

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044183**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.07.28**

**(21)** Номер заявки  
**201890543**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.09.16**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 15/64** (2006.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБЫ И МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ GALGT2**

---

**(31)** **62/220,107; 62/221,068; 62/301,260**

**(32)** **2015.09.17; 2015.09.20; 2016.02.29**

**(33)** **US**

**(43)** **2018.08.31**

**(86)** **PCT/US2016/052051**

**(87)** **WO 2017/049031 2017.03.23**

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

**(72)** Изобретатель:  
**Мартин Пол Тейлор (US)**

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

**(56)** (CHICOINE, LG et al.) Vascular Delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the Gastrocnemius Muscle of the Rhesus Macaque Stimulates the Expression of Dystrophin and Laminin  $\alpha 2$  Surrogates. *Molecular Therapy*. 22 October, 2013; Vol. 22, No. 4; pages 713-724; abstract; page 717, column 2, paragraph 2, page 719, column 1 - paragraph 1, column 2 - paragraph 1; DOI: 10.1038/mt.2013.246.

US-A1-20060194265

(DEGROOTE, SG et al.) B4GALNT2 Gene Expression Controls the Biosynthesis of Sda and Sialyl Lewis X Antigens in Healthy and Cancer Human Gastrointestinal Tract. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 19 June, 2014; pages 442-449; Sequence accession NM\_001159387; DOI: 10.1016/j.biocel.2014.06.009. Genbank supplement pages 1-4

---

**(57)** Настоящее изобретение относится к доставке с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) полинуклеотида GALGT2. Данное изобретение предусматривает rAAV и способы использования rAAV для генной терапии нервно-мышечных заболеваний с использованием GALGT2. Типичные примеры нервно-мышечных заболеваний включают, без ограничений, мышечные дистрофии, такие как мышечная дистрофия Дюшенна, врожденная мышечная дистрофия 1А и тазово-плечевая мышечная дистрофия 2D.

---

**B1**

**044183**

**044183 B1**

### **Заявление о правительственном интересе**

Данное изобретение было создано при поддержке правительства по грантам U54 NS055959 и R01 AR049722, предоставленным Национальными институтами здравоохранения (National Institutes of Health). Правительство имеет определенные права на данное изобретение.

### **Включение перечня последовательностей в качестве ссылки**

Данная заявка содержит, в качестве отдельной части описания, перечень последовательностей в машиночитаемой форме (название файла: 49985PCT\_Seqlisting\_Russian\_FIN.txt; 14467 байт - текстовый файл Unicode; создан 15 сентября 2016г.), который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к доставке рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (гAAV) полинуклеотида GALGT2. Данное изобретение предлагает гAAV и способы использования гAAV для генной терапии GALGT2 нервно-мышечных заболеваний. Типичные примеры нервно-мышечных заболеваний включают, без ограничений, мышечные дистрофии, такие как мышечная дистрофия Дюшенна, врожденная мышечная дистрофия 1А и тазово-плечевая мышечная дистрофия 2D.

### **Известный уровень техники**

Мышечные дистрофии (МД) представляют собой группу наследственных заболеваний. Эта группа характеризуется прогрессирующей слабостью и дегенерацией скелетных мышц, которые управляют движениями. Некоторые формы МД развиваются в младенчестве или детстве, в то время как другие могут не проявляться до достижения среднего возраста или позже. Заболевания различаются по распространенности и степени мышечной слабости (некоторые формы МД также поражают сердечную мышцу), возрасту начальных проявлений, скорости прогрессирования и порядку наследования.

Одним из типов МД является мышечная дистрофия Дюшенна (МДД). Она представляет собой наиболее распространенную тяжелую детскую форму мышечной дистрофии, поражающую 1 из 5000 новорожденных мальчиков. Наследование происходит по X-связанному рецессивному типу. МДД вызывают мутации гена МДД, приводящие к отсутствию белка дистрофина (427 кДа) в скелетных и сердечных мышцах, а также желудочно-кишечном (GI) тракте и сетчатке. Дистрофин не только защищает сарколемму от эксцентрических сокращений, но также закрепляет ряд сигнальных белков в непосредственной близости к сарколемме. Клинические симптомы МДД обычно впервые проявляются в возрасте от 3 до 5 лет, изменения походки и ухудшение двигательных навыков типично приводят к проведению диагностической оценки. МДД неумолимо прогрессирует, с потерей способности передвигаться к двенадцати годам. Ранее пациенты погибали от респираторных осложнений ближе к двадцати годам, но улучшение поддерживающего лечения - и, в частности, рациональное использование вспомогательной искусственной вентиляции лёгких в ночное время - увеличило ожидаемую продолжительность жизни почти на десятилетие. Увеличенная продолжительность жизни выявляет почти всеобщее ухудшение сердечной функции, с осложнениями дилатационной кардиомиопатии. Это создает дополнительную клиническую симптоматику и необходимость диагностики и медицинского вмешательства, которых ранее не существовало. При МДД может также наблюдаться непрогрессирующая когнитивная дисфункция. Несмотря на буквально сотни клинических испытаний, касающихся МДД, лечение кортикостероидами остается единственной терапией, последовательно демонстрирующей эффективность. Текущее стандартное лечение МДД включает использование преднизона или дефлазакорта, которое может продлить способность передвигаться на несколько лет, но сопровождается значительными побочными эффектами, и существуют ограниченные доказательства какого-либо его влияния на продолжительность жизни.

Другим типом МД является врожденная мышечная дистрофия 1А (ВМД1 А). ВМД1А принадлежит к группе нервно-мышечных заболеваний с начальными проявлениями при рождении или в младенчестве, характеризующихся гипотонией, мышечной слабостью и мышечным истощением. На ВМД1А приходится 30-40% врожденных мышечных дистрофий, с некоторыми региональными отклонениями. Уровень распространенности оценивается как 1/30000. Это заболевание проявляется при рождении или в первые несколько месяцев жизни гипотонией и мышечной слабостью в конечностях и туловище. Могут также наблюдаться респираторные нарушения и нарушения связанные с приёмом пищи. Развитие двигательных навыков замедлено и ограничено (сидение или стояние возможны только с посторонней помощью). Младенцы демонстрируют раннюю ригидность позвоночника, сколиоз и дыхательную недостаточность. Затронута лицевая область с типичным удлинённым миопатическим лицом, и позднее могут появиться офтальмоплегические нарушения. Возможны эпилептические приступы, хотя они наблюдаются менее чем у трети субъектов. Интеллектуальное развитие в норме. ВМД1А вызывается мутациями гена LAMA2, кодирующего альфа-2 цепь ламинина. Передача аутосомно-рецессивная. Современное лечение является симптоматическим. Оно предусматривает мультидисциплинарный подход, включающий физиотерапевтов, специалистов по трудотерапии и логопедов, с целью оптимизации всех способностей субъекта. Судорожные припадки или другие неврологические осложнения требуют специального лечения. Прогноз МДС1А очень тяжелый, поскольку значительная часть больных детей не достигает подросткового возраста. В настоящее время, прогноз можно улучшить только внимательным мультидисциплинарным (особенно ортопедическим и респираторным) лечением.

Еще одним типом МД является тазово-плечевая мышечная дистрофия (ТПМД). ТПМД представляют собой редко встречающиеся состояния и проявляются по-разному у разных людей по показателям возраста начальных проявлений, областей мышечной слабости, вовлеченности сердца и органов дыхания, скорости прогрессирования и тяжести. ТПМД могут начинаться в детстве, подростковом возрасте, у молодых совершеннолетних людей или даже позже. Оба пола поражаются в равной степени. ТПМД вызывает слабость в плечевом и тазовом поясах, причем близлежащие мышцы в верхней части ног и рук иногда также слабеют со временем. Слабость в ногах часто появляется раньше, чем в руках. Лицевые мышцы обычно остаются непораженными. По мере прогрессирования состояния, люди часто испытывают проблемы с ходьбой и со временем у них может возникнуть необходимость в кресле-каталке. Поражение мышц плеч и рук может приводить к трудности поднятия рук над головой и поднимания предметов. При некоторых типах ТПМД могут быть поражены сердечная и дыхательные мышцы.

Существует по меньшей мере девятнадцать форм ТПМД которые классифицируются по связанным с ними генетическим дефектам.

Тип	Порядок наследования	Ген или хромосома	
ТПМД1А	Аутосомно-доминантный	Ген миотилина	
ТПМД1В	Аутосомно-доминантный	Ген ламина А/С	
ТПМД1С	Аутосомно-доминантный	Ген кавеолина	
ТПМД1D	Аутосомно-доминантный	Хромосома 7	
ТПМД1Е	Аутосомно-доминантный	Ген десмина	
ТПМД1F	Аутосомно-доминантный	Хромосома 7	
ТПМД1G	Аутосомно-доминантный	Хромосома 4	
ТПМД1Н	Аутосомно-доминантный	Хромосома 3	
ТПМД2А	Аутосомно-рецессивный	Ген кальпаина-3	
ТПМД2В	Аутосомно-рецессивный	Ген дисферлина	ТПМД2С
	Аутосомно-рецессивный	Ген гамма-саркогликана	
ТПМД2D	Аутосомно-рецессивный	Ген альфа-саркогликана	
ТПМД2Е	Аутосомно-рецессивный	Ген бета-саркогликана	
ТПМД2F	Аутосомно-рецессивный	Ген дельта-саркогликана	
ТПМД2G	Аутосомно-рецессивный	Ген телетонина	
ТПМД2Н	Аутосомно-рецессивный	TRIM32	
ТПМД2I	Аутосомно-рецессивный	Ген FKRP	
ТПМД2J	Аутосомно-рецессивный	Ген титина	
ТПМД2K	Аутосомно-рецессивный	Ген POMT1	
ТПМД2L	Аутосомно-рецессивный	Ген фукутина	
ТПМД2M	Аутосомно-рецессивный	Ген фукутина	
ТПМД2N	Аутосомно-рецессивный	Ген POMT2	
ТПМД2O	Аутосомно-рецессивный	Ген POMGnT1	
ТПМД2Q	Аутосомно-рецессивный	Ген плектина	

В настоящее время доступны специализированные тесты на ТПМД через национальную схему диагностики, Национальную консультативную экспертную группу (National Commissioning Group, NCG).

