклеотиды 190-395), промотор МКК (нуклеотиды 396-753), два интрона EF1a в пределах нуклеотидов 1155-1315 и 1609-2083, и polA в пределах нуклеотидов 2094-2148.

Подробное описание изобретения

Согласно данному изобретению предложены геннотерапевтические векторы, например gAAV-векторы, сверхэкспрессирующие микроРНК miR-29, и способы уменьшения и предотвращения фиброза у пациентов с мышечной дистрофией. Согласно данному изобретению также предложены способы комбинированной генной терапии, которые включают в себя введение геннотерапевтического вектора, экспрессирующего miR-29, в комбинации с геннотерапевтическим вектором, экспрессирующим микродистрофин, который удален у пациентов с МДД.

Мышечные биопсии, взятые в самом раннем возрасте диагностики МДД, показывают выраженную пролиферацию соединительной ткани. Мышечный фиброз вреден во многом. Он уменьшает нормальный транспорт эндомиоциальных питательных веществ через барьеры соединительной ткани, уменьшает кровоток и лишает мышцы получаемых через сосуды пищевых компонентов, и функционально способствует ранней утрате способности передвигаться из-за контрактуры конечностей. Со временем трудности лечения увеличиваются в результате выраженного фиброза в мышцах. Это можно наблюдать в биопсиях мышц, сравнивая пролиферацию соединительной ткани в последующие моменты времени. Процесс продолжает усугубляться, приводя к потере способности передвигаться и ускорению выхода из-под контроля, особенно у пациентов, зависящих от инвалидных колясок.

Без параллельного подхода к уменьшению фиброза маловероятно, что преимущества терапий с пропуском экзона, остановкой считывания стоп-кодоном, или заменой гена когда-либо будут полностью реализованы. Даже стратегии с малыми молекулами или заменой белка, скорее всего, потерпят неудачу без подхода, сокращающего мышечный фиброз. Предыдущая работа на мышцах mdx среднего возраста с имеющимся фиброзом, обработанных AAV.микродистрофин, показала, что мы не смогли добиться полного функционального восстановления (Human molecular genetics 22, 4929-4937 (2013)). Известно также, что прогрессирование кардиомиопатии при МДД сопровождается рубцеванием и фиброзом в стенке желудочка. Доставка микроРНК особенно инновационна из-за отсутствия иммунных барьеров и относительной простоты доставки. Микро-РНК - это небольшие (примерно 200 п.н.) и поэтому могут быть упакованы в AAV вместе с терапевтической кассетой для коррекции или обхода генетического дефекта.

Как применяется в данном документе, термин "AAV" является стандартной аббревиатурой для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК парвовирус, который размножается только в клетках, в которых определенные функции обеспечиваются ко-инфицирующим вспомогательным вирусом. В настоящее время существует тринадцать серотипов AAV, которые были охарактеризованы. Общую информацию и обзоры по AAV можно найти, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, p. 169-228, и Berns, 1990, Virology, p. 1743-1764, Raven Press, (New York). Однако нет сомнений, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны как структурно, так и функционально даже на генетическом уровне (см., например, Blacklowe, 1988, p. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; и Rose, Comprehensive Virology 3:1-61 (1974)). Например, все серотипы AAV, по-видимому, обладают очень сходными свойствами репликации, опосредованными гомологичными генами гер; и все они имеют три родственных капсидных белка, таких как те, которые экспрессируются в AAV2. Степень родства дополнительно предсказывается с помощью гетеродуплексного анализа, который показывает обширную кросс-гибридизацию между серотипами по всей длине генома; и наличие аналогичных самоотжигающихся сегментов на концах, которые соответствуют "последовательностям инвертированного концевой повтора" (ITR). Подобные закономерности инфекционности также предполагают, что функции репликации в каждом серотипе находятся под одинаковым регуляторным контролем.

"AAV-вектор", как применяется в данном документе, относится к вектору, содержащему один или большее количество представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевой повтора AAV (ITR). Такие AAV-векторы могут быть реплицированы и упакованы в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована векторном, кодирующим и экспрессирующим продукты генов гер и сар.

"AAV вирион" или "AAV вирусная частица" или "AAV-векторная частица" относится к вирусной частице, состоящей по меньшей мере из одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного AAV-вектора. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (то есть полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его обычно называют "AAV-векторная частица" или просто "AAV-вектор". Таким

образом, продуцирование AAV-векторной частицы обязательно включает в себя получения AAV-вектора, поскольку такой вектор содержится в AAV-векторной частице.

AAV.

Рекомбинантные геномы AAV согласно данному изобретению содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, и один или большее количество ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах гAAV может быть из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая, но не ограничиваясь лишь этими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13. Получение псевдо-типированного гAAV описано, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов гAAV, например гAAV с капсидными мутациями; см., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Как отмечено в разделе "Уровень техники" выше, нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны в данной области техники. Для специфизации специфической для скелетных мышц экспрессии могут применяться AAV1, AAV6, AAV8 или AAVrh.74.

ДНК-плазмиды согласно данному изобретению содержат геномы гAAV согласно данному изобретению. ДНК-плазмиды переносят в клетки, пригодные для инфицирования вспомогательным для AAV вирусом (например, аденовирусом, аденовирусом с удаленным E1, или вирусом герпеса) для упаковки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Методы получения частиц гAAV, в которых в клетку вводят геном AAV, который должен быть упакован, гены гер и сар, и вспомогательные вирусные функции, являются стандартными в данной области техники. Получение гAAV требует, чтобы в одной клетке (обозначенная в данном документе как упаковывающая клетка) присутствовали следующие компоненты: геном гAAV, отделенные от (т.е. не в) генома гAAV гер и сар гены AAV, и функции вспомогательного вируса. Гены гер и сар AAV могут быть из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут быть из серотипа AAV, который отличается от серотипа ITR генома гAAV, включая, но не ограничиваясь лишь этими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAVrh.74, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13. Получение псевдо-типированного гAAV описано, например, в WO 01/83692, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Способ получения упаковывающей клетки заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для продуцирования частиц AAV. Например, плазмиды (или несколько плазмид), содержащая геном гAAV без генов гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV, и маркер селекции, такой как ген устойчивости к неомицину, интегрированы в геном клетки. Геномы AAV были введены в бактериальные плазмиды с помощью таких процедур, как прицельное встраивание GC (Samulski et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления эндонуклеазами рестрикции (Laughlin et al., 1983, *Gene*, 23:65-73) или прямым лигированием тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, *J. Biol. Chem.*, 259:4661-4666). Упаковывающая клеточная линия затем заражается вспомогательным вирусом, таким как аденовирус. Преимущества этого метода заключаются в том, что клетки можно отбирать, и они подходят для крупномасштабного производства гAAV. Другие примеры подходящих способов задействуют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки.

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

Таким образом, согласно изобретению предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном варианте осуществления, упаковывающие клетки могут быть стабильно трансформированными раковыми клетками, такими как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная линия 293). В другом варианте осуществления, упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такими как клетки небольшого числа пассажей 293 (клетки почки плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты плода человека), клетки WI-38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода макака резус).

Рекомбинантные AAV (то есть инфекционные инкапсулированные частицы гAAV) согласно дан-

ному изобретению содержат геном гAAV. В иллюстративных вариантах осуществления, геномы обоих гAAV не содержат ДНК гер и сар AAV, то есть между ITR геномов нет ДНК гер или сар AAV. Примеры гAAV, которые могут быть сконструированы так, чтобы содержать молекулы нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, приведены в международной заявке на патент № PCT/US2012/047999 (WO 2013/016352), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

гAAV может быть очищен стандартными способами данной области техники, такими как колоночная хроматография или градиенты хлорида цезия. Способы очистки гAAV-векторов от хелперного вируса известны в данной области техники и включают в себя способы, описанные, например, в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); патенте США № 6566118 WO 98/09657.

В другом варианте осуществления, в изобретении рассматриваются композиции, содержащие гAAV согласно данному изобретению. Композиции согласно данному изобретению включают в себя гAAV и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно являются инертными в используемых дозах и концентрациях и включают в себя: буферы, такие как фосфатный, цитратный, или на основе других органических кислот; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; полипептиды с низкой молекулярной массой; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, плуроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Титры гAAV, которые будут вводить в способах согласно данному изобретению, будут варьировать в зависимости, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток, которые будут мишенями, и могут быть определены посредством способов данной области техники. Титры гAAV могут находиться в диапазоне от около 1×10^6 , около 1×10^7 , около 1×10^8 , около 1×10^9 , около 1×10^{10} , около 1×10^{11} , около 1×10^{12} , около 1×10^{13} до около 1×10^{14} или больше устойчивых к ДНКазам частиц (DRP) в мл. Дозировки могут также выражаться в единицах геномов вируса (гв).

В изобретении рассматриваются способы трансдукции клетки-мишени с помощью гAAV, *in vivo* или *in vitro*. Способы *in vivo* включают в себя стадию введения эффективной дозы или эффективных многократных доз композиции, содержащей гAAV согласно данному изобретению, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития нарушения/заболевания, введение является профилактическим. Если доза вводится после развития нарушения/заболевания, введение является терапевтическим. В вариантах осуществления изобретения, эффективная доза представляет собой дозу, которая облегчает (устраняет или уменьшает) по меньшей мере один симптом, связанный с состоянием нарушения/заболевания, которое лечат, что замедляет или предотвращает прогрессирование до состояния нарушения/заболевания, которое замедляет или предотвращает прогрессирование состояния нарушения/заболевания, которое уменьшает степень болезни, что приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или продлевает выживание. FSHD представляет собой пример заболевания, которое рассматривается как пригодное для профилактики или лечения способами согласно данному изобретению.

В данном изобретении также рассматриваются комбинированные терапии. Комбинация, применяемая в данном документе, включает в себя как одновременное лечение, так и последовательное лечение. Специально рассматриваются комбинации способов согласно данному изобретению с стандартными лекарственными терапиями (например, кортикостероидами), как и комбинации с новыми терапиями.

Введение эффективной дозы композиций может осуществляться стандартным путями, которые включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: внутримышечный, парентеральный, внутривенный, пероральный, буккальный, назальный, легочный, внутричерепной, внутрикостный, внутриглазной, ректальный или вагинальный. Маршрут(ы) введения и серотип(ы) компонентов AAV гAAV (в частности, ITR AAV и капсидный белок) согласно данному изобретению могут быть выбраны и/или сопоставлены специалистами в данной области техники, с учетом инфекции и/или состояния болезни, что подлежит лечению, и целевых клеток/ткани(тканей), которые должны экспрессировать микроРНК miR-29 и/или микродистрофин.

Согласно данному изобретению предложены местное введение и системное введение эффективной дозы гAAV и композиций согласно данному изобретению, включая комбинированную терапию согласно данному изобретению. Например, системное введение - это введение в систему кровообращения, чтобы повлиять на весь организм. Системное введение включает в себя энтеральное введение, такое как абсорбция через желудочно-кишечный тракт и парентеральное введение путем инъекции, вливания или имплантации.

В частности, фактическое введение гAAV согласно данному изобретению может быть выполнено с

использованием любого физического метода, который будет переносить рекомбинантный гAAV-вектор в ткань-мишень животного. Введение согласно изобретению включает в себя, но не ограничивается лишь этими: инъекцию в мышцу, кровоток и/или непосредственно в печень. Было продемонстрировано, что просто ресуспендирование гAAV в фосфатно-солевом буфере является достаточным для получения переносчика, применимого для экспрессии в мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений на носители или другие компоненты, которые могут быть введены совместно с гAAV (хотя для гAAV следует обычным способом избегать композиций, которые разрушают ДНК). Капсидные белки гAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы гAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца; см., например, WO 02/053703, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных препаратов или в виде местных составов, для доставки в мышцы путем трансдермального транспорта. Ранее были разработаны многочисленные составы для внутримышечной инъекции и трансдермального транспорта, и они могут быть применены в практике изобретения. гAAV могут быть использованы с любым фармацевтически приемлемым носителем для удобства введения и обращения.

Доза вводимого гAAV в способах, раскрытых в данном документе, будет варьировать в зависимости, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток, и может определяться способами, стандартными в данной области техники. Титры каждого вводимого гAAV могут находиться в диапазоне от около 1×10^6 , около 1×10^7 , около 1×10^8 , около 1×10^9 , около 1×10^{10} , около 1×10^{11} , около 1×10^{12} , около 1×10^{13} , около 1×10^{14} , до около 1×10^{15} или больше устойчивых к ДНК-зам частиц (DRP) в мл. Дозы могут также выражаться в единицах геномов вируса (гв) (т.е. 1×10^7 гв, 1×10^8 гв, 1×10^9 гв, 1×10^{10} гв, 1×10^{11} гв, 1×10^{12} гв, 1×10^{13} гв, 1×10^{14} гв, 1×10^{15} соответственно). Дозы могут также выражаться в единицах геномов вируса (гв) на килограмм (кг) массы тела (т.е. 1×10^{10} гв/кг, 1×10^{11} гв/кг, 1×10^{12} гв/кг, 1×10^{13} гв/кг, 1×10^{14} гв/кг, 1×10^{15} гв/кг соответственно). Способы титрования AAV описаны в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039 (1999).

В частности, фактическое введение гAAV согласно данному изобретению может быть выполнено с использованием любого физического метода, который будет переносить рекомбинантный гAAV-вектор в ткань-мишень животного. Введение согласно изобретению включает в себя, но не ограничивается лишь этими: инъекцию в мышцу, кровоток и/или непосредственно в печень. Было продемонстрировано, что просто ресуспендирование гAAV в фосфатно-солевом буфере является достаточным для получения переносчика, применимого для экспрессии в мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений на носители или другие компоненты, которые могут быть введены совместно с гAAV (хотя для гAAV следует обычным способом избегать композиций, которые разрушают ДНК). Капсидные белки гAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы гAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца; см., например, WO 02/053703, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных препаратов или в виде местных составов, для доставки в мышцы трансдермальным транспортом. Ранее были разработаны многочисленные составы для внутримышечной инъекции и трансдермального транспорта, и они могут быть применены в практике изобретения. гAAV могут быть использованы с любым фармацевтически приемлемым носителем для удобства введения и обращения.

