

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045376**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.21

(21) Номер заявки
201992201

(22) Дата подачи заявки
2018.03.16

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(54) ДОСТАВКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЛЯ МЫШЦ МИКРОДИСТРОФИНА ВЕКТОРАМИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

(31) 62/473,148

(32) 2017.03.17

(33) US

(43) 2020.03.19

(86) PCT/US2018/022881

(87) WO 2018/170408 2018.09.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИСЕРЧ ИНСТИТЬЮТ ЭТ
НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕНС
ХОСПИТАЛ (US)**

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

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

(56) WO-A1-2015197232
WO-A1-2016177911

JAYNES, J.B. et al.: Transcriptional Regulation of the Muscle Creatine Kinase Gene and Regulated Expression in Transfected Mouse Myoblasts, *Molecular and Cell Biology*, August, 1986, vol. 6, № 8, p. 2855-2864, abstract, Genbank supplement, p. 1-3
US-A1-20080044393

LEDERFEIN, D. et al.: A 71-Kilodalton Protein is a Major Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene in Brain and Other Nonmuscle Tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 15 June, 1992, vol. 89, № 12, p. 5346-5350, abstract, Genbank Supplement, p. 1-9

(57) В изобретении предложены генотерапевтические векторы, такие как векторы аденоассоциированного вируса (AAV), экспрессирующие миниатюризированный ген микродистрофина человека, и способ применения этих векторов для экспрессии микродистрофина в скелетной мышце, включая диафрагму и сердечную мышцу, и для защиты мышечных волокон от повреждений, увеличения мышечной силы и уменьшения и/или профилактики фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией.

B1

045376

**045376
B1**

Данное изобретение было реализовано при государственной поддержке в рамках гранта № NS 055958, выделенного Национальным институтом здравоохранения/Национальным институтом неврологических расстройств и инсульта. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной патентной заявки США № 62/473148, поданной 17 марта 2017 г., которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Включение по ссылке материала, представленного в электронном виде

Данная заявка содержит в качестве отдельной части данного изобретения Перечень последовательностей в машиночитаемой форме, который включен посредством ссылки в полном объеме и идентифицируется следующим образом. Название файла: 51475_Seqlisting.txt, размер: 29519 байт, создан: 13 марта 2018 г.

Область техники, к которой относится изобретение

В изобретении предложены векторы генной терапии, такие как векторы аденоассоциированного вируса (AAV), экспрессирующие миниатюризированный ген микродистрофина человека, и способ использования этих векторов для экспрессии микродистрофина в скелетных мышцах, включая диафрагму и сердечную мышцу, и для защиты мышечных волокон от повреждений, увеличения мышечной силы и уменьшения и/или профилактики фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией.

Уровень техники

Важность мышечной массы и силы для повседневной деятельности, такой как двигательная активность и дыхание, а также для метаболизма всего тела является неоспоримой. Дефицит мышечной функции вызывает мышечные дистрофии (MD), которые характеризуются мышечной слабостью и истощением и оказывают серьезное влияние на качество жизни. Наиболее хорошо охарактеризованные MD являются результатом мутаций в генах, кодирующих членов дистрофин-ассоциированного белкового комплекса (DAPC). Эти MD возникают в результате хрупкости мембраны, связанной с потерей связывания сарколеммального цитоскелета с DAPC. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) является одним из самых разрушительных мышечных заболеваний, поражающих 1 из 5000 новорожденных мужского пола.

DMD вызывается мутациями в гене DMD, приводящими к редукции мРНК и отсутствию дистрофина, сарколеммального белка 427 кДа, связанного с дистрофин-ассоциированным белковым комплексом (DAPC) (Hoffman et al., *Cell*, 51(6):919-28, 1987). DAPC состоит из множества белков мышечной сарколеммы, которые образуют структурную связь между внеклеточным матриксом (ЕСМ) и цитоскелетом через дистрофин, актин-связывающий белок, и альфа-дистрогликан, ламинин-связывающий белок. Эти структурные связи действуют для стабилизации мембраны мышечных клеток во время сокращения и защиты от повреждения, вызванного сокращением. При потере дистрофина хрупкость мембран приводит к сарколеммальным разрывам и притоку кальция, вызывая активацию кальциевых протеаз и некроз сегментарного волокна (Straub et al., *Curr. Opin. Neurol.*, 10(2):168-75, 1997). Этот неконтролируемый цикл мышечной дегенерации и регенерации в конечном итоге 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 DMD будет проявлять неконтролируемые циклы повреждения и восстановления ткани, в конечном счете замены потерянных мышечных волокон фиброзной рубцовой тканью путем пролиферации соединительной ткани. Фиброз характеризуется чрезмерным отложением белков матрикса ЕСМ, включая коллаген и эластин. Белки ЕСМ в основном продуцируются цитокинами, такими как TGF β , который выделяется активированными фибробластами, реагирующими на стресс и воспаление. Хотя основной патологической особенностью DMD является дегенерация миофибрилл и некроз, фиброз как патологическое последствие имеет одинаковые последствия. Чрезмерное производство фиброзной ткани ограничивает регенерацию мышц и способствует прогрессирующей мышечной слабости у пациентов с DMD. В одном исследовании наличие фиброза на начальных биопсиях мышц с DMD сильно коррелировало с плохим прогнозом двигательной активности при 10-летнем периоде наблюдения (Desguerre et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2009, 68(7):p. 762-7). Эти результаты указывают на то, что фиброз является основной причиной мышечной дисфункции DMD, и подчеркивают необходимость раннего вмешательства до возникновения явного фиброза.