Ген GALGT2 (иначе известный как B4GALNT2) кодирует  $\beta$ 1-4-N-ацетил-D-галактозамин ( $\beta$ GalNAc) гликозилтрансферазу. Сверхэкспрессия GALGT2 исследовалась в трех разных моделях мышечной дистрофии: МДД, ТПМД2D и МДС1А (Xu et al., Am. J. Pathol, 175: 235-247 (2009); Xu et al., Am. J. Pathol., 171: 181-199 (2007); Xu et al., Neuromuscul. Disord., 17: 209-220 (2007); Martin et al., Am. J. Physiol. Cell. Physiol., 296: C476-488 (2009); и Nguyen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 5616-5621 (2002)). Сообщалось, что сверхэкспрессия GALGT2 в скелетных мышцах индуцирует гликозилирование альфа-дистрогликана углеводом  $\beta$ 1-4-N-ацетил-D-галактозамином (GalNAc) с образованием углеводного анти-

гена СТ (Neu5Ac/Gcα2-3(GalNAcβ1-4)Galβα1-4GlcNAcβ-). Гликозилтрансфераза GALGT2 и углевод СТ, который она создает, в норме присутствуют только в нервномышечных и мышечно-сухожильных соединениях в скелетных мышцах взрослых людей, приматов за исключением человека, грызунов и всех других млекопитающих, исследованных до настоящего времени (Martin et al., *J. Neurocytol*, 32: 915-929 (2003)). Сообщалось, что сверхэкспрессия GALGT2 в скелетной мышце стимулирует эктопическое гликозилирование экстраинаптической мембраны, стимулируя эктопическую сверхэкспрессию клеточного каркаса нормально синаптических белков, являющихся ортологами или гомологами белков, отсутствующих при различных формах мышечной дистрофии, включая суррогаты дистрофина (например, утрофин, плектин1) и суррогаты ламинина α2 (ламинин α5 и агрин) (Xu et al. 2009, *supra*; Xu et al, *Am. J. Path.* 2007, *supra*; Xu et al., *Neuromuscul. Disord.* 2007, *supra*; Nguyen et al., *supra*; Chicoine et al., *Mol. Ther.*, 22: 713-724. (2014). Сообщалось, что индукция таких суррогатов, как группы, с помощью GALGT2 упрочняет целостность мембраны сарколеммы и предотвращает повреждение мышцы в дистрофии-дефицитных мышцах, а также в мышцах дикого типа (Martin et al., *supra*). Сообщалось, что сверхэкспрессия GALGT2 в скелетной мышце предотвращает повреждение мышцы и подавляет болезни мышц. Это происходит в модели МДД у мышей mdx (Xu et al., *Neuromuscul. Disord.* 2007, *supra*; Martin et al.(2009), *supra*; Nguyen et al., *supra*), где наблюдалось улучшение, равное эффекту переноса гена микродистрофина, несмотря на то, что трансдукция подвергалась только половина волокон (Martin et al.(2009), *supra*). Следует отметить, что, как сообщалось, что перенос гена GALGT2 также имел превентивный эффект в модели  $dy^w$  врожденной мышечной дистрофии 1A (Xu et al, *Am. J. Path.* 2007, *supra*) и модели тазово-плечевой мышечной дистрофии типа 2D у мышей  $Sgca^{-/-}$  (Xu et al. 2009, *supra*).

Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой дефицитный по репликации парвовирус, одноцепочечный ДНК-геном которого имеет длину примерно 4,7 т.п.н., включая инвертированный концевой повтор (ИКП) из 145 нуклеотидов. Существует множество серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV являются известными. Например, полный геном AAV-1 внесен в GenBank, № доступа NC\_002077; полный геном AAV-2 внесен в GenBank, № доступа NC\_001401, и приведен в работе Srivastava et al., *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983); полный геном AAV-3 внесен в GenBank, № доступа NC\_1829; полный геном AAV-4 внесен в GenBank, № доступа NC\_001829; геном AAV-5 внесен в GenBank, № доступа AF085716; полный геном AAV-6 внесен в GenBank, № доступа NC\_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 внесены в GenBank, №№ доступа AX753246 и AX753249, соответственно; геном AAV-9 приведен в Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 приведен в *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 приведен в *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). Цисдействующие последовательности, управляющие репликацией (гер) вирусной ДНК, капсидированием/упаковкой и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ИКП AAV. Три промотора AAV (обозначенные p5, p19 и p40 по их относительному положению на картах) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены гер и сар. Два промотора гер (p5 и p19), в сочетании с дифференциальным сплайсингом единственного интрона AAV (по нуклеотидам 2107 и 2227), приводят к продуцированию четырех белков гер (гер 78, гер 68, гер 52, и гер 40) из гена гер. Белки гер обладают множественными ферментативными свойствами, которые в конечном счете обеспечивают репликацию вирусного генома. Ген сар экспрессируется с промотора p40 и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты начала трансляции приводят к продуцированию трех родственных капсидных белков. Единственный консенсусный сайт полиаденилирования расположен в позиции карты 95 генома AAV. Обзор жизненного цикла и генетических особенностей AAV приведен в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

AAV обладает уникальными особенностями, делающими его привлекательным для использования в качестве вектора для доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфекция AAV клеток в культуре является нецитопатической, и природная инфекция людей и других животных является скрытой и бессимптомной. Более того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, позволяя обеспечить возможность выбора мишеней *in vivo* в большом количестве разных тканей. Кроме того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и неделящиеся клетки, и может сохраняться по существу на протяжении времени жизни этих клеток в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Провирусный геном AAV является инфекционным в виде клонированной ДНК в плаزمиде, что позволяет конструировать рекомбинантные геномы. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV, капсидированием генома и интеграцией, содержатся в ИКП генома AAV, некоторая часть или вся внутренняя часть генома размером приблизительно 4,3 т.п.н. (кодирующая репликацию и структурные капсидные белки, гер-сар) может быть заменена на чужеродную ДНК. Белки гер и сар могут быть использованы в транс(-конфигурации). Другой важной особенностью AAV является то, что он представляет собой чрезвычайно стабильный и живучий вирус. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовирусов (56-65°C в течение нескольких часов), что делает холодильное хранение AAV менее критичным. AAV даже может быть лиофилизирован. Наконец, инфицированные AAV клетки не резистентны к суперинфекции.

AAV, обозначенный как rh.74, использовался для доставки ДНК, кодирующих различные белки. Хи

et al., *Neuromuscular Disorders*, 17: 209-220 (2007) и Martin et al., *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 296: 476-488 (2009) касаются экспрессии с помощью rh.74 GalNAc трансферазы цитотоксических Т-лимфоцитов при мышечной дистрофии Дюшенна. Rodino-Klapac et al., *Mol. Ther.*, 18(1): 109-117 (2010) описывают экспрессию AAV rh.74 продукта слияния микродистрофина с белковой меткой FLAG после доставки AAV rh.74 путем сосудистой перфузии конечностей.

Мышечные дистрофии являются группой заболеваний без идентифицируемого способа лечения, которые оказывают существенное влияние на отдельных лиц, семьи и сообщества. Издержки не поддаются исчислению. Индивидуумы страдают от эмоционального напряжения и снижения качества жизни, ассоциированного с потерей чувства собственного достоинства. Чрезвычайные физические проблемы, вызванные потерей функции конечностей, создают трудности в повседневной жизни. Семейная динамика страдает из-за финансовых потерь и проблем в межличностных отношениях. Братья и сестры больных чувствуют отчуждение, и конфликты между супругами часто приводят к разводу, особенно если ответственность за мышечную дистрофию может быть возложена на одного из родителей. Бремя поиска лечения часто становится пожизненным, сконцентрированным стремлением, отвлекающим внимание и бросающим вызов всем аспектам жизни. За пределами семьи, общество несет финансовое бремя из-за потребности в дополнительных сооружениях для удовлетворения потребностей популяции больных мышечной дистрофией в специальном образовании, специальном транспорте, и затрат на периодическую госпитализацию для лечения рецидивирующих инфекций дыхательных путей и сердечных осложнений. Финансовые затраты покрываются правительственными органами штатов и федеральными учреждениями, распределяющими финансовые обязательства между налогоплательщиками.

Таким образом, в текущем уровне техники продолжает существовать значительная потребность в способах лечения нервно-мышечных заболеваний, включая, без ограничений, мышечные дистрофии, такие как МДД, МДС1А и ТПМД2D.

#### Сущность изобретения

В данном документе предлагаются способы лечения нервно-мышечного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, в которых субъекту вводят рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV), такой как гAAVrh74.MCK.GALGT2, где: путь введения - внутримышечный, и доза введенного гAAV составляет от примерно  $3 \times 10^{11}$  вирусных геномов (вг)/инъекцию до примерно  $5 \times 10^{12}$  вг/инъекцию, путь введения - внутримышечный, и доза введенного гAAV составляет примерно  $3 \times 10^{11}$  вг/инъекцию, путь введения внутримышечный, и доза введенного гAAV составляет примерно  $1 \times 10^{10}$  вг/инъекцию, путь введения - внутримышечный, и доза введенного гAAV составляет примерно  $5 \times 10^{12}$  вг/инъекцию, путь введения - внутриартериальная перфузия конечностей, и доза введенного гAAV составляет от примерно  $6 \times 10^{12}$  вг/кг/конечность до примерно  $4,8 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность, путь введения - внутриартериальная перфузия конечностей, и доза введенного гAAV составляет примерно  $6 \times 10^{12}$  вг/кг/конечность, путь введения - внутриартериальная перфузия конечностей, и доза введенного гAAV составляет примерно  $1,2 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность, путь введения - внутриартериальная перфузия конечностей, и доза введенного гAAV составляет примерно  $2,4 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность, путь введения - внутриартериальная перфузия конечностей, и доза введенного гAAV составляет примерно  $4,8 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность, путь введения - системное внутривенное введение, и доза введенного гAAV составляет от примерно  $2 \times 10^{14}$  вг/кг до примерно  $6 \times 10^{15}$  вг/кг, путь введения - системное внутривенное введение, и доза введенного гAAV составляет от примерно  $4 \times 10^{14}$  вг/кг до примерно  $6 \times 10^{15}$  вг/кг, путь введения - системное внутривенное введение, и доза введенного гAAV составляет примерно  $4 \times 10^{14}$  вг/кг, путь введения - системное внутривенное введение, и доза введенного гAAV составляет примерно  $8 \times 10^{14}$  вг/кг, путь введения - системное внутривенное введение, и доза введенного гAAV составляет примерно  $2 \times 10^{15}$  вг/кг, или путь введения - системное внутривенное введение, и доза введенного гAAV составляет примерно  $6 \times 10^{15}$  вг/кг.