Для внутримышечной инъекции могут быть использованы растворы в адьюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или водный раствор пропиленгликоля, а также стерильные водные растворы. При желании такие водные растворы могут быть забуферены, а жидкий разбавитель сначала подвергается изотоническому воздействию солевого раствора или глюкозы. Растворы гAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсия гAAV также может быть приготовлена в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и применения данные препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В связи с этим применяемые стерильные водные среды легко доступны для получения стандартными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Фармацевтические носители, разбавители или наполнители, пригодные для инъекционного применения, включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии, и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной, и должна быть текучей в той степени, чтобы существовала возможность ее ввести с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси, и растительные масла. Нужную текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, и с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть достигну-

то различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобным. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Продленная абсорбция инъектируемых композиций может быть достигнута за счет применения агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций получают путем внесения гAAV в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем внесения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления инъектируемых стерильных растворов, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и метод сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента, плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Трансдукция с помощью гAAV также может проводиться *in vitro*. В одном варианте осуществления, желаемые мышечные клетки-мишени удаляют из субъекта, трансдуцируются гAAV и повторно вводят субъекту. Альтернативно, могут применяться изогенные или ксеногенные мышечные клетки, поскольку данные клетки не будут вызывать неуместный иммунный ответ у субъекта.

Подходящие способы трансдукции и реинтродукции трансдуцированных клеток в субъект известны в данной области техники. В одном варианте осуществления, клетки могут быть трансдуцированы *in vitro* путем объединения гAAV с мышечными клетками, например, в соответствующей среде, и проведен поиск клеток, несущих ДНК интереса, с использованием обычных методов, таких как саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с использованием селективных маркеров. Затем трансдуцированные клетки могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций, а композицию вводят субъекту различными способами, такими как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция, или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу, используя, например, катетер.

Трансдукция клеток с помощью гAAV по изобретению приводит к устойчивой экспрессии miR-29 или микродистрофина. Таким образом, данное изобретение относится к способам введения/доставки гAAV, который экспрессирует miR-29 и/или микродистрофин, животному, предпочтительно человеку. Данные способы включают в себя трансдуцирование тканей (включая, но не ограничиваясь лишь тканями, такими как мышцы, органами, такими как печень и мозг, и железами, такими как слюнные железы) одним или большим количеством гAAV согласно данному изобретению. Трансдукция может быть проведена с помощью генных кассет, содержащих специфичные для ткани регуляторные элементы. Например, в одном варианте осуществления, согласно данному изобретению предложены способы трансдуцирования мышечных клеток и мышечных тканей, управляемые с помощью специфических для мышц регуляторных элементов, включающих в себя, но не ограничивающихся лишь этими: те, которые получены из семейств генов актина и миозина, например, из семейства генов myoD [см. Weintraub et al., *Science*, 251: 761-766 (1991)], специфичный для миоцитов энхансер-связывающий фактор MEF-2 [Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)], регуляторные элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека [Muscat et al., *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], гена актина сердца, последовательности элементов креатинкиназы мышц [см. Johnson et al., *Mol Cell Biol*, 9:3393-3399 (1989)] и энхансерный элемент мышинной креатинкиназы (mCK), регуляторные элементы, полученные из гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца и гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон: индуцируемые гипоксией ядерные факторы (Semenza et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5680-5684 (1991)), стероид-индуцибельные элементы и промоторы, включающие в себя глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993)) и другие регуляторные элементы.

Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и легкодоступна. В изобретении рассматривается устойчивая экспрессия микроРНК из трансдуцированных миофибрил.

Под "мышечной клеткой" или "мышечной тканью" подразумевается клетка или группа клеток, полученных из мышц любого вида (например, скелетных мышц и гладких мышц, например, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или сердечной ткани). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, такими как миообласты, миоциты, миотубы, кардиомиоциты и кардиомиообласты.

Термин "трансдукция" применяется для обозначения введения/доставки направляющей цепи miR29 или кодирующей области микродистрофина в клетку-реципиент либо *in vivo*, либо *in vitro*, с помощью гAAV с дефектом репликации согласно данному изобретению, что приводит к экспрессии miR29 или микродистрофина клеткой-реципиентом.

Таким образом, согласно данному изобретению предложены способы введения пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной дозы (или доз, вводимых, по существу, одновременно или через заданные

интервалы) гAAV, который кодирует miR29 и/или микродистрофин.

Примеры

Пример 1. Подтверждение моделей мышечной дистрофии Дюшенна.

Мышь mdx обеспечивает удобную, но неполную животную модель для изучения патогенеза DMD. Данная модель представляет собой гибрид мыши mdx с гетерозиготной нокаутной линией по гену атрофина ($mdx:utrn^{+/-}$), которая существует с повышенным фиброзом и более точно повторяет патологию МДД человека. Мыши mdx имеют нонсенс-мутацию в экзоне 23 МДД, результатом чего является относительно мягкий фенотип и почти нормальная продолжительность жизни. К 3-недельному возрасту диафрагма и мышцы конечностей мышей md обретают признаки эндомизиального воспаления. Данные симптомы уменьшаются в мышцах конечностей после того, как мыши достигают зрелости, а воспаление в мышцах диафрагмы продолжает постепенно ухудшаться. У мышей mdx, лишенных теломеразы, мышечная дистрофия прогрессивно ухудшается с возрастом; мыши mdx, у которых отсутствует атрофин (DKO), имеют фенотип, более характерный для человеческого МДД с ранним проявлением мышечной слабости, сильным фиброзом и преждевременной смертью. Атрофин, аутомный паралог дистрофина, обладает высокой степенью гомологии последовательности, который может компенсировать отсутствие дистрофина у мыши mdx с двойным KO (дистрофин плюс атрофин); наблюдается тяжелый фенотип с ранней смертью. Преждевременная смерть мыши DKO препятствует прогрессированию воспаления и фиброза, но мышь $mdx:utrn^{+/-}$ представляет собой модель, сходную с человеческим заболеванием, проявляющая внушительную степень фиброза и более длительную выживаемость, чем DKO, обеспечивая лучшую модель для наших предлагаемых исследований, передаваемых в клиническую практику. Недавний отчет подтверждает использование мыши $mdx:utrn^{+/-}$ как идеальной модели для изучения фиброза в контексте МДД. В данном исследовании увеличение фиброза, измеряемое окрашиванием сириус-красным, сопровождалось увеличением уровней транскрипта коллагена и снижением уровней miR29c.

Пример 2. Доставка miR29 мышам МДД снижает фиброз.

Предварительные исследования показали, что наблюдается значительное увеличение окрашивания сириус-красным коллагена и снижение уровней miR-29c у пациентов-людей с МДД и мыши $mdx:utrn^{+/-}$. Доставка гена miR-29 с использованием AAV-векторов, специфичных для мышц, потенциально безопасна и эффективна. Для получения гAAV-вектора, обозначенного в данном документе как gAAVrh.74.ЦМВ.miR29c, последовательность miR29c из 22 нуклеотидов (направляющая цепь SEQ ID NO: 3 и направляющая цепь SEQ ID NO: 4) была клонирована в каркас miR-30, под управлением промотора ЦМВ. Экспрессионная кассета (SEQ ID NO: 2) была клонирована в самокомплементарную плазмиду AAV и упакована с использованием AAVrh.74, серотипа, который, как известно, хорошо экспрессируется в мышцах. кДНК miR-29c синтезировали применяя специальный праймер, содержащий цепь-мишень (смысловую) miR-29c, петлю-на-стебле miR-30 и направляющую (антисмысловую) цепь miR-29c в каркасе miR-30. Были модифицированы три основания последовательности miR-29c. Затем данную последовательность клонировали в самокомплементарную AAV содержащую ITR плазмиду, под управлением промотора ЦМВ и последовательности polyA.

Как показано на фиг. 1, плазида rAAV.ЦМВ.miR29C содержит кДНК miR29c в каркасе петли-на-стебле miR-30, фланкированную последовательностями инвертированного концевой повтора AAV2 (ITR). Именно данная последовательность была инкапсидирована в вирионы AAVrh.74. Кроме того, несколько нуклеотидов с последовательностью-мишенью miR-29c были изменены для того, чтобы имитировать создание пар по Уотсону-Крику в данном сайте, как в мшРНК-miR(luc). Согласно дизайну мшРНК-luc, шпилька должна быть идеально комплементарной по всей длине. Кроме того, чем больше изменений в сопровождающей цепи, тем вероятнее устранение любого эндогенного механизма, который регулирует процессинг miR-29, которая могла бы распознать микроРНК через стебель. 19-тое основание направляющей цепи было модифицировано на цитозин, чтобы имитировать нуклеотид, который предшествует сайту расщепления в природной последовательности mi-29c, и соответствующее основание на другой цепи было изменено для сохранения спаривания.

Генотерапевтический вектор scAAVrh.74.ЦМВ.miR29c (1×10^{11} гв) вводили в четырехглавую мышцу 3-месячной $mdx:utrn^{+/-}$ мыши. Четырехглавую мышцу анализировали через 3 месяца после инъекции окрашиванием сириус-красным и анализировали с помощью программного обеспечения NIH ImageJ как описано в Nevo et al. (PloS One, 6: e18049 (2011)). Уровни miR29c, коллагена и эластина определяли с помощью RT-PCR. Доставка miR-29c в молодых $mdx:utrn^{+/-}$ мышей значительно увеличивает уровни miR-29c и значительное снижение окрашивания сириусом красным в четырехглавой мышце 6-месячных $mdx:utrn^{+/-}$ мышей (через 3 месяца после инъекции). Наблюдалось снижение уровней коллагена и эластина в обработанных мышцах при оценке количественной ПЦР.

Демонстрация увеличенного фиброза и сниженной экспрессии miR29 у мышей $mdx:utrn^{+/-}$ и пациентов с дефицитом дистрофина подтверждают, что мышинная модель является замещающей для человеческого заболевания. Первоначальные результаты с применением доставленной с помощью AAV miR29 в качестве антифибротической терапии свидетельствуют о том, что существует значительный положительный эффект с уменьшением окрашивания сириус-красным, и уровней коллагена и эластина, которые являются ключевыми факторами фиброза.

Пример 3. Инъекция MiR-29с снижает количество коллагена и восстанавливает miR-29с.

Чтобы определить, может ли gAAVrh.74.ЦМВ.MiR-29с уменьшить фиброз, 12-недельные мыши mdx/utrn^{+/-} получали внутримышечную инъекцию gAAVrh.74.ЦМВ.MiR-29с с 5×10^{11} гв в левую икроножную мышцу (GAS). Мышей анализировали через 12 недель после инъекции. Окрашивание пикросириус-красным показало значительное снижение окрашивания коллагена во всем объеме икроножных мышц (фиг. 2A) по сравнению с необработанной контралатеральной икроножной мышцей mdx/utrn^{+/-}. Количественная оценка окрашивания пикросириус-красным показала, что обработанная мышца имела на 18,3% уменьшения коллагена по сравнению с необработанной мышцей (обработанная - $23,3\% \pm 1,3$ против необработанной - $29,5\% \pm 0,7$) (фиг. 2B). Чтобы подтвердить избыточную экспрессию miR-29с в обработанной мышце, общую РНК выделяли из икроножной мышцы из мышей ДТ 24-недельного возраста, обработанных miR-29с и mdx/utrn^{+/-}, и подвергали количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для анализа экспрессии miR-29с. Результаты показали, что количество miR-29 было значительно увеличено в икроножной мышце обработанных мышей по сравнению с необработанными мышцами (фиг. 2D).

Пример 4. MiR-29с улучшает абсолютную и удельную мышечную силу, но не защищает от вызванного сокращением повреждения.

Зная, что фиброз может влиять на функцию мышц, мы хотели проверить, может ли снижение фиброза путем увеличения экспрессии miR-29с защитить мышцу mdx/utrn^{+/-} от травмы, вызванной сокращением, и увеличить общую силу. Были оценены функциональные свойства икроножной мышцы из мышей mdx/utrn^{+/-}, обработанных gAAVrh.74.ЦМВ.MiR-29с. Через 12 недель после инъекции получали икроножные мышцы для проведения измерений силы *in vivo*.

Процедура с икроножной мышцей следует протоколу, указанному в Hakim et al. (Methods Mol Biol. 709: 75-89, 2011) для анализа физиологии поперечной брюшной мышцы, но адаптированного для икроножной мышцы. Вкратце, мышцей анестезировали с использованием смеси кетамин/ксилазин. Кожа задней конечности была удалена, чтобы обнажить икроножную мышцу и ахиллово сухожилие. Дистальное сухожилие было вскрыто, и двойной прямой узел был связан вокруг сухожилия нитью 4-0 как можно ближе к мышце, другой двойной прямой узел был связан прямо возле первого узла, а затем сухожилие разрезали. Обнаженную мышцу постоянно увлажняли физиологическим раствором. Мыши затем переносили на терморегулируемую платформу и поддерживали при 37°C. Колено было прикреплено к платформе иглой через сухожилие коленной чашечки, сухожильный шов к уровню плеча силового преобразователя (Auroga Scientific, Auroga, ON, Канада), и нога была закреплена лентой. Мышечные сокращения икроножной мышцы были вызваны стимуляцией седалищного нерва через биполярные платиновые электроды. Как только мышца стабилизировалась, оптимальная длина определялась путем постепенного растяжения мышцы до тех пор, пока не достигалась максимальная сила сокращения. После 3-минутного периода отдыха икроножную мышцу стимулировали 50, 100, 150 и 200 Гц, делая 1-минутный период отдыха между каждым стимулом для определения максимальной тетанической силы. Измеряли длину мышцы. После 5-минутного отдыха оценивали восприимчивость икроножной мышцы к повреждению, вызванному сокращением. После 500 мс стимуляции мышцу удлиняли на 10% от оптимальной длины. Этого достигали, стимулируя мышцу 150 Гц в течение 700 мс. После стимуляции мышцу возвращали к оптимальной длине. Цикл повторяли каждую минуту в течение всего 5 циклов. Удельная сила была рассчитана путем деления максимальной тетанической силы на площадь поперечного сечения икроножной мышцы. После эксцентрических сокращений мышцей подвергали эвтаназии, и икроножную мышцу иссекали, взвешивали и замораживали для анализа.