Аденоассоциированный вирус (AAV) является дефективным по репликации парвовирусом, одноцепочечный ДНК-геном которого имеет длину около 4,7 т.п.н., включая 145-нуклеотидный инвертированный концевой повтор (ITR). Существует несколько серотипов AAV. Известны нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV. Например, нуклеотидная последовательность генома серотипа 2 AAV (AAV2) представлена в Srivastava et al., *J. Virol.*, 45:555-564 (1983) as corrected by Ruffing et al., *J. Gen. Virol.*, 75:3385-3392 (1994). Как и другие примеры, полный геном AAV-1 представлен в GenBank под номером доступа NC_002077, полный геном AAV-3 представлен в GenBank под номером доступа NC_1829, геном AAV-4 представлен в GenBank под номером доступа NC_001829, геном AAV-5 представлен в GenBank под номером доступа AF085716, геном AAV-6 представлен в GenBank под номером доступа NC_001862, по меньшей мере фрагменты геномов AAV-7 и AAV-8 представлены в GenBank под номерами доступа AX753246 и AX753249 соответственно (см. также патенты США № 7282199 и

№ 7790449, относящиеся к AAV-8), геном AAV-9 представлен в статье Gao et al., *J. Virol.*, 78:6381-6388 (2004), геном AAV-10 представлен в *Mol. Ther.*, 13(1):67-76 (2006) и геном AAV-11 представлен в *Virology*, 330(2):375-383 (2004). Клонирование серотипа AAVrh.74 описано в Rodino-Klapac et al., *Journal of translational medicine*, 5, 45 (2007). Цис-действующие последовательности, управляющие репликацией вирусной ДНК (гер), капсидированием/упаковкой и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR. Три промотора AAV (под названиями p5, p19 и p40 по их относительным положениям на карте) контролируют экспрессию двух открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены гер и сар. Два промотора гер (p5 и p19) в комбинации с дифференциальным сплайсингом одиночного интрона AAV (например, по нуклеотидам AAV2 2107 и 2227) приводят к получению четырех белков гер (гер 78, гер 68, гер 52 и гер 40) из гена гер. Белки гер обладают несколькими ферментативными свойствами, которые в конечном счете отвечают за репликацию вирусного генома. Ген сар экспрессируется из промотора p40 и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативные сайты сплайсинга и неконсенсусные сайты инициации транскрипции отвечают за продукцию трех родственных белков капсида. Одиночный консенсусный сайт полиаденилирования находится в положении 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158:97-129 (1992).

AAV обладает уникальными особенностями, которые делают его привлекательным вектором доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование клеток AAV в культуре является нецитопатическим, а природная инфекция у людей и других животных является латентной и бессимптомной. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что обеспечивает адресное воздействие на различные типы тканей *in vivo*. Кроме того, AAV трансформирует медленно делящиеся и неделящиеся клетки и может присутствовать практически в течение всей жизни этих клеток в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Геном провируса AAV остается инфекционным при клонировании ДНК в плазмиды, что делает возможным конструирование рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV, капсидированием и интеграцией генома, содержатся в ITR генома AAV, приблизительно 4,3 т.п.н. внутренних фрагментов генома (кодирующих белки репликации и структурные белки капсида, гер-сар) можно частично или полностью заменить чужеродной ДНК, например генной кассетой, содержащей промотор, нужную ДНК и сигнал полиаденилирования. Гер и сар белки могут быть предоставлены *in trans*. Еще одна важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно устойчивым вирусом. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56 до 65°C в течение нескольких часов), что снижает критичность хранения AAV при низких температурах. AAV можно даже лиофилизировать. Наконец, AAV-инфицированные клетки не являются устойчивыми к суперинфекции.