Примерами нервно-мышечных заболеваний, лечение которых предусматривается, являются мышечная дистрофия Дюшенна (МДД); мышечная дистрофия Беккера; врожденная мышечная дистрофия (ВМД) 1A, 1B, 1C и 1D; тазово-плечевая мышечная дистрофия (ТПМД) 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 2O и 2Q; миопатия Бетлема; врожденная мышечная дистрофия Ульриха; мышечно-глазо-мозговая болезнь; врожденная мышечная дистрофия Фукуямы; синдром Уокера-Варбурга; миотоническая дистрофия; миастенические синдромы; врожденные Миастении; миопатия с тельцами включения; миозит с тельцами включения; мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса; дистальная мышечная дистрофия; дерматомиозит; центроядерная миопатия; плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия; миопатия Миоши; митохондриальная миопатия; немалиновая миопатия; миопатия Нонака; тяжёлая псевдопаралитическая миастения; и полимиозит. Таким образом, в числе прочего, мышечные дистрофии являются предусматриваемыми нервно-мышечными заболеваниями.

Способы приводят к улучшению состояния человека, например, по показателям удельной абсолютной мышечной силы; уменьшения усилия при эксцентрических сокращениях мышц; уровня креатинкиназы (КК) сыворотки; уровня сердечного тропонина сыворотки; уровня матриксной металлопротеиназы MMP9 сыворотки; силы захватывания; момента вращения конечностей; подвижности или гибкости конечностей; способности передвигаться; теста с 6-минутной ходьбой; силы сгибающей или разгибающей

мышцы колена; максимального произвольного изометрического мышечного сокращения; амбулаторного обследования "Северная звезда"; мышечной массы, сокращения жировой ткани или отека по количественным показателям T2-взвешенной МРТ конечности; контрактуры мышц; углов сочленения суставов; сердечной функции (частота сердечных сокращений, минутный объем сердца, фракция укорочения в процентах, систолический объем крови); дыхания (включая частота дыхания, насыщение крови кислородом, потребность в дополнительном кислороде); некроза мышц; регенерации мышц; мышечного истощения; мышечного воспаления; кальцификации мышц; центральной нуклеации мышц; размера мышц или размера мышечных волокон; продолжительности жизни; и/или экспрессии дистрофина или суррогатного белка ламинина альфа 2 (утрофин, плектин 1, ламинин альфа 5, агрин).

Также данное изобретение предлагает гAAV, кодирующий полипептид GALGT2, такой как gAAVrh74.MCK.GALGT2.

#### Детальное описание

Настоящее изобретение предусматривает способы и продукты для лечения нервно-мышечных заболеваний. Способы включают доставку полинуклеотидов GALGT2 в клетки мышц субъекта с использованием AAV в качестве вектора доставки гена. Субъекты включают, без ограничений, млекопитающих, таких как собаки, кошки и люди. В некоторых вариантах реализации, субъекты представляют собой пациентов-людей. В некоторых вариантах реализации, субъекты являются детьми.

В одном аспекте, предлагаются способы лечения нервно-мышечных заболеваний, включающие введение субъекту рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), кодирующего GALGT2.

Нервно-мышечные заболевания, предусматриваемые в данном документе, включают, без ограничений, мышечную дистрофию (МД). Нервно-мышечные заболевания, предусматриваемые в данном документе, также включают нервно-мышечные заболевания, отличные от МД. Таким образом, в некоторых вариантах реализации, нервно-мышечные заболевания, предусматриваемые в данном документе, включают, без ограничений, мышечную дистрофию Дюшенна (МДД); мышечную дистрофию Беккера; врожденную мышечную дистрофию (ВМД) 1A, 1B, 1C и 1D; тазово-плечевую мышечную дистрофию (ТПМД) 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 2O и 2Q; миопатию Бетлема; врожденную мышечную дистрофию Ульриха; мышечно-глазо-мозговую болезнь; врожденную мышечную дистрофию Фукуямы; синдром Уокера-Варбурга; миотоническую дистрофию; миастенические синдромы; врожденные миастении; миопатию с тельцами включения; миозит с тельцами включения; мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса; дистальную мышечную дистрофию; дерматомиозит; центроядерную миопатию; плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию; миопатию Миоши; митохондриальную миопатию; немалиновую миопатию; миопатию Нонака; тяжелую псевдопаралитическую миастению; и полимиозит. В некоторых вариантах реализации, МД представляет собой МДД. В некоторых вариантах реализации, МД представляет собой ВМД1A. В некоторых вариантах реализации, МД представляет собой ТПМД2D.

В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, возраст субъекта составляет по меньшей мере 1 год (например, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), или старше. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект имеет мужской пол. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект имеет женский пол. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект не требует постельного режима во время лечения. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект не является амбулаторным пациентом в момент начала лечения. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект является особой с подтвержденной мутацией в гене МДД с использованием клинически принятой методики определения мутаций.

Мутации в гене дистрофина, приводящие к фенотипу МДД, хорошо известны специалистам, так же как и способы их идентификации у субъекта. См., например, Лейденскую базу данных мутаций мышечной дистрофии Дюшенна (Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database, Leiden University Medical Center, The Netherlands), и Aartsma-Rus et al., Hum. Mut., 30:293-299 (2009).

В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект демонстрирует, по результатам магнитно-резонансных исследований короткого разгибателя пальцев стопы (EDB), сохранение достаточной мышечной массы, чтобы позволить проведение трансфекции или переноса гена. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект получает стабильную дозу кортикостероидной терапии (например, дефлазакорт, преднизон, или их формы генериков), например, на протяжении по меньшей мере 4 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) недель перед началом лечения. В определенных вариантах реализации, субъект получает фоновую стероидную терапию (например, перемежающуюся или хроническую/непрерывную фоновую стероидную терапию). Квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятно, что такими субъектами являются пациенты с продолжающимся использованием стероидов (или кортикостероидов), в дополнение к которому проводят другое лечение, такое как генная терапия, описанная в данном документе.

В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъектом является пациент, не имеющий активной вирусной инфекции. В некоторых вариантах реализации любых

способов, описанных в данном документе, субъект не имеет мутации МДД, при отсутствии слабости или потери функции. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект не демонстрирует симптомы кардиомиопатии, такие как одышка при физической нагрузке, отек стопы, одышка в положении лежа или хрипы у основания легких. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект, по результатам эхокардиограммы, не имеет фракцию изгнания ниже примерно 40%. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект во время проведения лечения не является пациентом с существующими серологическими доказательствами инфекции ВИЛ (поскольку субъект может находиться в состоянии с ослабленным иммунитетом) или гепатита А, В, или С (поскольку субъект может иметь повышение трансаминазы).

В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъекту не был установлен диагноз аутоиммунной болезни, у него нет аутоиммунной болезни, или не проводится ее лечение. В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект не имеет персистирующей лейкопении или лейкоцитоза (количество лейкоцитов крови  $\leq 3,5$  тыс./мкл или  $\geq 20,0$  тыс./мкл) или абсолютное количество нейтрофилов  $< 1,5$  тыс./мкл.

В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект не имеет сопутствующего заболевания (например, вирусной инфекции или аутоиммунной болезни) или потребности в хроническом медикаментозном лечении, которые, по мнению врача, создают ненужный риск для переноса гена.

В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект не имеет титра связывающих антител гAAVrh74 $\leq 1:400$  при определении методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект не имеет титра связывающих антител гAAVrh74 $\leq 1:50$  при определении методом твердофазного иммуноферментного анализа.

В некоторых вариантах реализации любых способов, описанных в данном документе, субъект не имеет выявляемых циркулирующих анти-Sda антител, например, при определении методом твердофазного иммуноферментного анализа биологического образца субъекта (Группы крови: P, I, Sda, и Pг. AABV (1991)). Гликан Sda является структурным элементом человеческой группы крови, вырабатываемым GALGT2. Антиген группы крови Sda идентичен по структуре гликану CT, вырабатываемому GALGT2 у мышей (GalNAcb1,4(Neu5Aca2,3)Galb1,4GlcNAc-). Хотя данное изобретение не ограничено какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, присутствие или количество гликановой структуры CT, как ожидается, будет повышенным в клетках, экспрессирующих GALGT2, и авторы изобретения считают, что субъекты с такими антителами Sda, составляющие по оценкам 0,2% популяции субъектов, могут быть подвержены риску антитело-медируемого отторжения ткани после лечения гAAVrh74.MCK.GALGT2.

Пригодные биологические образцы для использования в способах, описанных в данном документе, включают, например, любую биологическую жидкость. Биологический образец может быть, например, образцом, полученным от субъекта (например, млекопитающего, такого как человек), или может быть выделен у такого субъекта. Биологический образец может быть получен путем биопсии мышцы. Биологический образец также может быть биологической жидкостью, такой как моча, цельная кровь или ее фракция (например, плазма или сыворотка), слюна, семенная жидкость, мокрота, цереброспинальная жидкость, слезы или слезь. Биологический образец может быть дополнительно фракционирован, при необходимости, до фракции, содержащей конкретные анализы (например, белки), представляющие интерес. Например, образец цельной крови может быть фракционирован для выделения сыворотки или на фракции, содержащие конкретные типы белков. При необходимости, биологический образец может быть комбинацией разных биологических образцов субъекта, такой как комбинация двух разных жидкостей.

Биологические образцы, пригодные для использования по изобретению, могут быть свежими или замороженными образцами, отобранными у субъекта, или архивными образцами с известным диагнозом, курсом лечения и/или историей результатов. Биологические образцы могут быть получены от субъекта, например, субъекта, имеющего, подозреваемого на наличие, или с риском развития, рака или инфекции (например, вирусной инфекции). Могут быть использованы любые пригодные способы получения биологических образцов, хотя типичные примеры способов включают, например, открытую биопсию мышц, флеботомию, мазок (например, буккальный мазок), лаваж, или процедуру аспирационной тонкоигольной биопсии. Биологические образцы также могут быть получены из костного мозга или селезенки.

В некоторых вариантах реализации, из биологического образца может быть приготовлен белковый экстракт. В некоторых вариантах реализации, белковый экстракт содержит общий белок. Способы экстракции белков хорошо известны специалистам. См., например, Roe "Protein Purification Techniques: A Practical Approach", 2nd Edition, Oxford University Press (2001). Многочисленные различные и универсальные наборы могут быть использованы для экстракции белков из телесных жидкостей и тканей, и являются коммерчески доступными, например, от фирм BioRad Laboratories (Hercules, CA), BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Calbiochem (San Diego,

CA), Pierce Biotechnology (Rockford, IL), и Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA).