Каждый икроножную мышцу подвергали серии повторяемых эксцентрических сокращений. Сравнивая отношение силы каждого сокращения по сравнению с первым сокращением, выяснилось, что после пятого сокращения необработанная мышца ослаблялась до $0,56 \pm 0,05$ против $0,50 \pm 0,04$ ($p < 0,0001$). Инъектированная группа показала небольшое снижение степени защиты по сравнению с контролем ДТ, при ослаблении до $0,92 \pm 0,02$ (фиг. 3C). Эти данные показывают, что уменьшение фиброза за счет увеличения экспрессии miR-29с приводит к увеличению как абсолютной, так и удельной силы, но не обеспечивает значительной защиты мышц от травмы, вызванной сокращением.

Обработанная gAAVrh.74.MiR-29с икроножная мышца показала значительное улучшение абсолютной силы по сравнению с необработанной икроножной мышцей mdx/utrn^{+/-} (gAAV.miR-29с - $2277 \pm 161,7$ против необработанной mdx/utrn^{+/-} - $1722 \pm 145,7$, фиг. 3a), а также специфическое улучшение нормированной удельной силы в обработанной gAAVrh.74.miR-29с икроножной мышце, по сравнению с необработанной икроножной мышцей (gAAV.miR-29с - $204,7 \pm 11,7$ против необработанной mdx/utrn^{+/-} - $151,6 \pm 14,5$, фиг. 3b). Сила по-прежнему значительно снижалась по сравнению с контролем дикого типа (gAAV.miR-29с - $204,7 \pm 11,7$ против дикого типа - $312,0 \pm 34,1$).

Пример 5. Совместная с микродистрофином доставка дополнительно снижает фиброз.

Чтобы определить, был ли подход с комбинированной генной терапией miR-29с/микродистрофин более предпочтительным для снижения фиброза, 12-недельные мыши mdx/utrn^{+/-} получали внутримышечную инъекцию gAAVrh.74.ЦМВ.MiR-29с при 5×10^{11} гв в левую икроножную мышцу. Следующие

геннотерапевтические векторы вводили внутримышечной инъекцией (ИМ) в левую икроножную мышцу (GAS) 3-месячных мышей *mdx/utrn*^{+/-}, мышшиной модели МДД: только scAAVrh.74.ЦМВ.miR-29с, доставлен с gAAVrh.74.МКК.микродистрофин, и только gAAVrh.74.МКК.микродистрофин.

Плазмида pAAV.МКК.микродистрофин содержит экспрессионную кассету кДНК микродистрофина человека, фланкированную последовательностями концевой инвертированного повтора AAV2 (ITR), как показано на фиг. 10. Именно данную последовательность инкапсидировали в вирионы AAVrh.74. Плазмиду pAAV.МКК.микродистрофин конструировали, вставляя экспрессионную кассету МКК, управляющую кодон-оптимизированной последовательностью кДНК микродистрофина человека, в AAV-вектор клонирования, как описано в Rodino-Klapac et al. (Mol Ther. 2010 Jan; 18(1): 109-17). Последовательность промотора/энхансера МКК использовали для управления экспрессией генов, специфичных для мышц, и она состояла из сердцевин энхансера МКК мыши (206 пар оснований), слитой с сердцевиной промотора МКК 351 п.о. (проксимальным). После сердцевины промотора следует 53 п.н. экзон-1 МКК мыши (нетранслируемый), для эффективной инициации транскрипции, за которым следуют сплайс сигналы поздних 16S/19S SV40 (97 п.н.) и небольшой 5'UTR (61 п.н.). Интрон и 5'-UTR получают из плазмиды pЦМВβ (Clontech). Кассета с микродистрофином имеет консенсус Козак сразу перед стартовым кодоном ATG и небольшой синтетический сигнал полиА из 53 п.н. для терминации мРНК. Кассета микродистрофина человека содержит (R4-R23/Δ71-78) домены. Комплементарная ДНК была кодон-оптимизированной для использования в человеке и синтезированная с помощью GenScript (Пискатауэй, Нью-Джерси).

Мышей анализировали через 12 и 24 недели после инъекции. Сперва использовали количество мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин, для оценки эффективности доставки трансгена и чтобы убедиться, что мы имели одинаковые количества микродистрофина, экспрессированного в каждой группе. Мы обнаружили, что микродистрофин не отличается в разных группах, обработанных только микродистрофином ($71,85 \pm 2,25\%$) по сравнению с комбинированной терапией miR-29с/микродистрофин ($75,03 \pm 1,91\%$) (фиг. 4).

Икроножные мышцы анализировали через 12 месяцев после инъекции для оценки накопления коллагена с помощью окрашивания сириус-красным и последующей количественной оценки с помощью ImageJ. Дополнительные результаты включали уровни транскриптов miR-29с и коллагена, измерения силы в икроножной мышце, измерения диаметра волокна и анализ вестерн-блоттинг для белков, участвующих в регенерации мышц (MyoD, Myogenin). Количество фиброза было проанализировано окрашиванием пикросириус-красным, которое выявило значительное снижение окрашивания коллагена во всех икроножных мышцах во всех обработанных группах (фиг. 5А) по сравнению с необработанной контрольной икроножной мышцей *mdx/utrn*^{+/-} или обработанной только микродистрофином. Количественное определение окрашиванием пикросириус-красным показывает, что совместно обработанная мышца имела на 40,8% процентов уменьшенное количество коллагена по сравнению с необработанной мышцей (обработанная - $17,47\% \pm 0,75$ против необработанной - $29,5 \pm 0,7$) (фиг. 5В). Чтобы подтвердить экспрессию miR-29с, ОТ-ПЦР проводили на икроножной мышце, и все группы лечения имели увеличение miR-29с по сравнению с необработанной мышцей (фиг. 5С).

Аналогично ткани МДД наблюдалось значительное снижение уровней miR-29с в мышцах *mdx/utrn*^{+/-}, что коррелировало с увеличением фиброза, как измерено окрашиванием пикросириус-красным. После 3 месяцев обработки только scAAV.miR-29с наблюдалось значительное снижение фиброза (обработанная - $23,5 \pm 1,3$ против необработанной - $27,8 \pm 0,6$) в икроножной мышце. При доставке с микродистрофином наблюдалось дополнительное снижение количества коллагена (41%) при окрашивании пикросириус-красным (комбинированная обработка: $17,47 \pm 0,75$ против необработанной: $29,5 \pm 0,7$) ($p < 0,0001$) (фиг. 5В). Чтобы подтвердить экспрессию miR-29с, проводили ОТ-ПЦР с икроножной мышцей, и все группы лечения имели увеличение miR-29с по сравнению с необработанной мышцей (фиг. 5В).

Через 24 недели после инъекции результаты были аналогичны тем, которые наблюдались через 12 недель после инъекции. Уменьшение коллагена составляло 47%, как определено окрашиванием пикросириус-красным, по сравнению с необработанной мышцей (комбинированная терапия: $16,5 \pm 1,23$ против необработанной: $31,07 \pm 0,93$, $p < 0,0001$) и одновременное увеличение уровня транскрипции miR-29с.

Для дополнительного подтверждения снижения количества коллагена, наблюдаемого при окрашивании пикросириус-красным, проводили ОТ-ПЦР с мышцей для количественного определения уровней транскриптов Col1A, Col3A, а также другого компонента ВКМ, фибронектина (Fbn). Анализ ОТ-ПЦР показал уменьшение количества Col1A и Col3A после каждой обработки, однако только группа, обработанная как микродистрофином, так и miR-29с, показала значительное снижение (фиг. 6А и 6В). Анализ показал, что Fbn был значительно снижен только в совместно обработанной группе (фиг. 6С).

Ранее было показано, что уровень TGF-β1 повышен в дистрофической мышце, что, вероятно, играет роль в инициировании фиброзного каскада. TGF-β1 является известным про-фибротическим цитокином, который снижает уровень miR-29с и ответственен за превращение миоцитов в миофибробласты с увеличением коллагена и мышечного фиброгенеза. Анализ ОТ-ПЦР показывает, что совместно обрабо-

танная мышца имела значительно более низкие уровни TGF- β 1 по сравнению с необработанной мышцей и с обработками по отдельности (фиг. 6D). Через 6 месяцев после инъекции совместно обработанная мышца продолжала демонстрировать снижение уровней Col1A, Col3A, Fbn и TGF- β 1, тогда как наблюдалось лишь незначительное снижение уровней мРНК Col1A в группах, обработанных только miR-29 и только микродистрофином.

Увеличение удельной и абсолютной силы наблюдалось в мышце, обработанной только miR-29с, по сравнению с необработанной конечностью, который в сочетании с микродистрофином приводил к таким абсолютной и удельной силам, который не отличались от таковых дикого типа. Мы также наблюдали значительное увеличение массы тех икроножных мышц, которые были совместно обработаны.

Первоначальные результаты, полученные с помощью gAAV.miR-29с в качестве анти-фибротической терапии, свидетельствуют о благоприятном эффекте в виде снижения уровня коллагена, ключевого фактора фиброза. Кроме того, в сочетании с микродистрофином для улучшения стабильности мембраны, повышение уровня miR29 нормализует мышечную силу.

Пример 6. Дополнительное увеличение абсолютной силы и добавленная защита от повреждения, вызванного сокращением.

Зная, что мышца, обработанная miR-29, имела умеренное, но значительное увеличение абсолютной и специфической силы, было исследовано влияние комбинированной терапии сверхэкспрессии miR-29с и замещения гена микродистрофина на функцию мышцы. Через 12 недель после инъекции мы выделили икроножную мышцу, для которой мы выполнили измерения силы *in vivo*. Вектор gAAVrh.74.MiR-29с описанный выше в примере 2, и gAAV.

Совместно обработанная gAAVrh.74.MiR-29с и gAAV, экспрессирующим микродистрофин, икроножная мышца продемонстрировала значительное улучшение абсолютной силы по сравнению с необработанной икроножной мышцей mdx/utrn^{+/+} (совместно обработанная - $3582,4 \pm 79,4$ нМ против необработанной mdx/utrn^{+/+} - $1722 \pm 145,7$ нМ против дикого типа - $3005 \pm 167,3$ нМ) (фиг. 7), а также специфическое улучшение нормированной удельной силы в обработанной gAAVrh.74.miR-29с/микродис икроножной мышце, по сравнению с необработанной икроножной мышцей (совместно обработанные мыши - $244,2 \pm 6,6$ нМ/мм² против необработанных mdx/utrn^{+/+} - $151,6 \pm 14,5$ нМ/мм² против $312,0 \pm 34,1$ нМ/мм²) (фиг. 7). И абсолютная и удельная силы существенно не отличались от контрольного дикого типа.

Каждую икроножную мышцу подвергали серии повторяемых эксцентрических сокращений. Сравнивая отношение силы каждого сокращения с первым сокращением, выяснилось, что после пятого сокращения необработанная мышца ослаблялась до $0,54 \pm 0,06$ по сравнению с совместно обработанной $0,66 \pm 0,04$ ($p < 0,0001$), что может быть объяснено вкладом микродистрофин, поскольку обработанная только микродистрофином также ослаблялась до $0,66 \pm 0,04$. Обработанная группа была все еще значительно ниже, чем дикий тип, который ослаблялся до $0,92 \pm 0,02$ (фиг. 7C). Аналогичные результаты были обнаружены через 24 недели после инъекции. Эти данные показывают, что снижение фиброза и замена гена приводит к увеличению как абсолютной, так и удельной сил, и значительно защищает мышцы от повреждения, вызванного сокращением.

Пример 7. Комбинированное лечение увеличивает мышечную гипертрофию и гиперплазию.

MiR-29с, ко-доставляемый с микродистрофином, увеличивал общую массу инъектированной икроножной мышцы по сравнению теми, что были инъектированы каждым по отдельности в течение трех месяцев (фиг. 8, фиг. 9A). Чтобы исследовать источник увеличенной мышечной массы, измеряли диаметры миофибрил. miR-29с/ μ -dys комбинированное лечение продемонстрировало увеличение среднего размера волокна. Сравнивая контрольных mdx/utrn^{+/+} с обработанными miR-29с/ μ -dys mdx/utrn^{+/+}, средний диаметр увеличился с 25,96 до 30,97 мкм (фиг. 9B). Совместная доставка привела к сдвигу распределения размера волокна к таковому дикого типа (фиг. 9C). Хотя средний размер волокна был увеличен, это не объясняет увеличение массы мышц на 30%. Также измерялась общая площадь поперечного сечения мышцы. Были полностью сканированы икроножные мышцы из всех групп, и измерена общая площадь. Мышцы, совместно обработанные микродистрофин/miR-29с, имели значительное увеличение площади поперечного сечения по сравнению с необработанными и обработанными только чем то одним (неинъектирована: 24,6 в сравнении с miR-29с: 26,3 в сравнении с микродистрофином: 26,6 в сравнении с микродистрофин/ miR-29с: 33,1) (фиг. 8, 9D).