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

Функциональное улучшение у пациентов, страдающих DMD и другими мышечными дистрофиями, требует восстановления генов на ранней стадии заболевания. Существует необходимость в лечении, которое увеличивает мышечную силу и защищает от повреждений мышц у пациентов, страдающих DMD.

Краткое изложение сущности изобретения

Данное изобретение направлено на векторы генной терапии, например AAV, экспрессирующие ген микродистрофина в скелетных мышцах, включая диафрагму и сердечную мышцу, для защиты мышечных волокон от повреждения, увеличения мышечной силы и уменьшения и/или профилактики фиброза.

В изобретении предложены способы лечения и подходы для увеличения мышечной силы и/или увеличения мышечной массы с использованием векторов генной терапии для введения микродистрофина для устранения дефекта гена, наблюдаемого при DMD. Как показано в примере 2, обработка генной терапией с микродистрофином приводила к большей мышечной силе *in vivo*. Кроме того, доставка генной терапии с микродистрофином внутримышечно и системно показало введение дистрофина в мышцы на мышинной модели *in vivo*.

В одном варианте осуществления в изобретении предложен вектор gAAV, содержащий нуклеотидную последовательность специфического для мышц регуляторного элемента и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок микродистрофина. Например, нуклеотидная последовательность кодирует функциональный белок микродистрофин, где нуклеотид имеет, например, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично по меньшей мере 90, 91, 92, 93 или 94% и еще более типично по меньшей мере 95, 96, 97,

98, 99 или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, причем белок сохраняет активность микродистрофина. Белок микродистрофин обеспечивает стабильность мышечной мембраны во время сокращения мышц, например микродистрофин действует как амортизатор во время сокращения мышц.

В изобретении также предложены векторы gAAV, в которых нуклеотидная последовательность кодирует функциональный белок микродистрофина, содержащий нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в строгих условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или ее комплиментами, и кодирует функциональный белок микродистрофин.

В одном варианте осуществления вектор gAAV представляет собой нереплицирующийся рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV), называемый gAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin. Этот векторный геном содержит минимальные элементы, необходимые для экспрессии генов, включая инвертированные концевые повторы AAV2 (ITR), микродистрофин, интрон SV40 (SD SA) и сигнал синтетического полиаденилирования (Poly A), все под контролем промотора/энхансера MHCK7. Схема векторного генома и экспрессионной кассеты показана на фиг. 1. Серотип AAVrh74 может быть использован для достижения эффективного переноса генов в скелетной и сердечной мышцах после внутривенного введения.

Термин "строгий" применяется для обозначения условий, которые обычно подразумеваются в данной области техники как строгие. Строгость гибридизации в основном определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих агентов, например формамида. Примеры строгих 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). Также могут быть использованы более жесткие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокое содержание формамида или другого денатурирующего агента), однако это будет влиять на скорость гибридизации. В случаях, когда речь идет о гибридизации дезоксирибонуклеотидов, дополнительные иллюстративные жесткие условия гибридизации включают промывание в 6x SSC 0,05% пиродифосфата натрия при 37°C (для олигонуклеотидов с 14 основаниями), 48°C (для олигонуклеотидов с 17 основаниями), 55°C (для олигонуклеотидов с 20 основаниями) и 60°C (для олигонуклеотидов с 23 основаниями).

Другие агенты могут быть включены в гибридизационные и промывочные буферы с целью снижения неспецифической и/или фоновой гибридизации. Примерами являются 0,1% бычий сывороточный альбумин, 0,1% поливинилпирролидон, 0,1% пиродифосфат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, NaDodSO₄ (SDS), фикоилл, раствор Денхардта, обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося (или другая некомплементарная ДНК) и сульфат декстрана, хотя другие подходящие агенты также могут быть использованы. Концентрация и типы этих добавок могут быть изменены без существенного влияния на жесткость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8-7,4, однако в 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). Специалист в данной области может отрегулировать условия гибридизации, чтобы приспособить эти переменные и дать возможность ДНК с различным родством последовательностей образовывать гибриды.

Термин "мышечный специфический регулирующий элемент" относится к нуклеотидной последовательности, которая регулирует экспрессию кодирующей последовательности, которая специфична для экспрессии в мышечной ткани. Эти регулирующие элементы включают энхансеры и промоторы. В данном изобретении предложены конструкции, содержащие промотор мышечных специфических регулирующих элементов MCKH7, промотор MCK и энхансер MCK.

Термин "функционально связанный" относится к позиционированию нуклеотидной последовательности регуляторного элемента, например промоторной нуклеотидной последовательности, для обеспечения экспрессии указанной нуклеотидной последовательности указанным регуляторным элементом.