Способы получения и/или хранения образцов, позволяющие сохранить активность или целостность клеток в биологическом образце, хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники. Например, биологический образец может быть дополнительно введен в контакт с одним или несколькими дополнительными агентами, такими как соответствующие буферы и/или ингибиторы, включая ингибиторы протеаз, предназначенными для сохранения или минимизации изменений (например, изменений осмолярности или pH) в структуре белка. Такие ингибиторы включают, например, хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), этиленгликольтетрауксусная кислота (EGTA), ингибиторы протеазы, такие как фенилметилсульфонил фторид (PMSF), апротинин и лейпептин. Пригодные буферы и условия хранения или иных манипуляций с цельными клетками описаны, например, в Pollard and Walker, "Basic Cell Culture Protocols," Volume 75, Methods in Molecular Biology, Humana Press (1997); Masters, "Animal cell culture: a practical approach," Volume 232, Practical Approach Series, Oxford University Press (2000); и Jones "Human cell culture protocols," Volume 2, Methods in Molecular Medicine, Humana Press (1996).

Способы лечения нервно-мышечных заболеваний, раскрытые в данном документе, приводят к трансдукции клеток мышц (например, клеток скелетных мышц, гладких мышц или сердечной мышцы) полинуклеотидом GALGT2. Эффективная для субъекта доза, или эффективные многократные дозы, композиции, содержащей gAAV в соответствии с данным изобретением, представляет собой дозу, которая предотвращает, замедляет прогрессирование или улучшает (устраняет или уменьшает) патологию мышцы, ассоциированную с нервно-мышечным заболеванием, лечение которого проводится. Влияние на мышечную патологию может быть продемонстрировано улучшением одного или нескольких показателей, стандартных в данной области техники, таких как: удельная абсолютная мышечная сила; уменьшение усилия при эксцентрических сокращениях мышц; уровень креатинкиназы (КК) сыворотки; уровень сердечного тропонина сыворотки; уровень матриксной металлопротеиназы MMP9 сыворотки; сила захватывания; момент вращения конечностей; подвижность или гибкость конечностей; способность передвигаться; тест с 6-минутной ходьбой; сила сгибающей или разгибающей мышцы колена; максимальное произвольное изометрическое мышечное сокращение; амбулаторное обследование "Северная звезда"; мышечная масса, сокращение жировой ткани или отека по количественным показателям T2-взвешенной МРТ конечности; контрактуры мышц; углы сочленения суставов; сердечная функция (частота сердечных сокращений, минутный объем сердца, фракция укорочения в процентах, систолический объем крови); дыхание (включая частоту дыхания, насыщение крови кислородом, потребность в дополнительном кислороде); некроз мышц; регенерация мышц; мышечное истощение; мышечное воспаление; кальцификация мышц; центральная нуклеация мышц; размер мышц или размер мышечных волокон; продолжительность жизни; и экспрессия дистрофина или суррогатного белка ламинина альфа 2 (утрофин, плектин 1, ламинин альфа 5, агрин). См., например, Forbes et al., Radiology, 269(1): 198-207 (2013); Govoni et al., Cell Mol. Life Sci., 70(23): 4585-4602 (2013); и Chandrasekharan and Martin, Methods Enzymol., 479: 291-322 (2010). Если дозу вводят до развития нервно-мышечного заболевания, введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития нервно-мышечного заболевания, введение является терапевтическим. Таким образом, предусматривается, что лечение субъекта способами, описанными в данном документе, предотвращает, замедляет или предотвращает прогрессирование, уменьшает тяжесть, приводит к ремиссии (частичной или полной), и/или увеличивает выживаемость при нервно-мышечном заболевании.

В некоторых вариантах реализации, любые способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать детектирование или измерение уровня экспрессии GALGT2 в клетках, трансдуцированных трансгеном GALGT2. Способы измерения экспрессии мРНК или белка хорошо известны специалистам (например, иммунологические анализы, такие как вестерн-блоттинг).

В некоторых вариантах реализации, любые способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать детектирование или измерение количества антигена СТ, экспрессируемого на клетках, трансдуцированных полинуклеотидом GALGT2 (Chicoine et al., supra).

В некоторых вариантах реализации, любые способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать детектирование или измерение количества утрофина, экспрессируемого на клетках, трансдуцированных полинуклеотидом GALGT2 (Chicoine et al., supra).

В некоторых вариантах реализации, любые способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать детектирование или измерение числа волокон, содержащих центральные ядра, которые были трансдуцированы полинуклеотидом GALGT2.

Таким образом, пути введения gAAV, предусматриваемые в описанных выше способах, включают, без ограничений, интраперитонеальный (IP), внутримышечный (IM) и внутрисосудистый (включая, например, внутриартериальную перфузию конечностей (ILP) и внутривенный (IV)) пути.

Доза gAAV, которая должна быть введена в способах, раскрытых в данном документе, будет зависеть в зависимости, например, от конкретных gAAV, способа введения, цели лечения, индивидуума, и типа (типов) клеток-мишеней, и может быть определена способами, стандартными в данной области техники. Может быть введено более одной дозы, например, одна, две, три или больше доз. Титры gAAV в

дозе могут иметь значения в диапазоне от примерно  $1 \times 10^6$ , примерно  $1 \times 10^7$ , примерно  $1 \times 10^8$ , примерно  $1 \times 10^9$ , примерно  $1 \times 10^{10}$ , примерно  $1 \times 10^{11}$ , примерно  $1 \times 10^{12}$ , примерно  $1 \times 10^{13}$ , примерно  $1 \times 10^{14}$ , или до примерно  $1 \times 10^{15}$  или больше резистентных к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (вг) (т.е.  $1 \times 10^7$  вг,  $1 \times 10^8$  вг,  $1 \times 10^9$  вг,  $1 \times 10^{10}$  вг,  $1 \times 10^{11}$  вг,  $1 \times 10^{12}$  вг,  $1 \times 10^{13}$  вг,  $1 \times 10^{14}$  вг,  $1 \times 10^{15}$  вг соответственно). Способы титрования AAV описаны в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039 (1999).

В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения - внутримышечный (IM), доза вводимого гAAV составляет от примерно  $3 \times 10^{11}$  до по меньшей мере примерно  $5 \times 10^{12}$  вг/инъекцию. (Все диапазоны значений в данном документе должны представлять каждое отдельное значение в указанных диапазонах, а также индивидуальные верхнее и нижнее значения каждого диапазона). В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения - внутримышечный (IM), доза вводимого гAAV составляет  $3 \times 10^{11}$  вг/инъекцию. В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения - внутримышечный (IM), доза вводимого гAAV составляет  $1 \times 10^{12}$  вг/инъекцию. В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения - внутримышечный (IM), доза вводимого гAAV составляет  $5 \times 10^{12}$  вг/инъекцию.

В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения - внутриартериальная перфузия конечностей (ILP), доза введенного гAAV составляет от примерно  $6 \times 10^{12}$  до по меньшей мере примерно  $4,8 \times 10^{13}$  вг/кг. (Все диапазоны значений в данном документе должны представлять каждое отдельное значение в указанных диапазонах, а также индивидуальные верхнее и нижнее значения каждого диапазона). В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой внутриартериальную перфузию конечностей (ILP), доза вводимого гAAV составляет  $6 \times 10^{12}$  вг/кг/конечность. В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой внутриартериальную перфузию конечностей (ILP), доза вводимого гAAV составляет  $1,2 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность. В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой внутриартериальную перфузию конечностей (ILP), доза вводимого гAAV составляет  $2,4 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность. В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой внутриартериальную перфузию конечностей (ILP), доза вводимого гAAV составляет  $4,8 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность.

В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой системный внутривенный (IV) путь, доза введенного гAAV составляет от примерно  $2 \times 10^{14}$  до по меньшей мере примерно  $6 \times 10^{15}$  вг/кг. В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой системный внутривенный (IV) путь, доза введенного гAAV составляет от примерно  $4 \times 10^{14}$  до по меньшей мере примерно  $6 \times 10^{15}$  вг/кг. (Все диапазоны значений в данном документе должны представлять каждое отдельное значение в указанных диапазонах, а также индивидуальные верхнее и нижнее значения каждого диапазона). В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой системное внутривенное (IV) введение, доза вводимого гAAV составляет  $4 \times 10^{14}$  вг/кг. В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой системное внутривенное (IV) введение, доза вводимого гAAV составляет  $8 \times 10^{14}$  вг/кг. В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой системное внутривенное (IV) введение, доза вводимого гAAV составляет  $2 \times 10^{15}$  вг/кг. В некоторых вариантах реализации вышеописанных способов, в которых путь введения представляет собой системное внутривенное (IV) введение, доза вводимого гAAV составляет  $6 \times 10^{15}$  вг/кг.

Пациенты-люди являются субъектами, лечение которых предусматривается в данном документе. Пациенты-люди являются субъектами, для которых в данном документе предусматривается лечение путем внутримышечной (IM) доставки. Такие пациенты включают пациентов, которые, например: (i) имеют возраст 9 лет или старше, (ii) имеют мужской пол, (iii) являются амбулаторными или неамбулаторными; (iv) имеют мутацию в гене МДД, подтвержденную с использованием клинически принятой методики определения мутаций; (v) у которых, по результатам магнитно-резонансных исследований короткого разгибателя пальцев стопы (EDB), мышца демонстрирует сохранение мышечной массы, достаточной для проведения трансфекции или переноса гена; (vi) принадлежат к любой этнической группе; (vii) обладают способностью к взаимодействию при проведении всех процедур исследований; (viii), при необходимости, и в случае половозрелости и/или сексуальной активности, готовы использовать надежный способ контрацепции; и/или (ix) получают стабильную дозу кортикостероидной терапии (например, дефлазакорт, преднизон, или их формы генериков) в течение по меньшей мере 12 недель до переноса гена. Пригодные пациенты могут не включать, например, таких: (i) с активными вирусными инфекциями по результатам клинических наблюдений; (ii) имеющих мутацию МДД без слабости или потери функции; (iii) с симптомами кардиомиопатии, такими как одышка при физической нагрузке, отек стопы, одышка в положении лежа или хрипы у основания легких; (iv) имеющих, по результатам эхокардиограммы, фракцию изгнания ниже примерно 40%; (v) с серологическими доказательствами инфекции ВИЛ или гепатита

А, В, или С; (vi) имеющих или диагностированных как имеющие аутоиммунную болезнь (или получающих лечение по этому поводу); (vii) имеющих персистирующую лейкопению или лейкоцитоз (количество лейкоцитов крови  $\leq 3,5$  тыс./мкл или  $\geq 20,0$  тыс./мкл) или абсолютное количество нейтрофилов  $< 1,5$  тыс./мкл; (viii) имеющих сопутствующее заболевание или потребность в хроническом медикаментозном лечении, которое, по мнению врача, создает ненужный риск при переносе гена; (ix) имеющих титр связывающих антител гAAVrh74  $\geq 1:400$ , при определении методом твердофазного иммуноферментного анализа; или (x) с присутствием циркулирующих анти-Sda антител. В типичном примере клинического протокола, пациенты с МДД получают двусторонние инъекции, причем в мышцу короткого разгибателя пальцев стопы (EDB) каждого пациента вводят вектор гAAVrh74.MCK.GALGT2, и в другую мышцу короткого разгибателя пальцев стопы каждого пациента вводят только солевой раствор. Субъекты получают дозу вектора, равную  $1 \times 10^{12}$  вг (общая доза).