Собобщалось, что miR-29 участвует в пути *MyoD/MyoD7/миогенин*, и было высказано предположение, что miR-29с может влиять на регенерацию и активацию клеток-сателлитов (мышечных стволовых клеток), приводя к их дифференциации в миогенную линию. Чтобы проверить это, было подсчитано общее количество мышечных волокон из полных сканированных изображений. Увеличенное количество мышечных волокон после комбинированной терапии miR-29с/ μ -dys (фиг. 9E). Наконец, учитывая, что диаметр мышечных волокон у мышей mdx/utrn^{+/+} является гетерогенным со многими малыми волокнами и некоторыми гипертрофированными волокнами, было определено, влияет ли обработка на количество волокон на единицу площади (клетки/мм²). Обработка комбинацией miR-29с/ μ -dys не отличалась от дикого типа (фиг. 9F).

Пример 8. Раннее лечение комбинацией предотвращает фиброз.

Принимая во внимание потенциальную важность комбинирования miR-29c и микродистрофина в качестве профилактической терапии для МДД, группу молодых мышей mdx/utrn^{+/+} лечили в возрасте 4 недель. Используя ту же парадигму, что и для других групп, описанных в данном документе, сравнивали следующие обработки по эффективности предотвращения фиброза, вводимые путем внутримышечной инъекцией в икроножную мышцу: scAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c, ssAAVrh74.ММК.микродистрофин+scAAVrh.74.ЦМВ.miR-29c или только ssAAVrh74.ММК.микродистрофин, в одинаковых дозах. Мышей умерщвляли через 12 недель после инъекции. Наблюдалось значительное снижение окрашивания коллагена в икроножных мышцах во всех обработанных группах по сравнению с необработанной контралатеральной икроножной мышцей mdx/utrn^{+/+} (фиг. 10А). Количественное определение окрашивания пикросириус-красным показало, что совместно обработанная с помощью микродистрофин/miR-29c мышца имела 51% снижение коллагена по сравнению с необработанной мышцей (обработанная - $11,32 \pm 1,18$ в сравнении с необработанной - $23,15 \pm 0,90$) ($p < 0,0001$) (фиг. 10) и ОТ-ПЦР подтвердила снижение Col1A, Col3A, Fbn и TGF- β 1 после комбинированной терапии (фиг. 10D и E).

Пример 9. Ранняя комбинированная терапия восстанавливает силу и защищает от вызванного сокращением повреждения лучше позднего лечения.

Измерение силы *in vivo* проводилось на икроножных мышцах мышей, которых лечили на ранней стадии комбинированной терапией, как описано в примере 8. У 4-недельных мышей mdx/utrn^{+/+} совместно обработка с использованием miR-29c/микродистрофин показала значительное улучшение абсолютной силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn^{+/+}, и не было никакой разницы по сравнению с диким типом (совместно обработанные: $2908 \pm 129,5$ мН в сравнении с необработанными: $1639,4 \pm 116,9$ мН в сравнении с диким типом: $3369,73 \pm 154,1$ мН). Удельная сила также была нормирована по уровням дикого типа после комбинированной терапии (совместно обработанные $338,9 \pm 22,34$ мН/мм² в сравнении с необработанными $184,3 \pm 13,42$ мН/мм² в сравнении с ДТ $364,3 \pm 7,79$ мН/мм²) (фиг. 11А, В и 12).

Затем каждую икроножную мышцу подвергался серии повторяемых эксцентрических сокращений. Сравнивая отношение силы каждого сокращения с пятым сокращением, необработанная мышца ослаблялась до $0,53 \pm 0,04$ по сравнению с совместно обработанной $0,82 \pm 0,04$ ($p < 0,0001$). Группа комбинированного лечения была несколько ниже дикого типа, но не сильно отличалась, с ослаблением до $0,93 \pm 0,01$ (фиг. 11С). Эти данные показывают, что снижение фиброза и замена гена приводит к увеличению как абсолютной, так и удельной силы и существенно защищает мышцы от травмы, вызванной сокращением.

Данные эксперименты предполагают, что замена гена должна начинаться в неонатальный период. Усилия явно прилагаются в направлении идентификации МДД и других мышечных дистрофий в неонатальный период. Исследование скрининга новорожденных в Огайо иллюстрирует потенциал идентификации МДД у новорожденных с использованием СК 7 Neurol. в качестве биомаркера (>2000 Ед./ю) с ДНК-подтверждением на том же высушенном пятне крови (Mendell et al., Ann. Neurol. 71: 304-313, 2012). Данная методология теперь распространяется в другие штаты США (PPMD 16 мая 2016 г.: следующие шаги в скрининге новорожденных) и в других странах, особенно в Великобритании (Британский национальный комитет по скринингу) и в Китае (Perkin ElmerTM запускает скрининг в Китае).

miR-29 также показала себя перспективной в качестве способа лечения сердечного, легочного и печеночного фиброза. Инфаркт миокарда у мышей и людей связан с снижением уровня miR-29. Rooij et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:13027-13032, 2008) продемонстрировали, что воздействие миметика miR-29b на фибробласты уменьшает количество транскриптов коллагена, обеспечивая путь для перехода к клиническому применению при сердечном фиброзе. Последующие исследования показали, что в модели мышинного легочного фиброза, индуцированного блеомицином, ослабление фиброза может быть достигнуто с помощью miR-29b.14., доставляемого системой Sleeping Beauty (SB) на основе транспозона. В настоящее время миметик miR-29b находится в клинической фазе 1 безопасности-допустимости локального внутрикожного испытания на здоровых добровольцах (miRagen TherapeuticsTM MRG-201). По сравнению с доставкой олигонуклеотида miR-29, которая потребовала бы повторяемого введения, связанного с периодом полувыведения олигонуклеотидов, генная терапия AAV могла бы потенциально обеспечить путь для одиночного переноса-доставки гена.

Пример 10. Лечение с помощью специфичной для мышц экспрессии miR-29 и микродистрофина снижает фиброз и экспрессию ВКМ.

AAV-векторы, содержащие последовательность miR29c и специфичный для мышц промотор ММК, также получали и тестировали в качестве комбинированной терапии вместе с AAV-векторами, экспрессирующими микродистрофин. Для получения гAAV-вектора, обозначенного в данном документе как гAAV.ММК.miR.29c, 22-ух нуклеотидная последовательность miR29c (цепь-мишень SEQ ID NO: 3 и направляющая цепь SEQ ID NO: 4) была клонирована в каркас miR-30, под управлением промотора ММК (SEQ ID NO: 11). Экспрессионную кассету (SEQ ID NO: 12) клонировали в одноцепочечную AAV-плазмиду и упаковывали с использованием AAVrh74, серотипа, который, как известно, хорошо экспрессируется в мышцах. кДНК miR-29c синтезировали применяя специальный праймер, содержащий цепь-

мишень (смысловую) miR-29c, петлю-на-стебле miR-30 и направляющую (антисмысловую) цепь miR-29c в каркасе miR-30. Были модифицированы три основания последовательности miR-29c. Затем данную последовательность клонировали в одноцепочечную содержащую ITR плазмиду AAV, под управлением промотора МКК и последовательности polyA. Плазмида pAAV.MKK.miR29C содержит кДНК mir29c в петле-на-стебле miR-30, фланкированной последовательностями концевой инвертированного повтора AAV2 (ITR). Именно данная последовательность была инкапсидирована в вирионы AAVrh74. Кроме того, несколько нуклеотидов с последовательностью-мишенью miR-29c были изменены для того, чтобы имитировать создание пар по Уотсону-Крику в данном сайте, как в мшРНК-miR(luc). Согласно дизайну мшРНК-luc, шпилька должна быть идеально комплементарной по всей длине. Кроме того, чем больше изменений в сопровождающей цепи, тем вероятнее устранение любого эндогенного механизма, который регулирует процессинг miR-29, которая могла бы распознать микроРНК через стебель. 19-е основание направляющей цепи было модифицировано на цитозин, чтобы имитировать нуклеотид, который предшествует сайту расщепления в природной последовательности mi-29c, и соответствующее основание на другой цепи было изменено для сохранения спаривания. Раннее лечение комбинированной терапией AAV.MKK.miR-29c/микродистрофин было более эффективным для снижения фиброза и экспрессии ВКМ. 4-5-недельные мыши mdx/utrn^{+/+} получали внутримышечную инъекцию гAAVrh.74.MKK.MiR-29c и гAAVrh74.MKK.микродистрофин в количестве 5×10^{11} гв в левую икроножную мышцу, как описано в примере 5. Мышцы собирали через двенадцать недель после инъекции. Окрашивание пикросириус-красным мышц, собранных у неинъектированных мышей и мышей, инъектированных комбинированной терапией гAAV.MKK.miR-29c/гAAV.MKK.-микродистрофин, показало, что совместно обработанная мышца имела 50,9% снижение коллагена по сравнению с необработанной икроножной мышцей (см. фиг. 13А и 13В). ОТ-ПЦР подтвердила увеличение уровней транскрипции miR-29c в обработанной группе (фиг. 13С). Полуколичественная ОТ-ПЦР показала значительное снижение уровней коллагена А1 и коллагена 3А (фиг. 13D, Е), фибронектина (фиг. 13F) и TGFβ1 (фиг. 13G) в обработанной AAV.MKK.miR-29c/AAV.микродистрофин мышце, по сравнению с терапией контралатеральной конечности. (*p<0,05, ***p<0,0001). Позднее лечение комбинированной терапией AAV.MKK.miR-29c/микродистрофин является эффективным для снижения фиброза и экспрессии ВКМ. Трехмесячные мыши mdx/utrn^{+/+} получали внутримышечную инъекцию гAAVrh.74.MKK.MiR-29c и гAAVrh.74.MKK.микродистрофин в количестве 5×10^{11} гв в левую икроножную мышцу, как описано в примере 5. Мышцы собирали через двенадцать недель после инъекции. Окрашивание пикросириус-красным необработанной мышцы, обработанной AAV.MKK.miR-29c и AAV.MKK.miR-29c/AAV.микродистрофин мышцы показало, что совместно обработанная мышца имела 30,3% снижение коллагена по сравнению с необработанной икроножной мышцей (см. фиг. 14А и 14В). ОТ-ПЦР подтвердила увеличение уровней транскрипции miR-29c в обработанных группах (фиг. 14С). Полуколичественная ОТ-ПЦР показала значительное снижение уровней коллагена 1А и коллагена 3А (фиг. 14D, Е), фибронектина (фиг. 14F) и TGFβ1 (фиг. 14G) в обработанной AAV.miR-29c/AAV.микродистрофин мышце, по сравнению с терапией контралатеральной конечности. Односторонний дисперсионный анализ. Все данные представляют собой среднее $\pm$ СОС (**p<0,01, ***p<0,0001).

Пример 11. Ранняя комбинированная терапия восстанавливает силу и защищает от вызванного сокращением повреждения лучше позднего лечения.

Измерение силы *in vivo* проводилось на икроножных мышцах мышей, которых рано лечили с помощью miR-29 и микродистрофина, специфично экспрессирующихся в мышцах, как описано в примерах 8 и 9. У 4-недельных мышей mdx/utrn^{+/+} совместно обработка, применяя гAAV.MKK.miR-29c/и экспрессирующий микродистрофин гAAV, показала значительное улучшение абсолютной силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn^{+/+}, и не было различий по сравнению с диким типом (фиг. 15а). Удельная сила также была нормирована по уровням дикого типа после комбинированной терапии (фиг. 15b).

Затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяемых эксцентрических сокращений, как описано в примере 9. Только у мышей, совместно обработанных гAAV.MKK.miR-29c/гAAV.MKK.микродистрофин и только гAAV.MKK.микродистрофин, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn^{+/+} (фиг. 15с).

У 12-недельных мышей mdx/utrn^{+/+} совместно обработка с использованием гAAV.MKK.miR-29c/и экспрессирующего микродистрофин гAAV восстанавливала силу и защищала от повреждения, вызванного сокращением. Величина абсолютной (фиг. 16А) и нормированной удельной силы (фиг. 16В) после тетанического сокращения инъектированных гAAV.MKK.miR-29c и гAAV, экспрессирующим микродистрофин, икроножных мышц была значительно увеличена по сравнению с необработанной мышцей mdx/utrn^{+/+}. Затем мышцы оценивали на потерю силы после повторяемых эксцентрических сокращений, как описано в примере 9. У мышей, совместно обработанных МКК.miR-29c/микродистрофином, проявилась защита от потери силы по сравнению с необработанными мышцами mdx/utrn^{+/+} (фиг. 16С). Эти данные показывают, что снижение фиброза и замена гена приводит к увеличению как абсолютной, так и удельной силы и существенно защищает мышцы от травмы, вызванной сокращением.

Пример 12. Раннее комбинированное лечение увеличивает мышечную гипертрофию и гиперплазию.

Совместная доставка gAAV.MKK.miR-29 с экспрессирующим микродистрофин gAAV не увеличивала общую массу инъектированной икроножной мышцы по сравнению с теми, что были инъектированы каждым по отдельности в течение трех месяцев (фиг. 17A). Также измерялись диаметры миофибрил. miR-29c/микродистрофин комбинированное лечение продемонстрировало увеличение среднего размера волокна. Сравнивая контрольных mdx/utrn^{+/+} с обработанным miR-29c/микродистрофин mdx/utrn^{+/+}, средний диаметр увеличился с 28,96 до 36,03 мкм (фиг. 17B). Совместная доставка привела к сдвигу распределения размера волокна к таковому дикого типа (фиг. 17C). Количество мышечных волокон на мм² при комбинированной терапии miR-29c/микродистрофин значительно ниже, чем у необработанных мышечных и дикого типа (фиг. 17d; ***p<0,01, ****p<0,0001).