В одном аспекте в изобретении предложен вектор gAAV, в котором мышечным специфическим регулирующим элементом является элемент гена скелетного актина человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфический энхансер-связывающий фактор (MEF), мышечная креатинкиназа (MCK), усеченная MCK (tMCK), тяжелая цепь миозина (MHC), гибрид энхансера тяжелой цепи α -миозина/энхансер-промотор-MCK (MHCK7), C5-12, элемент энхансера креатинкиназы мышцы, элемент гена быстро сокращающегося тропонина C скелетных мышц, элемент гена медленно сокращающегося тропонина C сердечных мышц, элемент гена медленно сокращающегося тропонина I, индуцируемые при гипоксии ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

Например, мышечный специфический регулирующий элемент представляет собой нуклеотидную последовательность промотора MHCK7 SEQ ID NO: 2 или мышечный специфический регулирующий элемент представляет собой нуклеотидную последовательность MCK SEQ ID NO: 4. Кроме того, в любом из векторов gAAV по данному изобретению нуклеотидная последовательность специфического для мышц регуляторного элемента, например нуклеотидная последовательность MHCK7 или MCK, функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок микродистрофин. Например, нуклеотидная последовательность промотора MHCK7 (SEQ ID NO: 2) функционально связана с ко-

дирующей последовательностью микродистрофина человека (SEQ ID NO: 1), как представлено в конструкции, представленной на фиг. 1 или 10 (SEQ ID NO: 3). В другом примере промотор МНСК (SEQ ID NO: 4) функционально связан с кодирующей последовательностью микродистрофина человека (SEQ ID NO: 1), как представлено в конструкции, представленной на фиг. 7 или 11 (SEQ ID NO: 5). В другом аспекте в изобретении предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В изобретении также предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4.

В дополнительном аспекте в изобретении предложен вектор гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5. Например, вектор гAAVgh74.МНСК7.микродистрофин содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 и показан на фиг. 10. Этот вектор гAAV содержит промотор МНСК7, химерную интронную последовательность, кодирующую последовательность гена микродистрофина человека, поли-А, устойчивость к ампициллину и каркас плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322.

В изобретении предложен рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 3. Этот вектор гAAV является AAV серотипа AAVrh.74.

В изобретении также предложен рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность конструкции рAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3. Этот вектор гAAV является AAV серотипа AAVrh.74.

Векторы гAAV по данному изобретению могут представлять собой любой серотип AAV, такой как серотип AAVrh.74, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

В изобретении также предложены фармацевтические композиции (или иногда называемые в данном документе просто "композициями"), содержащие любой из векторов гAAV по данному изобретению.

В другом варианте осуществления в изобретении предложены способы получения векторной частицы гAAV, включающей культивирование клетки, которая была трансфицирована любым вектором гAAV по данному изобретению, и извлечение частиц гAAV из супернатанта трансфицированных клеток. В изобретении также предложены вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению.

В изобретении предложены способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества любого из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению, экспрессирующих микродистрофин человека.

В изобретении предложены способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2.

В изобретении также предложены способы лечения мышечной дистрофии, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность конструкции рAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3.

Термин "фиброз" относится к чрезмерному или нерегулируемому отложению компонентов внеклеточного матрикса (ЕСМ) и аномальным процессам восстановления в тканях при повреждении, включая скелетные мышцы, сердечную мышцу, печень, легкое, почку и поджелудочную железу. Откладываемые компоненты ЕСМ включают фибронектин и коллаген, например коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3.

В изобретении также предложены способы уменьшения или профилактики фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающие введение терапевтически эффективного количества любого рекомбинантного вектора AAV по данному изобретению.

В другом варианте осуществления в изобретении предложены способы профилактики фиброза у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора AAV по данному изобретению. Например, любой из гAAV по данному изобретению можно вводить субъектам, страдающим мышечной дистрофией, для профилактики фиброза, например гAAV по данному изобретению, экспрессирующий белок микродистрофин человека, можно вводить до того, как у субъекта обнаружен фиброз. Кроме того, гAAV по данному изобретению, экспрессирующий ген микродистрофина человека может быть введен субъекту с риском развития фиброза, например, страдающему от мышечной дистрофии или у которого диагностирована мышечная дистрофия, например, DMD. гAAV по данному изобретению можно вводить субъекту, страдающему мышечной дистрофией, для профилактики нового фиброза у этих субъектов.