Эффективности трансдукции клеток способами, описанными выше и ниже, могут составлять по меньшей мере примерно 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, или 95 процентов. В некоторых вариантах реализации с использованием доставки путем внутривенной (IV) перфузии конечности, эффективность трансдукции возрастает с увеличением объема композиции, в которой производится доставка гAAV, при проведении предварительной промывки (pre-flushing) перед доставкой гAAV, и/или при увеличении времени пребывания гAAV.

В другом аспекте, данный документ предусматривает геномы гAAV. Геномы вводимых гAAV содержат полинуклеотид GALGT2 под управлением контрольных последовательностей транскрипции. Геномы гAAV не содержат ДНК гер и сар AAV. ДНК AAV в геномах гAAV может принадлежать любому серотипу AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая, без ограничений, серотипы AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11 и AAV rh.74. Нуклеотидные последовательности геномов этих серотипов AAV известны специалистам, как было отмечено выше в разделе Известный уровень техники. В некоторых вариантах реализации, ДНК AAV в геномах гAAV принадлежит AAV rh.74. Полинуклеотидная последовательность генома AAV rh.74 представлена в SEQ ID NO: 1, где нуклеотиды 210-2147 представляют собой открытую рамку считывания гена Rep78, 882-208 - открытую рамку считывания Rep52, 2079-2081 - сигнал остановки Rep78, 2145-2147 - сигнал остановки Rep78, 1797-1800 - сайт донора сплайсированного фрагмента, 2094-2097 - сайт акцептора сплайсированного фрагмента, 2121-2124 - сайт акцептора сплайсированного фрагмента, 174-181 - промотор р5 +1 предсказанная (нуклеотидная пара), 145-151 - ТАТА-бокс р5, 758-761 - промотор р19 +1 предсказанная (нуклеотидная пара), 732-738 - ТАТА-бокс р19, 1711-1716 -ТАТА-бокс р40, 2098-4314 - открытую рамку считывания гена кэпа VP1, 2509-2511 - сигнал начала трансляции VP2, 2707-2709 - сигнал начала трансляции VP3, и 4328-4333 - сигнал полиаденилирования (polyA).

В некоторых вариантах реализации, контрольные последовательности транскрипции геномов гAAV представляют собой специфические для мышц контрольные элементы, включая, без ограничений, полученные из генных семейств актина и миозина, такие как из генного семейства myoD (см. Weintraub et al., Science, 251: 761-766 (1991)), миоцитспецифический фактор связывания энхансера MEF-2 (Cserjesi and Olson, Mol. Cell. Biol., 11: 4854-4862 (1991)), контрольные элементы, полученные из гена скелетного актина человека (Muscat et al., Mol. Cell. Biol., 7: 4089-4099 (1987)), гена сердечного актина, промотор мышечной креатинкиназы (MCK) (Johnson et al., Mol. Cell. Biol., 9:3393-3399 (1989)) и энхансер MCK, промотор MHSK7 (модифицированный вариант промотора MCK, содержащий энхансер из тяжелой цепи миозина (Salva et al., Mol. Ther., 15: 320-329 (2007))), промотор десмина, контрольные элементы, полученные из гена тропонина С быстросокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленносокращающихся сердечных волокон и гена тропонина I медленносокращающихся волокон; гипоксия (hipozia)-индуцируемые ядерные факторы (Semenza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5680-5684 (1991)), стероид-индуцируемые элементы и промоторы, включая глюкокортикоидный чувствительный элемент (GRE) (см. Mader and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5603-5607 (1993)), и другие контрольные элементы. В некоторых вариантах реализации, контрольные элементы транскрипции содержат промотор MCK. В некоторых вариантах реализации, контрольные элементы транскрипции содержат промотор MHSK7.

В некоторых вариантах реализации, полинуклеотид GALGT2 в геноме гAAV представляет собой кДНК GALGT2, приведенную в Genbank, № доступа AJ517771 (как нуклеотиды 1002-2522 SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации, полинуклеотид GALGT2 в геноме гAAV представляет собой кДНК GALGT2, приведенную в Genbank, № доступа AJ517771, или является вариантом полинуклеотида, имеющим 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с кДНК GALGT2. В некоторых вариантах реализации, вариант полинуклеотида GALGT2 кодирует такой же полипептид GALGT2, как и полипептид, кодируемый кДНК GALGT2, приведенной в Genbank, № доступа AJ517771. Аминокислотная последовательность полипептида GALGT2, кодируемая кДНК GALGT2, приведенной в Genbank, № доступа AJ517771, представлена в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации, вариант полинуклеотида GALGT2 кодирует вариант полипептида GALGT2 с по меньшей мере одним изменением аминокислотной после-

довательности по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида (SEQ ID NO: 3), кодируемой кДНК GALGT2, приведенной в Genbank, № доступа AJ517771. Изменение аминокислотной последовательности может быть, например, замещением, делецией, или инсерцией одной или несколькими аминокислотами, предпочтительно, консервативными замещениями. Вариант полипептида GALGT2 может иметь любую комбинацию аминокислотных замещений, делеций или инсерций, причем гликозилтрансферазная активность полипептида сохраняется. В одном аспекте, вариант полипептида GALGT2 может иметь ряд аминокислотных изменений таким образом, чтобы его аминокислотная последовательность имела степень идентичности по меньшей мере 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 99,5% с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 3), кодируемой кДНК GALGT2, приведенной в Genbank, № доступа AJ517771.

В некоторых вариантах реализации, геном гAAV представляет собой геном MCK.GALGT2, последовательность геновой кассеты GALGT2 которой представлена в SEQ ID NO: 2 и прокомментирована следующим образом.

Начальный нуклеотид	Конечный нуклеотид	Название	Описание
53	230	5'ИКП	Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа
236	442	энхансер MCK	Энхансер мышинной мышечной креатинкиназы
443	793	коровый промотор MCK	Коровый промотор мышинной мышечной креатинкиназы
794	846	экзон 1 Му MCK	Нативный сайт начала транскрипции экзона 1 гена мышинной MCK (нетранслируемого)
847	943	интрон SV40	Сайты 16S/19S донора и акцептора сплайсированного фрагмента позднего SV40
944	1000	5'-нетранслируемая область	5'-нетранслируемая область плазмиды pCMVb
1002	2522	кДНК GALGT2 человека	кДНК GALGT2 человека
2531	2579	Суп рА	Искусственный сигнал полиаденилирования
2581	2762	3' ИКП	Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа

В еще одном аспекте, предусматривается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации, выделенная нуклеиновая кислота состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

Также предусматривается выделенная нуклеиновая кислота, содержащая, в направлении от 5'-конца к 3'-концу: (i) первую последовательность инвертированного концевой повтора AAV2 (ИКП); (ii) последовательность промотора мышечной креатинкиназы; (iii) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид GALGT2 человека; и (iv) вторую последовательность ИКП AAV2, причем полипептид GALGT2 человека имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 3, на 100% идентичную SEQ ID NO: 3, или кодируемую нуклеотидами 1002-2522 SEQ ID NO: 2.

Предусматриваются рекомбинантный AAV, содержащий вышеупомянутые нуклеиновые кислоты, а также гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

Предусматриваются плазмидные ДНК, содержащие геномы гAAV в соответствии с данным изобретением. Такие плазмидные ДНК содержат геномы гAAV, предусматриваемые в данном документе. Плазмидные ДНК переносятся в клетки, перmissive к инфекции вируса-помощника AAV (например, аденовируса, E1-делегированного аденовируса или герпесвируса) для сборки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Методики получения частиц гAAV, в которых геном AAV для упаковки, гены гер и сар, и функции вируса-помощника вводятся в клетку, являются стандартом в данной области. Производство гAAV требует присутствия в одной клетке (называемой в данном документе пакующей клеткой) следующих компонентов: геном гAAV, гены гер и сар AAV отдельно от генома гAAV (т.е. не входящие в него), и функции вируса-помощника. Гены гер и сар AAV могут принадлежать любому серотипу AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут принадлежать серотипу AAV, отличному от серотипа ИКП генома гAAV, включая, без ограничений, серотипы AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11 и AAV rh74. Производство псевдотипированного гAAV раскрыто, например, в WO 01/83692. Также предусматриваются другие типы вариантов гAAV, например, гAAV с капсидными мутациями. См., например, Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014).

Способ получения пакующей клетки заключается в создании клеточной линии, стабильно экспрессирующей все необходимые компоненты для продуцирования частиц AAV. Например, в геном клетки интегрируют плазмиду (или множество плазмид), содержащую геном gAAV без генов *rep* и *cap* AAV, гены *rep* и *cap* AAV отдельно от генома gAAV, и селективируемый маркер, такой как ген резистентности к неомицину. Геномы AAV вводят в бактериальные плазмиды с помощью таких процедур, как dG-dC достройка концов (GC tailing) (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления эндонуклеазы рестрикции (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73), или прямым лигированием тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Пакующую клеточную линию затем инфицируют вирусом-помощником, таким как аденовирус. Преимущества этого метода заключаются в том, что клетки являются селективируемыми и пригодны для крупномасштабного продуцирования gAAV. Другие примеры пригодных способов используют аденовирус или бакуловирус вместо плазмид для введения геномов gAAV и/или генов *rep* и *cap* в пакующие клетки. Способы получения gAAV с самокомплементарными геномами также известны специалистам.

Обзор общих принципов получения gAAV приведен, например, в 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. Вышеуказанные документы настоящим включены в полном объеме в данное изобретение посредством ссылок, с особым вниманием к разделам этих документов, относящимся к продуцированию gAAV.

В дополнительном аспекте, данное изобретение, таким образом, предусматривает пакующие клетки, продуцирующие инфекционный gAAV. В одном варианте реализации, пакующие клетки могут быть стабильно трансформированными раковыми клетками, такими как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственные линии 293). В другом варианте реализации, пакующие клетки представляют собой клетки, не являющиеся трансформированными раковыми клетками, такие как клетки 293 с малым количеством пассажей (клетки почки эмбриона человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты эмбриона человека), клетки WI-38 (фибробласты эмбриона человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого эмбриона макака-резуса).

gAAV может быть очищен способами, стандартными в данной области техники, такими как хроматография на колонке или очистка в градиенте хлорида цезия. Способы очистки векторов gAAV от вируса-помощника известны специалистам и включают способы, раскрытые, 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 и WO 98/09657.