Список литературы.

1. Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr. & Kunkel, L.M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919-928 (1987).
2. Straub, V. & Campbell, K.P. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* **10**, 168-175 (1997).
3. Sacco, A., et al. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* **143**, 1059-1071 (2010).
4. Wallace, G.Q. & McNally, E.M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* **71**, 37-57 (2009).
5. Zhou, L. & Lu, H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 771-776 (2010).
6. Desguerre, I., et al. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 762-773 (2009).
7. Kim, J., et al. microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence

stems. *Plant J* **42**, 84-94 (2005).

8. Ambros, V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* **113**, 673-676 (2003).

9. Eisenberg, I., et al. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17016-17021 (2007).

10. Jiang, X., Tsitsiou, E., Herrick, S.E. & Lindsay, M.A. MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS J* **277**, 2015-2021 (2010).

11. van Rooij, E., et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13027-13032 (2008).

12. Cacchiarelli, D., et al. MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab* **12**, 341-351 (2010).

13. DiPrimio, N., McPhee, S.W. & Samulski, R.J. Adeno-associated virus for the treatment of muscle diseases: toward clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 553-560 (2010).

14. Mendell, J.R., et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol* **68**, 629-638 (2010).

15. Mendell, J.R., et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* **66**, 290-297 (2009).

16. Mendell, J.R., et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **23**, 192-201 (2015).

17. Carnwath, J.W. & Shotton, D.M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* **80**, 39-54 (1987).

18. Coulton, G.R., Morgan, J.E., Partridge, T.A. & Sloper, J.C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **14**, 53-70 (1988).

19. Cullen, M.J. & Jaros, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* **77**, 69-81 (1988).
20. Dupont-Versteegden, E.E. & McCarter, R.J. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* **15**, 1105-1110 (1992).
21. Stedman, H.H., et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **352**, 536-539 (1991).
22. Deconinck, A.E., et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 717-727 (1997).
23. Grady, R.M., et al. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 729-738 (1997).
24. Love, D.R., et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* **339**, 55-58 (1989).
25. Tinsley, J.M., et al. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591-593 (1992).
26. Tinsley, J., et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* **4**, 1441-1444 (1998).
27. Squire, S., et al. Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet* **11**, 3333-3344 (2002).
28. Rafael, J.A., Tinsley, J.M., Potter, A.C., Deconinck, A.E. & Davies, K.E. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* **19**, 79-82 (1998).
29. Zhou, L., et al. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J Neurol Sci* **264**, 106-111 (2008).
30. Gutpell, K.M., Hrinivich, W.T. & Hoffman, L.M. Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn+/- Mouse Validates Its

Suitability as a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS one* **10**, e0117306 (2015).

31. Rodino-Klapac, L.R., et al. Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Human molecular genetics* **22**, 4929-4937 (2013).

32. Cushing, L., et al. MIR-29 is a Major Regulator of Genes Associated with Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2010).

33. Roderburg, C., et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* **53**, 209-218 (2011).

34. Nevo, Y., et al. The Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), decreases fibrosis and improves muscle strength in dy/dy mouse model of muscular dystrophy. *PLoS one* **6**, e18049 (2011).

35. Rodino-Klapac, L.R., et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* **5**, 45 (2007).

36. Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Littleman, F., Blanchard, E.M. & Alpert, N.R. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* **65**, 1441-1449 (1989).

37. Rodino-Klapac, L.R., et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 109-117 (2010).

38. Grose, W.E., et al. Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. *PLoS one* **7**, e39233 (2012).

39. Liu, M., et al. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* **11**, 245-256 (2005).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекombинантный вектор AAVrh74, содержащий в направлении 5'-3' инвертированный концевой повтор (ITR), регуляторный элемент, специфичный для мышц, последовательность химерного интрона, нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, поли-А хвост и ITR.

2. Рекombинантный вектор AAVrh74 по п.1, где регуляторный элемент, специфичный для мышц, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

3. Рекombинантный вектор AAVrh74 по п.1 или 2, дополнительно содержащий последовательность химерного интрона между указанной нуклеотидной последовательностью и указанным регуляторным элементом, специфичным для мышц, где указанная последовательность химерного интрона приведена в нуклеотидах 844-993 SEQ ID NO: 9.

4. Рекombинантный вектор AAVrh74 по п.1, дополнительно содержащий поли-А хвост с 3'-стороны от указанной нуклеотидной последовательности, где последовательность указанного поли-А хвоста приведена в нуклеотидах 4585-4640 SEQ ID NO: 9.

5. Композиция для применения в способе лечения мышечной дистрофии у субъекта, содержащая рекombинантный AAVrh74 по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Способ лечения мышечной дистрофии у субъекта, включающий введение композиции по п.5.

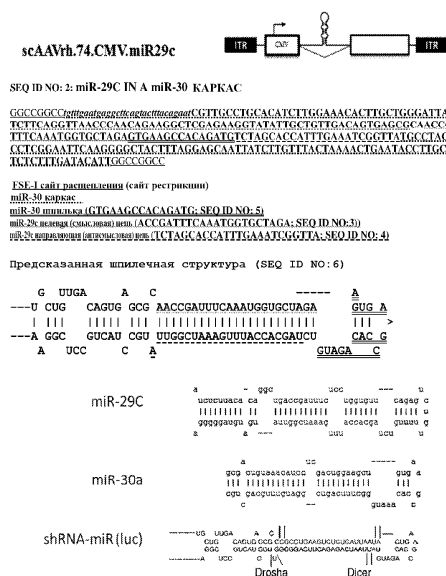
7. Способ уменьшения или предотвращения фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающий введение композиции по п.5.

8. Способ увеличения мышечной силы или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающий введение композиции по п.5.

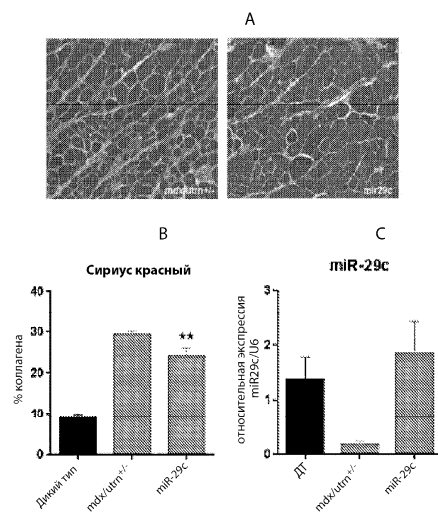
9. Способ по любому из пп.6-8, где рекombинантный вектор AAVrh74 вводят путем внутримышечной инъекции, внутривенной инъекции, парентерального введения или системного введения.

10. Способ по п.7 или 9, где рекombинантный вектор AAVrh74 вводят до того, как фиброз обнаруживается у субъекта, или до того, как мышечная сила снижается у субъекта, или до того, как мышечная масса снижается у субъекта.

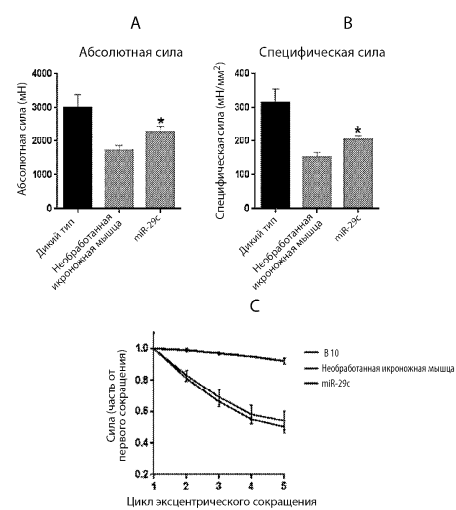
11. Способ по любому из пп.6-10, где мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна.
12. Композиция по п.5 для применения в способе лечения мышечной дистрофии у субъекта.
13. Композиция по п.5 для применения в способе уменьшения или предотвращения фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.
14. Композиция по п.5 для применения в способе увеличения мышечной силы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.
15. Композиция по любому из пп.12-14, где субъект страдает мышечной дистрофией Дюшенна.
16. Композиция по любому из пп.12-15, где композиция составлена для внутримышечного введения, внутривенной инъекции, парентерального введения или системного введения.
17. Применение рекомбинантного вектора AAVrh74 по любому из пп.1-4 для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии у субъекта.
18. Применение рекомбинантного вектора AAVrh74 по любому из пп.1-4 для приготовления лекарственного средства для уменьшения или предотвращения фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.
19. Применение рекомбинантного вектора AAVrh74 по любому из пп.1-4 для приготовления лекарственного средства для увеличения мышечной силы или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.
20. Применение по любому из пп.17-19, где субъект страдает мышечной дистрофией Дюшенна.
21. Применение по любому из пп.17-20, где лекарственное средство составлено для внутримышечного введения, внутривенной инъекции, парентерального введения или системного введения.
22. Способ получения функционального белка микродистрофина, включающий инфицирование клетки-хозяина рекомбинантным вектором AAVrh74 по любому из пп.1-4 и экспрессию функционального белка микродистрофина в клетке-хозяине.
23. Применение рекомбинантного вектора AAVrh74 по любому из пп.1-4 в способе получения функционального белка микродистрофина, где указанный способ включает инфицирование клетки-хозяина рекомбинантным вектором AAVrh74 по любому из пп.1-4 и экспрессию функционального белка микродистрофина в клетке-хозяине.