В изобретении предложено введение любого из векторов AAV по данному изобретению до того, как у субъекта обнаружен фиброз. Кроме того, гAAV по данному изобретению может быть введен субъекту с риском развития фиброза, например пациенту, страдающему от мышечной дистрофии или у которого диагностирована мышечная дистрофия, например МДД. гAAV по данному изобретению можно вводить субъекту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже развился фиброз, для профилактики нового фиброза у этих субъектов.

В изобретении также предложены способы увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающие введение терапевтически эффективного количества вектора gAAV по данному изобретению, экспрессирующего ген микродистрофина человека. Эти способы могут дополнительно включать стадию введения gAAV, экспрессирующего микродистрофин.

В изобретении предложено введение любого из векторов AAV по данному изобретению пациентам с диагнозом DMD до того, как у субъекта был обнаружен фиброз, или до того, как мышечная сила была уменьшена, или до того, как мышечная масса была уменьшена.

В изобретении также предложено введение AAV по данному изобретению субъекту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже развился фиброз, с целью профилактики нового фиброза у этих субъектов или уменьшения фиброза у этих пациентов. В изобретении также предложено введение любого из gAAV по данному изобретению пациенту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже есть уменьшенная мышечная сила или уменьшенная мышечная масса, чтобы защитить мышцу от дальнейшего повреждения.

В любом из способов по данному изобретению субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как DMD, или любой другой дистрофин-ассоциированной мышечной дистрофии.

В другом аспекте вектор gAAV, экспрессирующий белок микродистрофин, содержит кодирующую последовательность гена микродистрофина, функционально связанную с мышечным специфическим регулирующим элементом, отличным от MHC7 или MCK. Например, в качестве специфического для мышц регуляторного элемента используют элемент гена скелетного актина человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфический энхансер-связывающий фактор (MEF), tMCK (усеченный MCK), тяжелую цепь миозина (MHC), C5-12 (синтетический промотор), элемент энхансера креатинкиназы мышц, элемент гена скелетного быстро сокращающегося тропонина C, элемент гена медленно сокращающегося сердечного тропонина C, элемент гена скелетного медленно изменяющийся элемент гена тропонина I, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

В любом из способов по данному изобретению вектор или композицию gAAV можно вводить путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

Кроме того, в любом из способов по данному изобретению вектор или композицию gAAV можно вводить системно. Например, вектор или композиция gAAV могут быть введены парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации.

В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции, содержащей любой из векторов gAAV по данному изобретению, для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом.

Кроме того, в изобретении предложена композиция, содержащая любой из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению, для профилактики фиброза у пациента, страдающего мышечной дистрофией.

В изобретении предложены композиции, содержащие любой из рекомбинантных векторов AAV по данному изобретению, для лечения мышечной дистрофии.

В изобретении предложены композиции, содержащие рекомбинантный вектор AAV, содержащий нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и последовательность промотора MHC7 SEQ ID NO: 2 для лечения мышечной дистрофии.

В изобретении предложена композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAV, содержащий конструкцию rAAV.MHC7.микродистрофин, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, для лечения мышечной дистрофии.

В изобретении также предложены композиции, содержащие любой из векторов gAAV по данному изобретению, для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией. В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложены композиции, содержащие любой из векторов gAAV по данному изобретению, для лечения мышечной дистрофии.

Композиции по данному изобретению могут быть составлены для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Композиция по данному изобретению также составлена для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации.

Кроме того, любая из композиций может быть составлена для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как DMD, или любой другой мышечной дистрофией, ассоциированной с дистрофином.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложено использование любого из векторов gAAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для уменьшения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Например, нуждающийся субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как DMD или любой другой дистрофин-ассоциированной мышечной дистрофии.

В другом варианте осуществления в изобретении предложено использование вектора gAAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для профилактики фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

Кроме того, в изобретении предложено применение рекомбинантного вектора AAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для увеличения мышечной силы и/или мышеч-

ной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

В изобретении также предложено использование векторов gAAV по данному изобретению для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

В изобретении предложено использование рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность микродистрофина человека SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2, для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

В изобретении предложено использование рекомбинантного вектора AAV, содержащего нуклеотидную последовательность конструкции rAAV.МНСК7.микродистрофин SEQ ID NO: 3, для лечения мышечной дистрофии.

В любом из применений данного изобретения лекарственное средство может быть составлено для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом из применений данного изобретения лекарственное средство может быть составлено для системного введения, такого как парентеральное введение, путем инъекции, инфузии или имплантации.