Таким образом, в другом аспекте, данное изобретение предусматривает gAAV, содержащий полинуклеотид GALGT2. В некоторых вариантах реализации, gAAV содержит капсид AAV rh74 и полинуклеотид GALGT2. В некоторых вариантах реализации, в геноме gAAV отсутствуют ДНК *rep* и *cap* AAV. В некоторых вариантах реализации способов, gAAV представляет собой gAAVrh74.MCK.GALGT2. В некоторых вариантах реализации, gAAV является самокомплементарным геномом.

В другом аспекте, данное изобретение предусматривает композиции, содержащие gAAV, описанный в данном документе. Композиции в соответствии с данным изобретением содержат gAAV в фармацевтически приемлемом носителе. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители. Приемлемые носители и разбавители являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно инертными в используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, или на основе других органических кислот; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахароспирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как твин, плуроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых вариантах реализации, композицию gAAV составляют в трис (Tris), MgCl<sub>2</sub>, NaCl и плуронике F68. В некоторых вариантах реализации, композицию gAAV составляют в 20 mM трис (pH 8,0), 1 mM MgCl<sub>2</sub> и 200 mM NaCl, содержащем 0,001% плуроника F68.

Комбинированное лечение также предусматривается в данном документе. Комбинации, используемые в данном документе, включают одновременное лечение или последовательное лечение. Особенно предусматриваются комбинации способов в соответствии с данным изобретением со стандартным терапевтическим лечением (например, кортикостероидами и/или иммунодепрессивными препаратами), так

же как и комбинации с новыми видами лечения. В различных вариантах реализации, субъекты получают лечение кортикостероидами до, во время или после (или с любыми перестановками комбинаций двух или более из трех возможных вариантов) того, как субъект получает лечение в соответствии со способом, предусматриваемым в данном документе.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения гAAV в требуемом количестве в пригодный растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В общем, дисперсии готовят путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из вышеперечисленных. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и методика лиофилизации, позволяющая получить порошок активного ингредиента плюс любые дополнительные желательные ингредиенты из их раствора, ранее подвергнутого стерилизации фильтрованием.

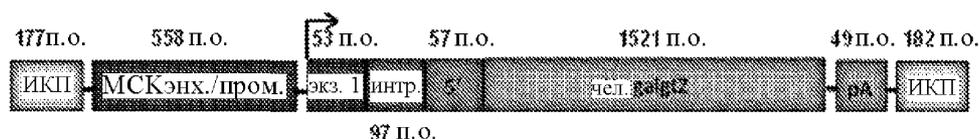
### Примеры

Таким образом, аспекты и варианты реализации изобретения проиллюстрированы в следующих примерах.

#### Пример 1.

Был получен не способный к репликации гAAV, названный гAAVrh74.MCK.GALGT2. Вектор гAAV содержит полную кДНК GALGT2 человека (Genbank, № доступа AJ517771) под управлением промотора мышечной креатинкиназы (МСК; мышцеспецифический промотор). Для проведения специфической для мышц экспрессии генов использовали последовательность промотора/энхансера МСК, состоящую из мышечного корового энхансера МСК (206 п.о.), слитого с 351 п.о. корового промотора МСК (проксимальный). После корового промотора идет 53 п.о. эндогенный мышечный экзон1 МСК (нетранслируемый) для эффективной инициации транскрипции, с последующими поздними 16S/19S сигналами расщепления SV40 (97 п.о.) и маленьким нетранслируемым участком 5'UTR (61 п.о.). Интрон и 5' UTR получены из плазмиды рCMV $\beta$  (Clontech). Кассета GALGT2 содержит консенсусную последовательность Козак (Kozak) непосредственно перед старт-кодоном ATG и маленьким 53 п.о. синтетическим сигналом полиаденилирования (polyA) для терминации мРНК. Кассета GALGT2 человека была ранее описана Martin et al. (2009), supra. Единственными включенными вирусными последовательностями являются инвертированные концевые повторы (ИКП) AAV2, необходимые как для репликации, так и для упаковки вирусной ДНК. Плазида рAAVrh74.MCK.GALGT2 содержит экспрессионную кассету кДНК GALGT2 человека с фланкирующими последовательностями инвертированного концевого повтора (ИКП) AAV2. Генная кассета содержит промотор МСК, химерный интрон с последовательностью Козак для оптимизации генной экспрессии, кодирующие последовательности GALGT2 человека и сигнал полиаденилирования polyA. Последовательность генной кассеты с фланкирующими ИКП AAV представлена в SEQ ID NO: 2.

#### гAAVrh74.MCK.GALGT2



Векторы AAV, содержащие полинуклеотиды GALGT2, были получены модифицированным методом кросс-упаковки путем трехплазмидной трансфекции ДНК (CaPO<sub>4</sub>-преципитация) в клетки HEK293 в условиях отсутствия аденовирусов (Rabinowitz et al., J. Virol., 76:791-801 (2002)). Вектор был приготовлен путем котрансфекции плазмиды, содержащей полинуклеотид GALGT2 с хелперной плазмидой AAV гер2-сар rh.74 и аденовирусной хелперной плазмидой, способом, аналогичным описанному ранее (Wang et al., Gene Ther., 10:1528-1534 (2003)). Плазида гер2-сар rh.74 кодирует ген гер AAV2 и ген сар rh.74 дикого типа, и аденовирусная хелперная плазида (рAdhelper) экспрессирует гены E2A, E4ORF6, и VA I/II РНК аденовируса типа 5, необходимые для требуемого продуцирования гAAV с высокими титрами.

Векторы очищают из осветленных лизатов клеток 293 путем последовательной очистки в градиенте йодиксанола и анионообменной хроматографии на колонке с использованием линейного градиента соли NaCl, как описано ранее (Clark et al., Hum. Gene Ther., 10:1031-1039 (1999)). Титры векторного генома (vg) измеряют с использованием детектирования на основе количественной ПЦР (QPCR) с набором МСК-специфических праймера/зонда и детекторной системы Prism 7500 Taqman (PE Applied Biosystems), как описано ранее (Clark et al., supra). Титры маточных растворов вектора имели значения в диапазоне 1-40×10<sup>12</sup> вг/мл.

Готовят композицию вектора в 20 mM трис (pH 8,0), 1 mM MgCl<sub>2</sub> и 200 mM NaCl, содержащего 0,001% плуроника F68. Вектор поставляют в виде замороженной жидкости, которую оттаивают перед введением в клинических условиях.

#### Пример 2.

Внутримышечная (ИМ) доставка субъектам с МДД.

Пациенты-люди являются субъектами, лечение которых предусматривается в данном документе путем внутримышечной (ИМ) доставки. В типичном примере клинического протокола, пациенты с МДД получают двусторонние инъекции, причем в одну мышцу короткого разгибателя пальцев стопы (EDB) каждого пациента вводят вектор gAAVrh74.MCK.GALGT2, а в другую мышцу EDB каждого пациента вводят только солевой раствор. Субъекты в первой когорте получают низкую дозу вектора, равную  $3 \times 10^{11}$  вг (общая доза). Субъекты во второй когорте получают более высокую дозу вектора, равную  $1 \times 10^{12}$  вг (общая доза).

Соответствующие разбавления вектора готовят непосредственно перед транспортировкой для использования в клинических условиях. Разбавление для инъекции составляет 1:1 нормальным солевым раствором. Вектор хранят на льду (не замороженным) до введения и вводят субъекту в течение 8 часов с момента приготовления. Манипуляции с gAAVrh74.MCK.GALGT2 выполняют в соответствии со стандартами соответствия для векторов уровня 1 биологической безопасности.

См. [www4.od.nih.gov/oba/RAC/guidelines\\_02/APPENDIX\\_G.htm#\\_Toc7246561](http://www4.od.nih.gov/oba/RAC/guidelines_02/APPENDIX_G.htm#_Toc7246561).

Субъекты имели мышечную слабость по результатам клинических исследований. Генетический диагноз МДД устанавливали на основании мутации гена МДД, не противоречащей МДД, с учетом соответствующей истории болезни. В данных исследованиях, все субъекты являются неамбулаторными, потеряв способность передвигаться в диапазоне значений возрастов установления диагноза МДД (т.е. до 12 лет без стероидной терапии, или до 15 лет при продолжительном лечении стероидами). Субъекты получают стабильную дозу кортикостероидной терапии (преднизон или дефлазакорт, или их формы генериков) на протяжении двенадцати недель до проведения лечения.

Вектор или контроль доставляют путем прямой внутримышечной инъекции в мышцу короткого разгибателя пальцев стопы (EDB) одной ступни субъекта, тогда как во вторую ступню вводят только солевой раствор. Для участников в возрасте до 12 лет используют обезболивание при сохранении сознания. Пациенты в возрасте старше 12 лет могут получать обезболивание при сохранении сознания или седативный препарат (такой как лоразепам) по меньшей мере за один час до переноса гена. Кроме того, кожу на месте переноса гена предварительно обрабатывают эвтектической смесью лидокаина/прилокаина, включенной в основу для крема (EMLA-крем) или целлюлозный диск (EMLA-пластырь). Может быть использована сопоставимая анестезия на основе крема, такого как крем ксилокаин. Процедуры проводят в стерильных условиях. Место инъекции очищают тремя последовательными протираниями не содержащими йода хирургическими смоченными спиртом тампонами и обкладывают одноразовыми стерильными салфетками. Для поддержания асептических условий места инъекции используют стандартный клинический доплеровский аппарат со стерильным чехлом вокруг датчика. Для инъекции вектора gAAVrh74.MCK.GALGT2 или плацебо в мышцу короткого разгибателя пальцев стопы (EDB) используют одноразовые иглы MuoJect, позволяющие одновременно проводить запись электромиограммы (EMG) и инъекцию жидкости для повышения точности инъекции в мышцу. Определяют на коже анатомическую срединную точку мышцы и делают в мышцу от 2 до 6 распределенных инъекций вектора. Инъекции делают на глубину 0,5 см от поверхности мышцы. Общая доза вектора составляет  $3 \times 10^{11}$  вг в 1,5 мл в группе низкой дозы и  $1 \times 10^{12}$  вг в 1,5 мл в группе высокой дозы. Проксимальную и дистальную протяженность доставки вектора, при определении ультразвуковым методом, отмечают несмываемым радиографическим маркером как указатель для проведения биопсии мышц после переноса гена.

Субъекты находятся под наблюдением с тщательным мониторингом основных жизненных показателей. Сопутствующая лекарственная терапия после инъекции контролируется и документируется. Субъектов выписывают через два дня после переноса гена (если не наблюдаются побочные явления).