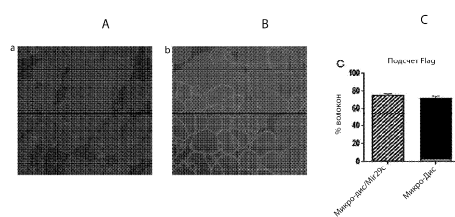
Фиг. 1



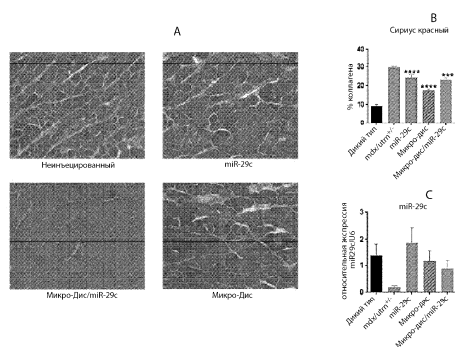
Фиг. 2А-С



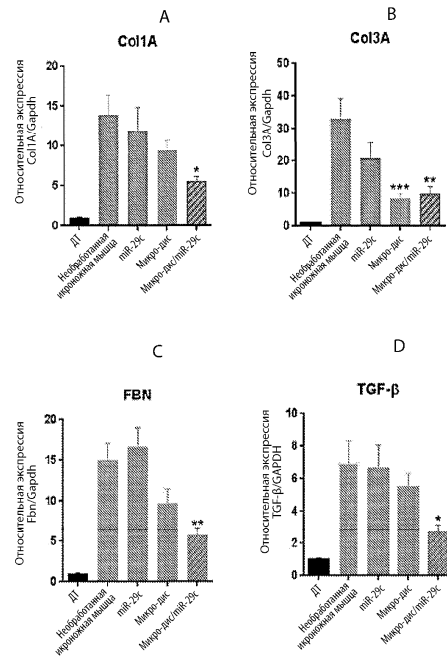
Фиг. 3А-С



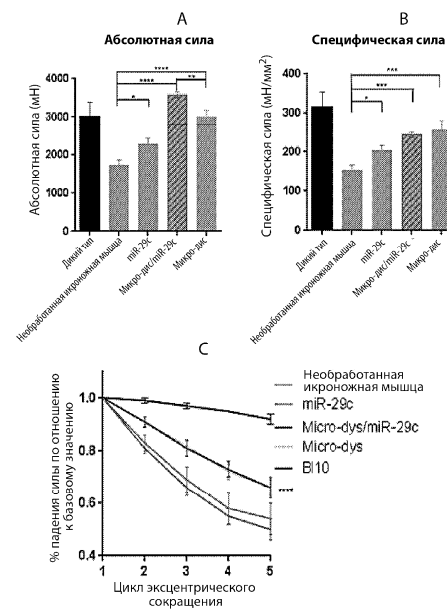
Фиг. 4А-С



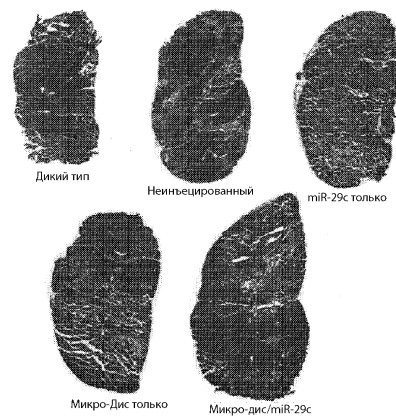
Фиг. 5А-С



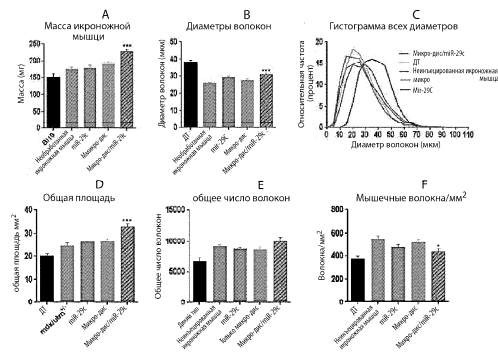
Фиг. 6A-D



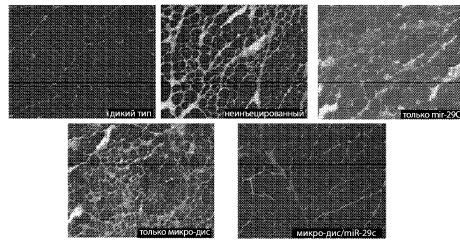
Фиг. 7A-C



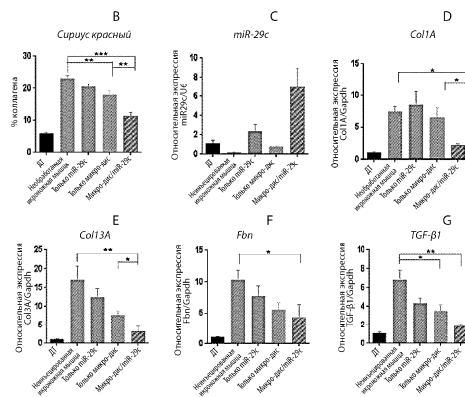
Фиг. 8



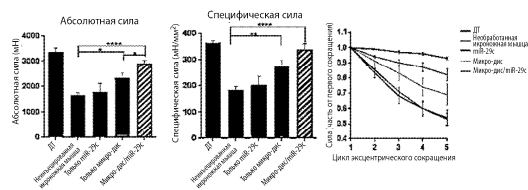
Фиг. 9A-F



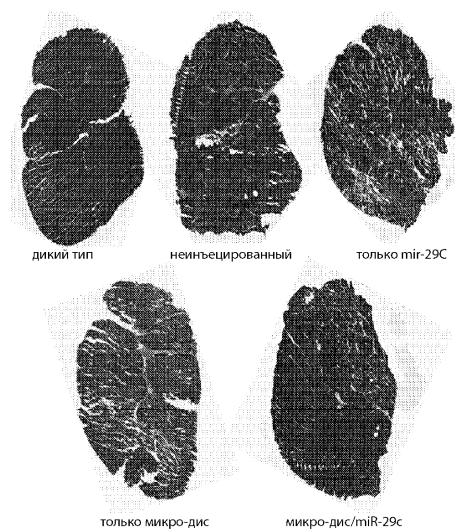
Фиг. 10A



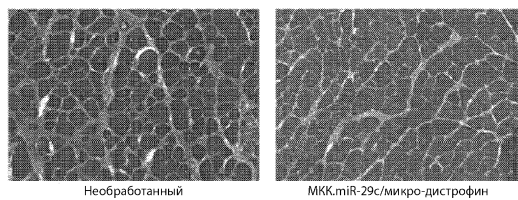
Фиг. 10B-F



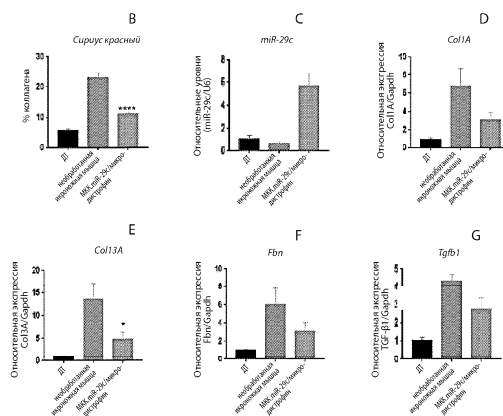
Фиг. 11



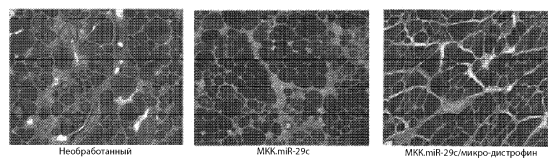
Фиг. 12



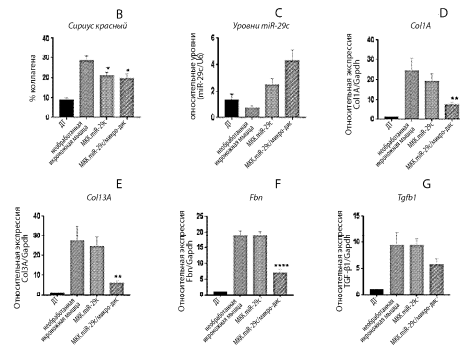
Фиг. 13A



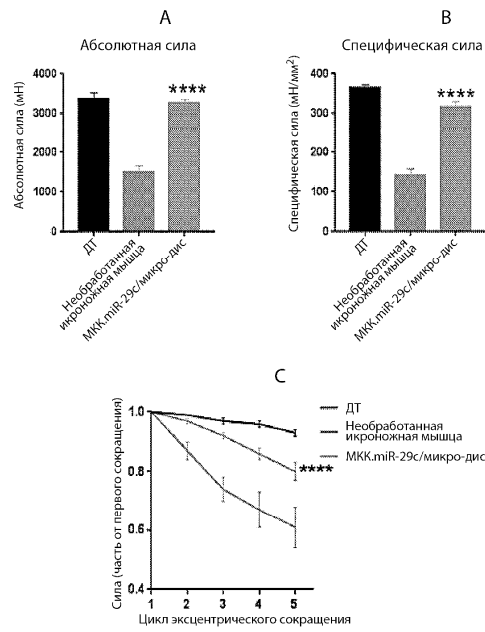
Фиг. 13B-F



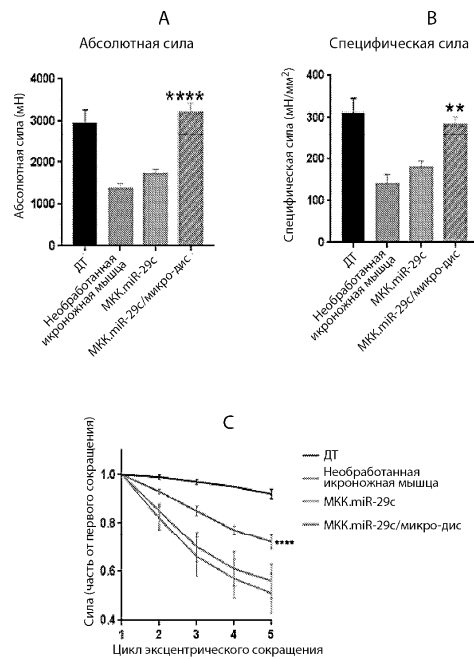
Фиг. 14



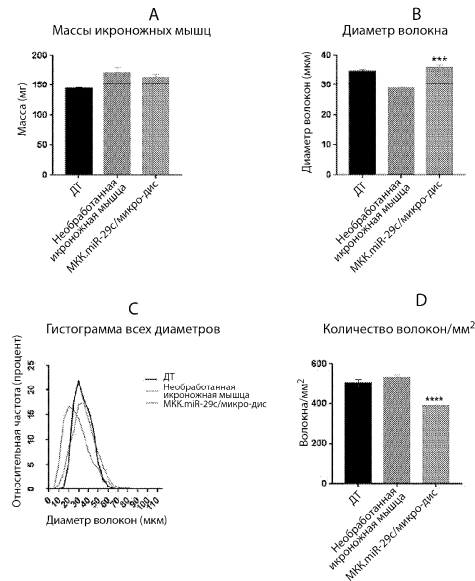
Фиг. 14B-F



Фиг. 15A-C



Фиг. 16A-C



Фиг. 17A-D

Последовательность pAAV.CMV.mir29c (SEQ ID NO: 1)

Основные характеристики:

Промотор: CMV – 120-526

Инtron: 527-927, 1087-1380, 1854

5'UTR: 1381-1484

мишРНК-mir29c с первичной затравочной последовательностью – 1088-1375

PolyA: 1896-2091

CAGCAGCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAGCCCGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCG
GCCTCACTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGGTTAACTCGTTACATACTTACGGTAAATGGCCCG
CTGGCTGACCGCCCAAGCAACCCCGCCCATTTGACGTCATATGACGTATGTTCCCATAGTAAAGGCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCATATGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGAGTACATCAAGTGTATCATATGGC
AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCGTACATGACCTTATGGGAC
TTTCTACTTGGCAGTACATCACTATTAGTCAATCGCTATTACATGGTATCGGGTTCGGCAGTACATCAATGG
GCGTGGATAGCGGTTGGATACAGGGGATTTCCAGGTCCTGAGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAG
CAAAATCAAGCGGACTTTCCAAATGTCTAACAACCTCGCCCATTTGACGCAATGGCGGTAGCGGTGTACGG
TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGTTTATGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGAGCCATCCACGCTGTTTGAAC
TCCATAGAAGACACCGGACCGATCCAGCTCCGGACTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAACCTGAACCAACGAGA
AAGTAACTGGTAAGTTAGTCTTTTGTCTTTTATTCAGGTCGGGATCCGGTGGTGGTGGCAATCAAAAGAACTG
CTCTCAGTGATGTTGCTTTACTTTAGGCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAGCTCGGGAATTGTAC
CGGGGCGGATCCACCGGCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCGGCAGAACACAGGTAAGTGGGCTGTGTGGTTCGGG
CGGGCGGGGAGCGGGGCTGTCAGTCCAGCAGTATTTGGGAGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAG
AATCGGAGCGGGGAGTCTCAGTCTGCGGGGCTGTTGAATGAGGCTCAGTACTTACAGATCTGTCCTG
ACATCTTGGAACTCTGCTGGGATTACTCTTCAAGTTAACCAACAGAGGCTCGAGAGGATATATGCTGTTG
ACAGTGGCGCAACCGATTCAATGGTGTCTAGAGTGAAGCCACAGATGCTAGCAGCTATGAAATCGGTTAG
CCTACTGCTCGGAATTCAAGGGGCTACTTTAGAGCAATATCTTGTACTTAACTGAATCACTTGTATCTCTT
TGATACATTGGCCGGCTGCTCTGGTGGCTGGGCTCGCGGCGCGGTGATCGCCCCGCTGGGCGGCAAGGCTG
GCCCGCTGGCAGCCAGTTGCTGAGCGGAAAGATGGCGGCTTCCCGGCTGCTCGAGGAGCTCAAAATGGAG
GACCGCGGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAAGTACCCACAAAGGAAAGGGCTTTCGCTCTCAGCGCTCG
CTTCATGTACTCCAGGAGTACCGGCGGCTCAGGCACTCGATTGTTCTGAGCTTTTGAAGTACGTCCTC
TTTAGGTTGGGAGAGGAGGTTTATGAGTGAAGTTTCCGACAGTGAAGTGGGTTGAGACTGAAGTGAAGCAG
CTTGGGACTGATGATATCTGCTTGGATTTGGCTTTTGAAGTTGGGTTGGTCTGATCTCAAGCTCAGACAG
TGGTCAAGTTTCTTCTCAATTCAGGTTGTTGAGGTTGAGGTTGAGGTTGAGGTTGAGGTTGAGGTTGAGGTT
GCGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACACACATAGAATGCACTGAGGAGGAGGAGG
TTATTGTGAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTGTAACCATATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAT
GCATTCATTTTATGTTTCAAGTTCAAGGTTCAAGGTTGTTGAGGAGGTTTTCCTAGTAGCATGGCTACGATGATAAGT
AGCATGGCGGTTAATCTAATACAGAGGAACCCCTAGTATGAGGTTGGGCACTCCCTCTCTGCGCGTCTGCTC
GCTCACTGAGCGCGGCGCAACAAAGTCCGCCGACCGCGGCTTTCGCCGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAG
CGCGCCAGCTGGCGTAAATGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA
TGGAAATCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTTATTCATGAGCGTTTTCCTGTGTGCAATGGCTGGCGGTA
TATTGTTCTGGATATACAGCAAGCGGATAGTTGAGTTCTTCACTACGCAAGTATGATATTAATCAATCAAA
GAAGTATGGCAACGGTTAATTGCTGTATGAGCAGACACTTTTACTCGGTGGCTCACTGATTATAAACAAC
TTCTCAGGATTCTGGCGTACGTTCTGCTCAAAATCCCTTATCGGCTCTGTTAGCTCCGCTCTGATTCTAA
CGAGGAAAGCAGGTATACGCTCTGCTCAAGCAAC