Любое из лекарственных средств может быть приготовлено для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией, такой как DMD или любая другая мышечная дистрофия, связанная с дистрофином.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана конструкция rAAV.МНСК7.микродистрофин. В этой конструкции касета экспрессии кДНК фланкирована инвертированными концевыми повторяющимися последовательностями AAV2 (ITR). Конструкция характеризуется год-делением в рамке считывания (R4-R23), в то время как шарниры 1, 2 и 4 (H₁, H₂ и H₄) и богатый цистеином домен остаются продуцирующими белок 138 кДа. Экспрессия белка микродистрофина (3579 п.н.) определяется промотором МНСК7 (795 п.н.). Интрон и 5'-UTR получены из плазмиды pCMVβ (Clontech). Касета с микродистрофином имела консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом ATG и короткий синтетический сигнал поли А 53 п.н. для терминации мРНК. Касета микродистрофина человека содержала домены (R4-R23/Δ71-78), как было описано ранее Harper et al. (Nature Medicine, 8, 253-261 (2002)).

На фиг. 2 показана экспрессия белка дистрофина после внутримышечной доставки конструкции AAVrh74.МНСК7. В переднюю большеберцовую мышцу мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, делали инъекцию 1×10^{11} вг (n=5 в группе). Через шесть недель мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина с помощью N-концевого антитела для окрашивания дистрофина, гематоксилина и эозина.

На фиг. 3А-3С представлены измерения силы скелетных мышц и количественная оценка экспрессии микродистрофина после внутримышечной инъекции конструкции AAVrh74.МНСК7. (А) В переднюю большеберцовую мышцу мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, делали инъекцию 1×10^{11} вг (n=5) с конструкцией AAVrh74.МНСК7. Через шесть недель передние большеберцовые мышцы собрали и подвергли измерениям силы *in vivo*. Группа с введенной дозой имела значительно большую выработку силы, чем контрольные группы с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, без обработки.

На фиг. 4А-4С показана повсеместная трансдукция волокон скелетных мышц, диафрагмы и сердечных мышц после системного введения конструкции AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин. (А) Мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, обрабатывали системно в возрасте 6 недель через хвостовую вену 6×10^{12} вирусных геномов (2×10^{14} вг/кг) AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин после 12 недель лечения. (В) Окрашивание микродистрофина демонстрирует количественную оценку процентного количества мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин в каждой ткани. (С) Показывает удельную силу, измеренную в диафрагме при слабой и высокой (планируемой терапевтической) дозе. Никаких существенных различий не наблюдалось при слабой дозе, однако при высокой дозе наблюдалось значительное улучшение.

На фиг. 5 показана экспрессия белка дистрофина после системной доставки конструкции AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин. Мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, (n=5) обрабатывали системно, начиная с возраста 6 недель, через хвостовую вену, 6×10^{12} вг AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин. После 12 недель обработки все мышцы собрали и окрашивали на дистрофин и восстановление компонентов DAPC (показан бета-саркогликан).

На фиг. 6А-6D показана токсикологию/безопасность AAVrh.74.МНСК7. Окрашивание гематоксилина и эозина (H&E) проводили на следующих мышечных тканях для анализа токсичности: передняя большеберцовая мышца (TA), икроножная мышца (GAS), квадрицепс (QD), поясничная мышца (PSO), трицепс (TRI) и диафрагма (DIA) (фиг. 6А). Токсичность не обнаружена. В качестве показателя эффективности было определено количество мышечных волокон с центрально расположенными ядрами (CN) (фиг. 6В). CN указывают на циклы мышечной дегенерации и регенерации, и, следовательно, уменьшение CN демонстрирует эффект обработки. Фиг. 6С демонстрирует, что общее количество волокон остается неизменным при обработке. Количество креатинкиназы показано на фиг. 6D, демонстрируя улучшение при высокой дозе. Независимые t-тесты были использованы для определения различий (p<0,05). Данные

представлены как среднее±стандартная ошибка среднего.

На фиг. 7 показана плазмидная конструкция rAAV.МСК.микродистрофин.

На фиг. 8 представлены результаты анализа активности гAAVrh74.МСК.микродистрофин (человека). В переднюю большеберцовую мышцу мышей с мышечной дистрофией, сцепленной с X-хромосомой, делали инъекцию 3×10^9 , 3×10^{10} или 1×10^{11} вг (n=3 в группе). Через четыре недели мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина с помощью N-концевого антитела Dys3. Наблюдалась линейная корреляция между экспрессией и дозой с очень малой экспрессией (без эффекта) при 3×10^9 вг и 89% экспрессии при 1×10^{11} вг.