Субъекты возвращаются для последующего наблюдения. Биопсии мышц проводят в день 45 или день 90. Иммуные исследования в дни 45 и 75 после переноса гена и через 9, 12, 18 и 24 месяцев включают тесты на связывающее антитело gAAVrh74 и антитело GALGT2, а также иммуоферментное бляшкообразование ELISpot для детектирования реакции Т-лимфоцитов на капсидные антигены. Проводят осмотр субъектов в конце первого и второго года для проведения физикального обследования, обследований для определения усилий, и иммунных исследований.

Пример 3.

Измерения показателей эффективности.

Биопсии мышц берут из короткого разгибателя пальцев стопы (EDB). Образцы кодируют для наблюдения слепых условий во всех последующих анализах относительно инъекций gAAVrh74.MCK.GALGT2.

Показатели эффективности результатов включают: экспрессию GALGT2, демонстрируемую антителами против СТ-эпитопа; экспрессию белка GALGT2, количественно определяемую методом вестерн-блоттинга и оцениваемую методом денситометрии; эффективность трансдукции трансгена GALGT из мышцы, измеренную методом количественной ПЦР (qPCR), выраженную как число векторных геномов, нормированное по геномному однокопийному контролю; сравнение числа волокон, содержащих центральные ядра, между мышцами, по двустороннему критерию Стьюдента; и анализы будут также включать: экспрессию дистрофина (с антителами к N-концевому, C-концевому, и стержневому доменам), экс-

прессию утروفина, и лейкоцитарные маркеры, включая CD45, CD3, CD4, CD8 и MAC 387. Мышцу исследуют на гистологический вид. Антитела к гAAVrh74, вместе с результатами иммуноферментной модификации анализа бляшкообразования ELISpots мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в ответ на капсид гAAVrh74 и белок GALGT оценивают в разные моменты времени на протяжении исследований в течение до двух лет. Также проводят анализ генной экспрессии в мышце и воспаления без нарушения слепых условий.

Экспрессию трансгена сравнивают вслепую между обоими мышцами короткого разгибателя пальцев стопы (EDB) одного субъекта, и между биопсиями данного субъекта в день 45 и день 90. Используют набор векторспецифических зондов-праймеров для амплификации уникальной 5' нетранслируемой лидерной последовательности трансгена, которой экспрессируемый трансгеном белок GALGT2 будет отличаться от эндогенного GALGT2. Количественное определение белка проводится с использованием анализов методами прямой иммунофлуоресценции (IF) и вестерн-блоттинга (WB) мышечной ткани. CD4+ и CD8+ мононуклеарные клетки определяют количественно иммуноокрашиванием и выражают как число клеток/мм<sup>2</sup> площади. Экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости ГКГС I и ГКГС II оценивают по срезам мышц. Также проводят морфометрию мышц, включая гистограммы размеров волокон и количественное определение центральной нуклеации. Анализ также включает анализ вирусной ДНК методом ПЦР.

Иммунные реакции оценивают методом иммуноферментной модификации анализа бляшкообразования ELISpots интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ) в ответ на GALGT2 и капсид AAV. Увеличение IFN- $\gamma$ >2SD (среднеквадратичное отклонение) в ответ на вирус или трансген считается значимым. Дополнительной мерой иммунной реакции является анализ связывающих антител AAV.

К предусматриваемым относятся также измерения улучшений одного или нескольких параметров из удельной абсолютной мышечной силы; уменьшения усилия при эксцентрических сокращениях мышц; уровня креатинкиназы (КК) сыворотки; уровня сердечного тропонина сыворотки; уровня матриксной металлопротеиназы MMP9 сыворотки; силы захватывания; момента вращения конечностей; подвижности или гибкости конечностей; способности передвигаться; теста с 6-минутной ходьбой; силы сгибающей или разгибающей мышцы колена; максимального произвольного изометрического мышечного сокращения; амбулаторного обследования "Северная звезда"; мышечной массы, сокращения жировой ткани или отека по количественным показателям T2-взвешенной МРТ конечности; контрактуры мышц; углов сочленения суставов; сердечной функции (частота сердечных сокращений, минутный объем сердца, фракция укорочения в процентах, систолический объем крови); дыхания (включая частоту дыхания, насыщение крови кислородом, потребность в дополнительном кислороде); некроза мышц; регенерации мышц; мышечного истощения; мышечного воспаления; кальцификации мышц; центральной нуклеации мышц; размера мышц или размера мышечных волокон; продолжительности жизни; и экспрессии дистрофина или суррогатного белка ламинина альфа 2 (утрофин, плектин 1, ламинин альфа 5, агрин). См., например, Forbes et al., *Radiology*, 269(1): 198-207 (2013); Govoni et al., *Cell Mol. Life Sci.*, 70(23): 4585-4602 (2013); и Chandrasekharan and Martin, *Methods Enzymol.*, 479: 291-322 (2010).

Для каждого из этих показателей будет проводиться статистический анализ на основании различий между результатами анализов до и после переноса гена (клинических или для биопсии мышц) с использованием двустороннего критерия Стьюдента, с величиной значимости  $p < 0,05$ .

#### Пример 4.

Сосудистая доставка путем изолированной перфузии конечности.

Сосудистый путь доставки, называемый изолированной перфузией конечности (ILP) также предусматривается для лечения пациентов-людей. Множество ножных мышц может быть мишенями изолированной перфузии конечности (ILP) путем доставки через бедренную артерию. Этот способ позволяет изолировать конечность от системного кровообращения, увеличивая эффективность перфузии и предотвращая попадание вируса в системное кровообращение (Rodino-Klapac et al., *Mol. Ther.*, 18: 109-117 (2010)). Типичный пример клинического протокола приведен ниже.

Готовят гAAVrh74.MCK.GALGT2, как описано в примерах 1 и 2.

Субъект получает стабильную дозу кортикостероидной терапии (преднизон или дефлазакорт, или их формы генериков) на протяжении двенадцати недель до проведения лечения. Терапию преднизоном также продолжают после переноса гена. Подвергнутого воздействию седативного средства и анестезии субъекта закрепляют на функциональной кровати. Проксимальный и дистальный турникеты свободно размещают выше колена и ниже икроножной мышцы макака. Делают небольшой надрез в бедренном треугольнике и определяют и иссекают бедренную артерию и охватывают проксимальной и дистальной лигатурами для контроля кровотечения и облегчения введения катетера. В бедренную артерию вводят канюлю с помощью стилета-катетера 3.0 Fg по модифицированному методу Сельдингера (Seldinger) путем введения предварительно промытой проводниковой трубки сосудистого доступа по проводнику, ранее введенному в артерию. Проводниковую трубку продвигают только на несколько сантиметров и фиксируют плетеными шелковыми шовными нитями 3.0.

После размещения проводниковых трубок в бедренных артериях и венах вводят 100-200 ед./кг нефракционированного гепарина и оставляют в циркуляции на 3-5 мин. Затем коронарный проволочный

проводник катетера Choice PT вводят сначала в правые бедренные вену и артерию, а после этого в левые бедренные вену и артерию. Катетер Tyshak Mini Balloon диаметром 4 мм вводят по проводниковой трубке 3.3-French через правую бедренную артерию в рабочее положение на стыке бедренной и подвздошной артерий. Катетер Tyshak Mini Balloon диаметром 8 мм и длиной 2 см вводят по проводниковой трубке 4-French в требуемое положение на стыке правых бедренной и подвздошной вен. Делают ручную небольшие инъекции разбавленного контрастного вещества для подтверждения надлежащей блокады как левой бедренной артерии, так и правой бедренной вены. При необходимости, проводниковые трубки и баллоны могут быть заменены на большие размеры. Например, проводниковая трубка 4-French в правой бедренной вене может быть заменена на проводниковую трубку 6-French и катетер Tyshak II Balloon 12 мм × 2 см в длину может быть введен по проволочному проводнику Choice PT в требуемое положение. Делают ручную небольшие инъекции через боковые отводы проводниковой трубки для подтверждения положения и полной окклюзии бедренной вены.

После надувания баллонов как в правой бедренной артерии, так и в бедренной вене, проводят инфузию 2 мл/кг лактатного гепаринизированного раствора Рингера для предварительной промывки, с изоляцией правой ноги. Через 1 минуту, промывку лактатом Рингера 2 мл/кг завершают. Затем проводят инфузию вектора gAAVrh74.MCK.GALGT2 в дозе от  $2 \times 10^{12}$  вг/кг/конечность до  $4,8 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность в объеме 8 мл/кг лактата Рингера (LR) в течение 1 1/2 мин (поскольку проводится двусторонняя перфузия конечностей, общая доза для пациента составляет от  $4 \times 10^{12}$  вг/кг до  $9,6 \times 10^{13}$  вг/кг). После доставки gAAVrh74.MCK.GALGT2, время пребывания составляет 10 мин, и затем проводниковую трубку правой бедренной артерии используют для инфузии 2 мл/кг гепаринизированного лактата Рингера в течение 1 мин. После этого баллоны сдувают и катетеры и проволочные проводники извлекают.

Затем проводят такую же процедуру для левой ноги. Левую бедренную артерию фиксируют проводниковыми трубками 3.3-French. Снова, используя катетер Tyshak Mini Balloon диаметром 4 мм в левой бедренной артерии, введенный по коронарному проволочному проводнику Choice PT, а также катетер Tyshak II Balloon 12 мм × 2 см в длину, введенный по проводниковым трубкам 5-French в левую бедренную вену, и надувая их до давления 3 атмосферы, обеспечивают требуемую окклюзию. Повторяют протокол инфузии с инфузией 2 мл/кг гепаринизированного лактата Рингера в течение 1 мин, и инфузией дозы gAAVrh74.MCK.GALGT2 от  $2 \times 10^{12}$  вг/кг/конечность до  $4,8 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность в течение 1 мин и 15 с, при времени пребывания 10 мин. Наконец, проводят инфузию 2 мл/кг гепаринизированного лактата Рингера через проводниковую трубку левой бедренной артерии, и затем проводниковые трубки извлекают из всех 4-х участков доступа с гемостазом давлением и пластырем HemCon.

Варианты этого протокола могут быть использованы для доставки gAAVrh74.MCK.GALGT2 через другие артерии в альтернативные группы мышц, при необходимости. Например, предусматриваются доставка по дифрагмальной, межреберной и/или подреберной артериям для доступа к диафрагмальным мышцам, или доставка по коронарным артериям для снабжения сердца. Для каждой процедуры будут использоваться аналогичные дозы, и множество процедур может быть проведено для одного пациента или даже при одном поступлении пациента.