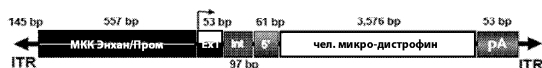
Фиг. 18A

042315

```
CATAGTACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTCGTTTCTCCCTCTCTTCGCGCACTGTCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCT
AAATCGGGGCGCTCCCTTAGGGTTCGAGTTAGTGGCTTACGCGCCTCGACCCCAAAACCTGATTAGGGTGAT
GGTTCACGTAGTGGGCATCGCCTGATAGACGGTTTTCGCCCTTTCAGCTGGAGTCCACGCTCTTAAATAGTG
GACTCTGTTCGAACTGGAAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATCTCTTTGATTATAAGGATTTTGGCGATT
CGGCTATTGGTAAAGATAGAGCTGATTAAAGAAATTAACGGGATTTTAAACAATATTACGTTTCAAT
TAAATATTGGCTATACAATCTCGTGTTTTGGGGCTTTCTGATTATCACCGGGGACATATGATTGACATGCTA
GTTTACGATTACGGTTTCATGCTTCTGTGTTGCTGCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCTTTTGAGAGACC
TCTCAAAAATAGTACCTCTCGGCAATGAATTTACGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTATTGACT
GTCTCGGCGCTTCTCACCGCTTTGAATCTTACCTACACATTACTCAGGCTTGATTAAATATATGAGGGTTCT
AAAAATTTTTATCTTGGCTTGAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCAATGTTTTTGGTACAAC
CGATTTAGCTTATGCTCTGAGGCTTATTGCTTAATTTGCTAATCTTTCGCTGCTCTGATGATTATTGGATGTT
GGAATCTCTGATGGGTATTTCTCCTACGCATCTGTGGGCTATTTCACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAA
TCTGCTCTGATGCGCATAGTTAAGCAGCGCCGACACCGCGCAACCGCTGACGCGCTTGACGGGCTTGTCT
GCTCCCGCATCGCTTACAGACAAGGCTGTGACGCTCTCGGAGCTGCTATGTGTCAAGGTTTTCACGCTCA
CGAAACCGCGGAGACGAAGGGCTCTGTGATACGCTATTTTATAGGTTAATGTATGATTAATAATGGTTCTT
AGAGTCAAGTGGCATTCTCGGGAAATGTGCGCGCAACCCCTATTGTTTATTCTAAATACATTCAAAATATG
TATCGCTCATGAGACAATAACCTGTATAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGAGTATGAGATTCAACATT
TCCGTGTGCGCCTTATTCCTTTTTTGGCGATTTTGGCTTCTGTTTTGCTCACCAGAACCGTGTGAAAGTAA
AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTACATCGAAGTGAATCAACAGCGGTGAAGATCTTGAGA
GTTTTCCGCCCGGAAGACGTTTTCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATT
GACGCGGGCAGAGCAACTCGTCCGCGCATACACTATTCTCAGATGACTTGATTGAGTACTCAGGCTCACA
GAAAGCATCTTACGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
GCCAATCTACTCTGACAAGATCGGAGGACCGAAGGAGTAAACCGCTTTTTCACAAATGGGGATCATGTA
ACTCGCTGTATCGTGGGACCGGAGCTGAATGAAGCATCAACACGACGAGGCTGACACCATGATGCTGTA
GCAATGGCAACACGTGCGCAAACTAATTAAGTGGCAACTACTACTAGCTTCCCGCGCAACAAATATAGACT
GGATGGAGCGGATAAAGTTGACGAGCACTCTGCGCTCGGCGCTTCCGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAT
CTGGAGCGGTTGAGCTGGTGTCTCGGCTATCATTCGACGACTGGGCGAGTGGTGAAGCCCTCCCGTATGAG
TTATCTACGACGCGGGGATCAGGCACTATGGATGAACGAAATAGACAGATGCTGAGATAGGTGCTCTACTGA
TTAAGATTGGTAACTGTGACGCAAGTTACTATATACTTTAGATTGATTAAACCTCAATTTTAAATTAATAA
GATCTAGGTGAAGATCTTTGATATCTGATGACAAATCTTAAGCTAATTTTCTTCCACTGAGCGTCA
GACCGCTAGAAAGATCAAGGATCTCTTGAGATCTTTTCTGCGGTAAATCTGCTTGGCAAGAAAAA
ACCAACCGCTACGACGGGTGTTGTTTGGCGATCAAGGATCAACACTCTTTTCCGAAGGTAACTGCTTACG
AGAGCGCAGATACCAATACTGCTCTCTAGTGTAGCGTAGTATGAGCCACACTCAAGAACTCTGTAGCACCG
CTACATACCTGCTCTGCTAATCTGTATCAGGTGCTGCTGCCAGTGGCATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGA
CTAAGACGATAGTTACCAGGATAAGCGCAGCGCTCGGCTGAACGGGGGGTCTGTGACACAGCCAGCTTG
AGCGAACGACCTACACCGAATGAGTACCTACAGCTGAGCTATGAGAAAGCGCAGCTCTCCGAAAGGAGA
AAGCGGACAGATATCCGTTAAGCGCGAGGCTCGAAGAGGAGAGCGCAGGAGGAGCTTCAGGGGGAAAC
GCTGATATCTTATAGTCTGTGCGGTTTGGCAGCTCTGATGAGCTGATTTTGTGATGCTGCTCAGGGGG
GCGGGGATGATGAAAGCGACAGCGCGGCTTTTACGCTTCTGCGCTTTCGCGCTTTCGCTGATG
TCTTCTGCGTATACCTGATCTGTGGATACCGTATTACCGGCTTGAAGTGAATACCGCTCGCGGAG
CGAAGCAGCGAGCGAGCTAGTGAAGGAGGAGGAGGAGCGCAATACGCAACCGCTCTCCCG
CGGTTGGCGCTATTAAATG
```

Фиг. 18В

Figure 19



Фиг. 19

SEQ ID NO: 9

Основные характеристики:

Промотор ММК

Химерная интронная последовательность

Последовательность микро-дистрофина человека

Поли А конец

Устойчивость к ампициллину

Каркас плазмиды рГЕХ с точкой начала репликации рВР322

```
GCCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCTTAATGCAGCTGGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCGCGGGGCAAGCGCGGCGCTCGGGCGACCTTT
GGTCGCGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCAT
CACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTAATCTACGTAGCC
ATGTCTAGACAGCCACTATGGGTTAGGGCTGCCCATGTAAAGGAGGCAAGGCTGGG
GACACCCGAGATGCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCGCCCCCA
ACACCTGTCTGCTGAGGCTCAACCCACCCCGGTCGCTGGGTTTAGGCTCTGTACA
CCATGGAGGAGAAGCTCGCTCAAAAATAACCTCTGCTCGTGGTGGGCTGTGGGGGA
CTGAGGGCAGGCTGTAAACAGGCTTGGGGGCGCAGGGCTTATACGTGCTGGGACTCC
CAAGATTACTGTTCCTATGTTCCCGCGGAAGGGCCAGCTGTCCCGCCAGCTAGA
CTCAGCACTTAGTTAGGAACCAAGTGAAGCAAGTCAAGCCCTTGGGGCAGGCCATACA
AGCCCATGGGCTGGGCAAGCTCAAGCTCAAGCTCGGGTCCGGGTGGGCAAGGTCGCG
GCAACAGCTGAAGAGCTCAATCTGCTCAAGGAGGCTCTCTTGGGAGCAACCTCT
TGGCTAGTCAACCTGTAGGCTCTCTATATAACCCAGGGGCAAGGGCTGCCCC
CGGCTCACCAACCTCCACAGCAGACAGACACTCAGGAGCCAGCCAGCCAGGT
AAGTTTAGTCTTTTGTCTTTATTTACGATCCCGGATCCGGTGGTGGTGAATCAA
AGAACTGCTCTCAGTGGATGTTGCTTTACTTACGGCTGTACGGAAGTGTACTT
CTGCTCAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGCGGCCACCATGCTTGTGTTGGGAGG
AGGTGGAGGATTTTATGAAGGGGAGGAGCTGAGAGAAGAGACTTTTACCAAGTGG
GTGAACGCTCAGTTACGCAAAATTTGGGAAGCAGCAGCATCGAAGTCTGTTTCCGAC
CTGAGGATGGGAGAGCTGCTGGAATCTGCTGGAAGGACTGACTGGCAGAAAGCT
GCTCAAGAGAGAGGGGAGCACTAGGAGTGCACGCTTGAACAACGTGAACAAAGCT
CTGAGACTGTGAGGAGACAACTGAGGATCTGGTGAATTTGGGAGTACTGATAT
CGTGGACGGGAACCAAACTGACACTGGGCTGTATCGGAAGATTATTCTGACTG
GCAAGTGAAGAAATGATGAAGAACATCATGGCTGGGCTGAGGAGGCAATTCG
AGAAGATCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAAGGACCGCGCAACTATCCCAAGTGAAC
GTGATTAACCTCACTACATCTTGGAGGAGCGGCTGGGCTTGAATGCTGATTTAC
AGCCACAGGCTGTATCTGTTGACTGGAAATAGCGTGGTGTGCGCAGCAGTCTGCTACA
CAGCGCTGGAACAGCTCTTGAATAGCTGCTGAGTACAGTGGGAGTGAAGAACT
GCTGGACTCAGAGGATTTGGGAGTACATACCTAGAGTAAAGAGCTAATCTGATG
ACATTACTAGCTCTTTTCAGTGTGCTGACAGGAGGCTGCTATTTGAAGCTATTAGG
AGTGGAAATGCTTCCCTGCTGCTCAAGTGAATAAGAGAGGAGTATTAGCTG
CACTACAGAGCTATACAGCAGCAGATTAAGCTTGAAGCTTGGCTAGAGGATAAGA
GCTCAGCAAGTGAAGTCAAGAGCAGGTTTGAAGTCTACCTTATAC
```

Фиг. 20А

[illegible]

ATTGCGCGCGAAATCTCCAGCAAGCAGCTGAATGCTACCAATCTCAGGAATGTCCT
ATGCTGCTGCTTCCGCTACAGGAGCTGAAACATTTAACTACGATG
ATTTCGCGAGAGCTCTTCTTCCGCGAAGGTGCGCAAGGACACAGAACTGCACAT
CTATGTCGGGAAATATGTCACGCTCAACCTATCTTGCGCAAGATGTGCGGATATTGCG
CTGCTGTGAGAAATAAGTTCTGCAATCAAGGAGATCTTCCGCAAGACCCCGCATAT
GGGCTATCTTCCGAGTTCAGACATCTGTCGAAAGGAGACATAATGGAGAGCTACAA
TCTGCGCGCGCCGCAATAAAGATGTTATTTTCATATAGATCTGGTGTGGTTTTTGT
TGTTGTAGAGCATGCTGCTAGTACGTAAATGATAGCATGGCCGGGTAAATCAATACAT
AGGAACCGCTAGTGTAGGATGGGATGCCCACTCCCTCTTGCGGCGTCCGCTGCCTCATC
GCGCGCGCGCGCAAAAGGTGTCGCCAGCGCCGGGCTTTCGCGCGCGGCTCGATG
ACGCGAGGAGCGCGCCGATCGGCTGCGGTACGAGAGGCGGCCGACCGCATCGCCT
CCCAACATGCTGGCGAGCGCTAAGTGGGAATGGAAGTCTCCAGACATGTAGCTGTCAA
ATGTAGGTATTTCCGATAGCGGCTTTCTCTGTTCGAATGCTGGCGGTAATATGTTG
TGGATTTATCCAGCAAGATGATAGTTGTAGTGTCTTCTACAGCAAGATGATGTTA
TCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TACTGATGGGCTCAAGCATGATTATTAATCTCTCAGGATATGGGCTCAGCTTCT
GTCACAAATCCCTTAATCGGCTCTCGTTTGACCTCTTGATCTACAGBAGAA
AGCAGCTATACCTGTCTGTCACAAACAGCATAGTACAGCGGCCCTTGACAGCGCCAT
AACCGCGCGGGGCTGGTGGTGTGACGCGCAGGACCGCTCACTGCGACGGCTT
TAGCGCGCGGCTCTTCTGCTTTCTCTCCCTTTCTTCCGCACTGTCGGCGGCTTTCC
CTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCTTTTAGGTTGCTGATGTAGTATATACGCGAC
CTGCGACCCAAAACAACTGTATAGGTTGATGGTGTACGATGAGTGGGCTACGCCCTGA
TAGACGTTTTCGCGCTTGACGTTGGAGTTCACGTTCTTAAATATGGTACCTTGT
TCCAAACGTGAACACACCTCAACCTTACCTCGGTCTATCTTTTGTATTAAGGAGT
TTGCGCATTTGCGGCTATGTTGTTAAAAATGAGCTGATTTCACAAAATTAAGCC
GAAATTTACAAAATATAACCTGTACAAATATAATATGCTATACAACTCTCTG
TTTTCGGGCTTTTCGATTATCAACGGGGTACATGATGTACGCTAGTGTATTAC
GATTACAGCTTCAGTTCCTTGTGTTGCTCCAGCATCTACGGAATATGCTGATAGC
TTCTGTAGAGACCTCTCAAAATAGCTCACTCTCGGCAATGAATATATACAGTAA
ACGGTGTGAATCATATGATGTGGTATTGTAGTTCTCGGCGCTTTCTACCCGTTGT
ATGTTTAACTACACATATCTACGAGTATGACTTATAAATATATGAGGTTCTAAAA
TTTATTTATCTTCGCTGTAAATAAGGGCTCTTCCCGCAAGTATATACGGGTACATA
ATGTTTATGCTGACATATTTAGCTGCTTACGCTGAGGCTATGATGATTAATGCTG
TCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TCTCTACCGCTATCTGCGGTTATTTACACAGCCGATATGGTGCATCTAGTACATCT
TGCTCTGATGGCCGATAGTAAAGCCAGCGACACCGCCCAACCTGCTGACGCG
CCCTGACGGGCTGTGCTGCTCCGGCATCCGCTATACAGCAAGCTGTGACCTCTCC
GGAGCGATGCTGCTGACAGGTTTTCACGCTACAGCAAGATGCGGACGACGAA
GGCCCTGCTGATACCGCTATTTTATAGTTATGATCATGATGAATAATGTTTCTTAT
ACGTCAGGTGGTCACTTTTCGGGAAAGTGTGGCGGACCCCTAATTTGTTTATTTCT
AAATACATGTTATGTTATGCTATCCGCTCATAGGACATAACCTGTAAATGTTCTCAAT
AATATTGAAAAGGAAGATGATGATATCAACATTCGCTGTCGCCCTT

- 33 -

ATTCCCTTTTTCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTCGCTACCCAGAAACGCTGGTGA
 AAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTAC
 ATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAAGCT
 TTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTG
 ACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGATACACTATCTCAGAAATGACTTGGTTG
 AGTACTTACCAGTCAAGAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTA
 TGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGAATAACACTGCCGCCAACTTACTTCTGACAACG
 ATCGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACACACATGGGGGATCATGTAACT
 TCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTG
 ACACCACGATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTCGCCAACTATTAACTGGCGAA
 CTACTTACTCTAGCTTCTCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTT
 GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCT
 GGAACCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATCTGACGACATGGGGCCAGATGGTAA
 GCGCTCCCGTATCTGATGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGGATGAACG
 AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCTACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTCA
 ACCAAGTTTACTATATATCTTTAGATTGATTAAACCTTCATTTTAAATTAAAG
 GATCTAGGTGAAGATCCTTTTGAATACTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT
 TTCGTTCCAGTGAGCGTCAGACCCCTTAGAAAAGATCAAAAGGATCTCTCTGAGATCC
 TTTTTCCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCACTGCTACCAGCGGT
 GGTTCGTTGCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAG
 CAGAGCGCAGATACCAAACTGCTCTCTAGTTAGCGGTAGTTAGGCCACCACTT
 CAAGAACTCTGTAGCAACCGGTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGC
 TGCTGCCAGTGGCGATAAGTGTGTCTTACCGGTTGGACTAAGACGATAGTTACC
 GGATAAGGCGCAGCGTTCGGGTGAACGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGG
 AGCGAAGCACTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCC
 ACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGGCGGACAGGTATCCGTTAAGCGGGCAGGGTCGGA
 CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACCGCTGGTATCTTTATAGTCT
 GTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGTGATTTTGTGATGCTGCTCAGGGGG
 CGGAGCGTTATGGAATAACCGCAGCAACGCGCGCTTTTACGGTTCTCGGCTTTTTC
 TGGCTTTTTCACATGTCTTCTTCGCTATTCCTCTGATCTGTGATTAACCGTA
 TTACCGGTTTGTAGTGAGTGTATACCGCTCGCCGACGCCAAGCACCAGCGCGAGC
 GAGTCAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