На фиг. 9А-9С показано, что микродистрофин человека улучшает генерацию силы и защиту от повреждения, вызванного эксцентрическим сокращением. (А) Иммуноное окрашивание белка дистрофина в длинном разгибателе пальцев (EDL) и ТА демонстрирует экспрессию в mdx-миофибриллах после инъекции гAAVrh.74-МСК-микродистрофина (человека) через бедренную артерию. Мышцы, инфицированные положительным контролем, окрашивали идентичным образом и выдерживали соответствующее количество времени. (В) гAAVrh.74-МСК-микродистрофин значительно увеличивал нормализованную удельную силу по сравнению с mdx-мышцами, обработанными положительным контролем (p<0,05 по сравнению с mdx). (С) mdx-мышцы, инфицированные гAAVrh.74-МСК-микродистрофином (человека), сравнивали с контралатеральными mdx-мышцами EDL, инфицированными положительным контролем, и мышцы EDL дикого типа (ДТ C57B1/10) для снижения силы во время повторяющихся эксцентрических сокращений через 12 недель после переноса гена. Обработка гAAVrh.74-МСК-микродистрофином (микродистрофин) значительно защищала от потери силы по сравнению с mdx-мышцами, подвергавшимися обработке положительным контролем (p<0,001 по сравнению с mdx). Ошибки являются стандартными ошибками среднего.

На фиг. 10 представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 3 гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин).

На фиг. 11 представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 5 гAAVrh74.МСК.микродистрофин).

На фиг. 12А и 12В представлен иммунологический ответ на системную доставку AAVrh74.МНСК7.микродистрофин у примата, который не является человеком. (А) Ответ ELISpot на пулы капсидов AAV и микродистрофина. ConA является положительным контролем, а DMSO является отрицательным контролем. Было три пула AAVrh74 и четыре пептидных пула, специфичных для микродистрофина. (В) Положительные ИФА-титры циркулирующих нейтрализующих антител к векторному капсиду. Сыворотку выделяли у приматов раз в две недели и анализировали в ней титр антител. Указанный титр соответствует последнему разведению, при котором отношение ответа >2.

На фиг. 13А и 13В показана системная доставка в макаку-резус AAVrh74.МНСК7.микродистрофин. Иммунофлуоресцентное окрашивание анти-FLAG в левосторонних мышцах демонстрировало устойчивую экспрессию микродистрофина.

На фиг. 14 показан эффект системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на экспрессию трансгена. Иммунофлуоресцентное окрашивание микродистрофина с использованием N-концевого антитела к дистрофину в сердце, диафрагме, поясничной мышце и передней большеберцовой мышце (ТА) демонстрирует устойчивую экспрессию при средней (6e12 вирусных геномов; 2e14 вг/кг) и высокой дозе (1.2 e13 вг; 6e14 вг/кг) обработанных животных через 3 месяца после инъекции. Показаны 20× изображения.

На фиг. 15 показано влияние системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на экспрессию трансгена. Иммунофлуоресцентное окрашивание микродистрофина с использованием N-концевого антитела к дистрофину в икроножной мышце, квадрицепсе, трицепсе и ягодичной мышце демонстрируют значительную экспрессию при средней (6e12 вг; 2e14 вг/кг) и высокой дозе (1.2e13 вг, 6e14 вг/кг) обработанных животных через 3 месяца после инъекции. Показаны 20× изображения.

На фиг. 16 показано влияние системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на мышечную патологию. (А) Окрашивание H&E диафрагмы, передней большеберцовой мышцы, икроножной мышцы и квадрицепса мышцей ДТ C57BL/6, mdx-мышцей и мышцей обработанных гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином (средняя доза - 2e14 вг/кг; высокая доза - 6e14 вг/кг), (В) Количественная оценка среднего размера волокна продемонстрировала нормализацию размера волокна по всей ткани. **** p<0,001, однофакторный дисперсионный анализ; данные представлены как среднее±стандартная ошибка среднего. Показаны 20× изображения.

На фиг. 17 показано влияние системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на мышечную патологию. (А) Окрашивание H&E трицепса, ягодичной и поясничной мышц мышцей ДТ C57BL/6, mdx-мышцей и мышцей, обработанных гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином (средняя доза - 2e14 вг/кг; высокая доза - 6e14 вг/кг). (В) Количественная оценка среднего размера волокна продемонстрировала большие волокна в зависимости от дозы. **** p <0,001, однофакторный дисперсионный анализ; данные представлены как среднее±стандартная ошибка среднего. Показаны 20× изображения.

На фиг. 18 показано влияние системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на цен-

тральную нуклеацию. Повышение дозы иллюстрирует уменьшение центральной нуклеации во всех скелетных мышцах и диафрагме. Двухфакторный дисперсионный анализ использовали для определения различий ($p < 0,05$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

На фиг. 19 показано влияние системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином на отложение коллагена. Увеличение дозы иллюстрирует снижение накопления коллагена (%) в диафрагме. * $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ; данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Показаны 20 \times изображения.