После завершения дозирования турникеты и катетер удаляют и прикладывают к ране прямое давление на 10 мин для остановки кровотечения. Рану зашивают непрерывным подкожным швом 4.0 Vicryl. Накладывают давящую повязку на рану и закрепляют до момента пробуждения субъекта после анестезии.

После выполнения протокола доставки вектора внутриартериальной перфузией конечностей (ILP), проводят субъект последующее наблюдение и измерения/анализы показателей эффективности результатов аналогично описанному выше для субъектов с внутримышечным (IM) введением препарата.

Пример 5.

Системная сосудистая доставка.

Другим предусматриваемым путем доставки вектора gAAVrh74.MCK.GALGT2 к мышце является системная сосудистая доставка. Типичные исследования с эскалацией дозы для изучения эффективности могут быть проведены следующим образом.

Определение диапазона доз.

Внутривенная (IV) инъекция (в хвостовую вену)  $1,4 \times 10^{15}$  вг/кг gAAVrh74.MCK.GALGT2 в возрасте 1 дня вызывает трансдукцию в более 90% всех скелетных мышц конечностей у мышей дикого типа, включая переднюю большеберцовую, икроножную, четырехглавую и трехглавую, и она же приводит к трансдукции более 50% всех кардиомиоцитов в сердце мышей дикого типа и более 70% кардиомиоцитов в сердце модельных мышей mdx. Примечательно, что анализ общей сердечной функции у мышей mdx через 3 месяца после лечения, по сравнению с контрольными mdx-животными с имитацией лечения, продемонстрировали почти удвоение минутного объема сердца в результате лечения gAAVrh74.MCK.GALGT2 такой дозой вектора, со стимулированием добутамином (бета-агонист, стимулирующий частоту сердечных сокращений) или без него. Таким образом, наблюдается увеличение на 80% кровотока из дистрофин-дефицитного сердца после лечения gAAVrh74.MCK.GALGT2, когда вектор вводили до начала связанной с заболеванием сердечной патологии. Предусматривается, что  $5 \times 10^{15}$  вг/кг будет максимальной терапевтической дозой для трансдукции всех клеток сердечной и скелетных мышц в

организме при использовании внутривенной инъекции. Таким образом, предусматривается, что диапазон доз от примерно  $5 \times 10^{13}$  вг/кг до примерно  $5 \times 10^{15}$  вг/кг будет охватывать минимально эффективную дозу и оптимально эффективную дозу при лечении гAAVrh74.MCK.GALGT2 пациента в целом в клинических исследованиях с внутривенным (IV) введением.

Протокол.

гAAVrh74.MCK.GALGT2 готовят, как описано в примерах 1 и 2.

Субъект начинает с профилактического преднизолона (глюкокортикоид) энтерально (приблизительно 1 мг/кг/день) за день до введения гAAVrh74.MCK.GALGT2. Лечение преднизолоном также продолжают после переноса гена.

В день переноса гена (день 0) перед инфузией гAAVrh74.MCK.GALGT2 проводят физикальное обследование со сбором основных жизненных показателей.

Если субъект окажется неадекватно гидратированным по мнению главного исследователя (PI), болюс(ы) 10-20 мл/кг нормального солевого раствора могут быть введены в период между госпитализацией и переносом гена. Субъекты сохраняют свою обычную диету до момента времени восемь часов до переноса гена, после чего они не принимают твердой пищи; прием прозрачных жидкостей разрешен до момента времени два часа до переноса гена, после чего они полностью переходят на режим "ничего через рот" (NPO). Они возобновляют обычный пероральный (PO) прием после возвращения к показателям базовой линии до приема седативных средств. Перенос гена проводят в стерильных условиях, при седативном эффекте от слабого до умеренного, под наблюдением квалифицированного анестезиолога. Используемые седативные средства могут меняться, но субъект может быть подвергнут воздействию седативным средством путем ингаляции оксида азота (nitrous) перед индукцией пропофолом внутривенно (IV), и может поддерживаться ингаляцией севофлурана или пропофолом под капельницей. У субъектов, которые, по мнению главного исследователя (PI) (после консультации с анестезиологом), определены как не нуждающиеся в использовании седативных средств для безопасной доставки вектора, применение седативных средств может быть отложено.

Все субъекты, участвующие в испытаниях, получают внутривенную инъекцию гAAVrh74.MCK.GALGT2 через периферическую вену конечности. Предусматриваемый диапазон доз составляет от  $5 \times 10^{13}$  вг/кг до  $5 \times 10^{15}$  вг/кг.

В качестве примера, каждую дозу вектора вводят неразведенной, разделенной на порции по 50 мл или меньше, для наполнения полипропиленовых шприцов Becton Dickinson объемом 60 мл, изготовленных фирмой NCH Investigational Drug Pharmacy. Солевой раствор вектора имеет приблизительно 400 мосмоль/л. Инфузию проводят с использованием шприцевого инфузионного насоса Smiths Medical Medfusion 4000 с PharmGuard Infusion Management Software Suite, с введением через инфузионную трубку Smiths Medical MX563. Скорость инфузии не должна превышать 2 мл/кг/мин для любого субъекта. Инфузия проводится на протяжении приблизительно 10-20 минут. Вектор в инфузионной трубке промывают с использованием нормального солевого раствора в конце инфузии. Предусматривается, что дозы вектора могут быть разделенными и вводиться разными способами, в зависимости от необходимости.

Внимательно наблюдают за побочными явлениями у субъектов во время инфузии, включая непрерывность пульса, частоту дыхания, и пульсовую оксиметрию; и периодически контролируют кровяное давление. Частоту сердечных сокращений, частоту дыхания, пульсовую оксиметрию, температуру и кровяное давление измеряют до и немедленно после инфузии, и через каждые пять минут во время инфузии, и повторно через 15 мин после инфузии.

Субъекты остаются в лежачем положении в палате интенсивной терапии после переноса гена и остаются в больнице в течение 48 ч после переноса гена. Основные жизненные показатели определяют каждый час в течение 4 ч после инъекции и затем через каждые 4 ч до выписки. Перевод из отделения интенсивной терапии может проводиться после первых 24 ч наблюдения после инфузии, если главный исследователь PI не выражает озабоченности.

После выполнения протокола доставки вектора проводятся наблюдение за субъектом и анализы показателей эффективности результатов, аналогичные описанным выше для субъектов с внутримышечным (IM) введением.

Хотя настоящее изобретение было описано с точки зрения конкретных вариантов реализации, следует понимать, что варианты и модификации могут быть представлены квалифицированными специалистами в данной области техники. Соответственно, данное изобретение ограничивается только пределами, установленными в формуле изобретения.

Все документы, упоминаемые в данном изобретении, настоящим включены посредством ссылок в полном объеме, с особым вниманием к контексту, в котором они упоминаются. Также, данное изобретение претендует на преимущества даты приоритета временных заявок США №№ 62/220107, поданной 17 сентября 2015 г.; 62/221068, поданной 20 сентября 2015 г. и 62/301260, поданной в феврале 2016 г.; которые все включены в данный документ посредством ссылок в полном объеме.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, содержащая в направлении от 5'-конца к 3'-концу:
  - (i) первую последовательность инвертированного концевого повтора AAV2 (ИКП);
  - (ii) энхансер MCK, представленный нуклеотидами 236-442 SEQ ID NO: 2;
  - (iii) последовательность корового промотора мышечной креатинкиназы, представленную нуклеотидами 443-793 SEQ ID NO: 2;
  - (iv) нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид GALGT2 человека и содержащую нуклеотиды 1002-2522 SEQ ID NO: 2; и
  - (v) вторую последовательность ИКП AAV2.
2. Нуклеиновая кислота по п.1, дополнительно содержащая 3' к указанному коровому промотору последовательность экзона 1 гена мышечной MCK, представленную нуклеотидами 794-846 SEQ ID NO: 2.
3. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1, 2, дополнительно содержащая 3' к указанному коровому промотору последовательность интрона SV40, представленную нуклеотидами 847-943 SEQ ID NO: 2.
4. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-3, дополнительно содержащая 3' к указанному коровому промотору 5'-нетранслируемую область, представленную нуклеотидами 944-1000 SEQ ID NO: 2.
5. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-4, дополнительно содержащая 3' к указанной нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид GALGT2 человека, последовательность Syn pA, представленную нуклеотидами 2531-2579 SEQ ID NO: 2.
6. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-5, причем указанная первая ИКП представлена нуклеотидами 53-230 SEQ ID NO: 2, и/или причем указанная вторая ИКП представлена нуклеотидами 2581-2762 SEQ ID NO: 2.
7. Нуклеиновая кислота по п.6, причем указанная первая ИКП представлена нуклеотидами 53-230 SEQ ID NO: 2; и причем указанная вторая ИКП представлена нуклеотидами 2581-2762 SEQ ID NO: 2.
8. Нуклеиновая кислота, содержащая геном гAAV.rh74.MCK.GALGT2, представленный в SEQ ID NO: 2.
9. Частица рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-8, причем гAAV является инфекционным.
10. гAAV по п.9, причем гAAV принадлежит серотипу AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11 или AAVrh.74.
11. гAAV по п.9 или 10, причем ДНК AAV в геноме гAAV принадлежит AAV rh.74.
12. гAAV по любому из пп.9-11, причем полинуклеотидная последовательность генома AAV rh.74 представлена в SEQ ID NO: 1.
13. Композиция для лечения или предотвращения мышечной дистрофии, содержащая гAAV по любому из пп.9-12 и фармацевтически приемлемый носитель.
14. Способ лечения или предотвращения мышечной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий стадию введения композиции по п.13.
15. Способ по п.14, причем путь введения является внутримышечным путем.
16. Способ по п.14 или 15, причем композиция содержит дозу гAAV от примерно  $3 \times 10^{11}$  до по меньшей мере примерно  $5 \times 10^{12}$  вг/инъекцию.
17. Способ по п.14, причем путь введения является изолированной инфузией или перфузией конечностей (ILP).
18. Способ по п.14 или 17, причем композиция содержит дозу гAAV от примерно  $2 \times 10^{12}$  до по меньшей мере примерно  $4,8 \times 10^{13}$  вг/кг/конечность или общую дозу от примерно  $4 \times 10^{12}$  до по меньшей мере примерно  $9,6 \times 10^{13}$ .
19. Способ по п.14, причем путь введения является внутривенным (IV) введением.
20. Способ по п.14 или 15, причем композиция содержит дозу гAAV от примерно  $2 \times 10^{14}$  до по меньшей мере примерно  $6 \times 10^{15}$  вг/кг.
21. Способ по п.14, причем композиция содержит дозу гAAV от примерно  $5 \times 10^{13}$  вг/кг до примерно  $5 \times 10^{15}$  вг/кг.