Фиг. 20D

SEQ ID NO: 7 : ген микро-дистрофия человека

ATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGAGGACGTGCAGAAGA
 AGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTACGCAAAATTGGGAAGCAGCACATC
 GAGAATCTGTTTTCCGACCTGCACGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGG
 ACTGACTGGCCAGAACTGCCCAGAGAGAAAGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGA
 ACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAAACAACAGCTGGATCTGGTGAAT
 ATTGGCAGTACTGATATCTGGACGGGAACCAAACTGACACTGGGCTGATCTG
 GAACATTATCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGC
 TGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCTCGTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGC
 AACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACCTTCACTACATCTGGAGCGACGGGTGGCC
 CTGAAATGCTCTGATTACAGCCACAGGCTGATCTGTTCGACTGGAATAGCGTGGTG
 TGCCAGAGTCTGCCACACAGCGCTTGAACATGCCCTCAATATCGCTCGGTACCAG
 CTGGGGATCGAAAAACTGTGTGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCCAGATAA
 AAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGTC
 TATTGAAGCCATTCAAGAGGTGGAATGCTGCCCGCCCCCCCCAAAGTGAATAAAG
 AGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCC
 TGGCTCAGGATATGAGCGCACCACTAGTCCAAAACACCGGTTCAAGTCTTACGCTT
 ATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACCTAGCGACCCCTACTAGATCCCCCTTTCCATCCC
 AGCACTTGGAGGCCCAAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAGCGGAG
 GTGAATCTGATCGGTACCAAGACAGCCCTGAGAGGAGGTGAGTGTGCTGCTGCTGAG
 TGCTGAAGACACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTTCAATGACGTGGAAGTGGTGA
 AGGATCAGTTCCACACACAGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTACACAGGGG
 CGCGTGGGCAATATCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGAACCTGAG
 TGAGGACGAGGAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGTGTAACAGCCGCTGG
 GAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAGCAGTCCAACCTGACCCGGGTGCTGAT
 GGACTGACAGAACAGAACTGAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAGACTGAG
 GAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGACCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTGA
 AGAGACAGGTGCAGCAGCATAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGT
 GCGGGTGAACCTCCTGACACATATGGTGGT

Фиг. 21A

GGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGA
 AGGTGCTGGGGGACCGTGGGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTG
 CTGCTGCAGGACATCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTT
 AGTGC TTGGCTGAGCGAGAAAGAGGACCGCTGAACAAGATCCACACAACCGGCTT
 TAAAGAA TACAGAACGAAATGCTGTCTAGGCTGACAGAACTGGCTGTGTGAAGGCTG
 ATCTGGAGAAAAAGAGCAGAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTG
 CTGAGCACCCGTGAAGAACAAAGAGCGTGAACCAAGACAGAAAGCCTGGCTGGATA
 ACTTTGCCCGCTGCTGGACAACCTGGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAG
 ATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGTATGGA
 AACCGTGACCAACCGTGACAACCCGCAACAGATCTGGTGAAACATGCCAGGAAG
 AGCTGCCACCTCCACCTCCCAAGAAGAAGAGAACCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTG
 CAGGAAGCCACTGACGAACCTGGACCTGAAGCTGAGGACGGCCGAAGTGATTAAGGG
 GTCTTGGCAGCCTGTGGCGCATGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACTGGAAAA
 GGTGAAGGCTCTGAGAGGCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCAATGTGA
 ACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTG
 AGCACACTGGAGGACCTGAAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGA
 CCGGGTGCAGCTGCTGATAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAAGCCAGCCAGCACT
 TTCTGAGCACATCCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCCTCAACAAGGTG
 CCCTACTATATTAATCAGCAGACCCAGCAACTGTGTTGGGACCATCCCAAGATGACA
 GAACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAAC
 GCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCC
 GCCGCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGA
 TATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCATACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGC
 ACAACAACCTGGTGAACGTGCCCTGTGCGTGGATATGTGCTGAACCTGGCTGCTGA
 ACGTGTATGACACTGGGCGCACCGGCGGATCAGAGTGTGAGTTTAAAACTGGG
 ATTATCTCCCTGTGAAGGCCCACTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAGCAG
 GTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACAGCGCCGCTGGGACTGCTGCTGCATGAT
 AGTATCCAGATTCTAGACAGCTGGGAGAGG

Фиг. 21В

TGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCAGCTGTTCCAGTTTG
 CCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTGTTCCTGGATTGGATGCGCCTGGAAC
 CACAGAGCATGGTGTGGCTGCCGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCCGCAAACTGCC
 AAGCACCAAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTTATCGGCTTTGCTAC
 AGGAGTCTGAACAATTTTAATACGATATTTCGCAGAGCTGCTTCTTTCCGGAAGA
 GTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCATATGGTGGAATATTGACCCCCAATAC
 ATCTGGCGAAGATGTGCGGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAA
 GAGTACTTCGCCAAGCACCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGTCTGG
 AAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGTGAGC

Фиг. 21С

Последовательность rAAV.MKK.mir29c (SEQ ID NO: 12)

Основные характеристики:

Энхансер MKK: 190-395 (SEQ ID NO: 10)

Промотор MKK: 396-753 (SEQ ID NO: 11)

интрон EF1a : 1155-1315, 1609-2083

miR-29c: 1487-1512

miR-MK-mir29c с первичной затравочной последовательностью – 1316-1608

SV40 PolyA: 2094-2146

CTGNNNNNNGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCGCCGGGCAAGCCGGGCGTC
 GGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTAGCGCAGCAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
 GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAAGTAAATGAATTAACCCGCATGTAATTA
 TCTACGTAGCCATGTCTAGACAGGCACTATGGGCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGC
AAGGCTTGGGGACACCCGAGATGCCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTC
CCCCCCCCAACCTGCTGCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCTGGGTCTTAG
GCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCAAAAATAACCTGTCCCTGGTGGGC
 TGTGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGCCAGGGCTTATACGTGCC
 TGGGACTCCCAAGTATTAATGTTCCATGTTCCCGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCG
 CCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAAGTGAAGTACAGCCCTTGGGGCA
 GCCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCTGGGTCCGGGGTGGGCAC
 GGTGCCCGGGCAACGAGCTGAAGGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCCCTCTGGGGGA
 CAGCCCCCTCGGCTAGTCAACACCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGACAG
 GGGCTGCCCGCGGCTACCAACACCTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCCAG
 CCAGCCAGGTAAGTTTAGTCTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCGGATCCGGTGGTGG
 TGCAATCAAGAAGCTGCTCCTAGTGGATTTGCCTTTACTTCTAGGCTGTACGG
 AAGTGTACTTCTGCTTAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCCTAGAGGATCCGGTAC
 TCAGGGAACCTGAAACACAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTGTCTTTTAT
 TTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGAATCAAAAGAACTGCTCTCAGTGGATGTT
 GCCTTACTTCTAGGCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAGCTGCGGAATT
 GTACCCGGGGCCATCCACCGCTCTTTTCGCAACGGGTTTCCCGCCAGAACACAGG
 TAAATGCCCTGTGTGTTCCCGGGCGCGCACCGGGCCCTGCGCTCCACCGCAC
 ATGTCGCGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCAACCGAGAATCGGACGGGGTAGT
 CTCAGCTGGCCGGCTGTTGAATGAGGCTCAGTACTTACAGAACTGTTGCTG
 CACATCTTGAAACACTTGCTGGGATTAATCTTCAGGTTAACCTAACAGAAAGGCTC
 GAGAAGGTATATTGCTGTGACAGTGAGC9CAACCGATTCAATGGTGTAGAGT
 GAAGCCACAGATGTCTAGCACCATTTGAATCGGTTATGCTCTGCTCGGAATTC
 AAGGGCTACTTTAGGAGCAATTAATCTGTTTACTAATACTGAATACCTTGCTATCT
 CTTTGATACATTTGGCCGGCTGCTGCTGGTGCCTGCGCGCGCGGTATCGCC
 CCGCCCTGGGCGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATG
 GCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGCGCGCTCGGAG
 AGCGGGCGGGTAGTCAACCCACACAAGGAAAGGGCTTTCCGTCCTCAGCCGTC
 GCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTT

Фиг. 22А

CTCGAGCTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGA
 GTTCCCCCACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA
 ATTCTCCTTGGAAATTGGCCTTTTGGAGTTTGGATCTTGGTTCATCTCAAGCCCTCAG
 ACAGTGGTCAAAGTTTCTTCTCCATTTCAGGTGTCGTGAAAAGCTAGTGGCGGC
GCAATAAAAGATCTTTATTTTCATAGATCTGGTGTGGTTTTTTGTGTGTAGCA
 ATGGCTACGTAGATAATTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACACAAGGAACCCCTAG
 TGTATGGAGTTGGCCTCTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGGCGGAC
 CAAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCGGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCG
 CGCANNNNNAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
 AGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTA
 GGTATTTCCATGAGCGTTTTCCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATA
 TTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGGATTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTA
 ATCAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTCGCTGATGGACAGACTCTTTACTCG
 GTGGCTCCTGATTATAAAAACACTCTCAGGATTCTGGCGTACCCTTCTGCTA
 AAATCCCTTTAATCGGCCTCTCTGTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAGCA
 CGTTATACGTCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
 CGCGCGGTGTGGTGTACGCGCAGCTGTACCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGC
 GCGCGCTCTTCCCTTTCTTCCCTTCTTCTGCGCAGCTTCCCGGCTTCCCGGTC
 AAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGATTACCGACCTCG
 ACCCCAAAAAAGTTGATTAGGGGTGATGGTTCACGTACTGGGCCATCGCCGTATAGA
 CGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGTTCTTTAATAGTGACTCTTGTCCA
 AACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTGTG
 CGGATTTCGGCTATTGGTTAAAAATGAGTGATTAAACAAAAATTAAACGGAAT
 TTTAAACAAATATTAACTTTACAAATTTAAATATTGCTTATACAACTTCTCTGTTT
 TGGGGCTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTACGATT
 ACCGTTATCGATTCTCTGTTTGTCTCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTT
 GTAGAGACTCTCAAAAATAGCTACCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGG
 TTGAATATCATATTGATGGTATTGACTGTCTCCGGCTTTCTCACCCGTTTGAATC
 TTTACCTACACATTACTCAGGCAATGCAATTTAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTT
 TATCTTTCGCTTGAATAAAGGCTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCAATAATGTT
 TTTGGTACAACCGATTAGCTTTATGCTTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATT
 CTTTGCCTTGCTGTATGATTATTGATGTGGAGTTCTGATGCGGTATTTCTC
 CTTACGCTATGTGCGGTTTTCACACCGCATATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCT
 CTGATGCGCGATAGTTAAGCCAGCCCGGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT
 GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCTCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
 GCTGCTATGTGACAGGTTTTCACCGTATCACCGAAACGCGCAGAGCAAGAGGC
 CTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTCTAGATAAATAGGTTCTTACAGCT
 CAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGGGGAACCCCTATTGTTTATTTCATAAAT
 ACATTCAAAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATA
 TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACAACTTTCCGCTGTCCCTTATTCCTTTT
 GCGGCATTTGCTTCTGTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAAGAT
 GCTGAAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCG
 TAAGATCTTGAGAGTTTTCGCCCGGAAGACGTT

Фиг. 22В

TTCCAAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGTAATTATCCCGTATTGA
 CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGA
 GTACTACCAAGTCAAGAAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
 GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAAGTTACTTCTGACAACGA
 TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCGACAACATGGGGGATCATGTAACCT
 GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAAGCCATACCAAAACGAGCGGTGAC
 ACCACGATGCTGTAGCAATGGCAACACGTTTGGCAAACTATTAACTGGCGAACT
 ACTTACTTACTGCTCCCGGCAACAAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGC
 AGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGG
 AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
 CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA
 AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAAGCATTTGGTAACTGTCAGAC
 CAAGTTTACTCATATATCTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGA
 TCTAGGTGAAGATCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTC
 GTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAAGGATCTTCTTGAGATCTTT
 TTTTCTGCGCGTAACTGCTGCTTGCACCAAAACCAACCGCTACCAAGCGGTGGT
 TTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAG
 AGGCGAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA
 GAACCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGC
 TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
 TAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTACACACAGCCAGCTTGGAGC
 GAACGACCTACACGAACTGAGATACCTACAGCTGAGCTATGAGAAAGGCGCACG
 CTTTCCGGAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGTTAAGCGGAGGGTCCGAACAG
 GAGAGCGCAGAGGAGCTTCCAGGGGAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTCTC
 GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCAATTTTGTATGCTGTCAGGGGGGCGG
 AGCCTATGGAACCAAGCGCAGCAACCGCGGCTTTTACGGTTCTTGGCTTTTGTGG
 CCTTTGCTACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCGTGATAACCGTATTAC
 CGGTTTGTAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGACGAGT
 CAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

Фиг. 22С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2