На фиг. 20 показана коррекция дефицита силы в диафрагме. После 3 или 6 месяцев обработки собирали полоски мышц диафрагмы для измерения удельной силы (нормализованной к площади поперечного сечения). Обработка восстановило силу до уровня ДТ. * $p < 0,05$. Для определения отличий от mdx-LR мышей использовали однофакторный дисперсионный анализ.

На фиг. 21 показана коррекция дефицита силы в ТА. (А) После 3-6 месяцев обработки мышцы ТА собирали (как левую, так и правую) для измерения удельной силы (нормализованной к весу ТА). Обработка восстановило силу до уровня ДТ. (В) Обработка избавила мышцы ТА от усталости после строгого протокола эксцентрических сокращений. * $p < 0,05$. Для определения отличий от mdx-LR мышей использовали однофакторный дисперсионный анализ.

На фиг. 22 показано распределение среднего количества копий вг в различных тканях трех mdx-мышей после внутривенной доставки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин.

На фиг. 23 показано, что химические составы сывороток у мышей, системно инъецированных ssAAVrh74.МНСК7.микродистрофином, и химические составы сывороток контрольных групп соответствующего возраста анализировали с помощью независимого CRO (Charles River Laboratories), который указывает нормальные значения во всех анализируемых химических веществах. Единственными ненормальными значениями были повышенные значения AST и ALT, отмеченные у mdx-животных, обработанных носителем [MDX-LR (раствор Рингера с лактатом)], которые были нормализованы при обработке. Известно, что AST и ALT повышены при DMD. ALT=аланинаминотрансфераза, ALP/K=щелочная фосфатаза, AST=аспартатаминотрансфераза, BUN=азот мочевины крови, В/С=соотношение крови и креатинина, CREAT=креатин, GLU=глюкоза, TP=общий белок, TBIL=общий билирубин, DBIL=прямой билирубин.

На фиг. 24 представлено вестерн-блоттинг биораспределение на мышцы и органы от mdx-мышей, системно инъецированных гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином.

На фиг. 25 представлена карта хелперной плазмиды pNLREP2-Caprh74 AAV.

На фиг. 26 представлена хэлперная плазида Ad rHELP.

Подробное описание сущности изобретения

В данном изобретении предложены векторы генной терапии, например векторы гAAV, сверхэкспрессирующие микродистрофин человека, и способы уменьшения и профилактики фиброза у пациентов с мышечной дистрофией. Мышечные биопсии, взятые в самом раннем периоде диагностики DMD, показывают заметную пролиферацию соединительной ткани. Мышечный фиброз вреден во многих отношениях. Он уменьшает нормальный транзит эндомиоциальных питательных веществ через барьеры соединительной ткани, уменьшает кровоток и лишает мышцы питательных компонентов, поступающих из сосудов, и функционально способствует ранней потере способности передвижения из-за контрактуры конечностей. Со временем проблемы с лечением увеличиваются в результате выраженного фиброза в мышцах. Это можно наблюдать на биопсии мышц, сравнивая пролиферацию соединительной ткани в последовательные моменты времени. Процесс продолжает усугубляться, приводя к потере способности передвижения и ускорению потере контроля, особенно у пациентов с инвалидной коляской.

Без раннего лечения, включая параллельный подход к снижению фиброза, маловероятно, что преимущества пропуска экзона, считывания стоп-кодона или заместительной генной терапии когда-либо будут полностью достигнуты. Даже низкомолекулярные вещества или стратегии замены белка могут потерпеть неудачу без подхода к снижению мышечного фиброза. Предыдущая работа на старых mdx-мышцах с существующим фиброзом, обработанных AAV.микродистрофином, продемонстрировала, что мы не смогли добиться полной функциональной реставрации (Liu, M. et al., Mol. Ther., 11, 245-256 (2005)). Также известно, что прогрессирование кардиомиопатии DMD сопровождается рубцеванием и фиброзом в стенке желудочка.

Используемый в данном документе термин "AAV" означает стандартную аббревиатуру для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК-парвовирус, который растет только в клетках, в которых определенные функции обеспечиваются коинфицирующим вирусом-помощником. В настоящее время охарактеризовано тринадцать серотипов AAV. Общую информацию и обзоры AAV можно найти, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, vol. 1, p. 169-228; и Berns, 1990, Virology, p. 1743-1764, Raven Press (New York). Однако вполне ожидаемо, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны как структурно, так и функционально, даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, 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, проявляют очень похожие свойства репликации, опосредованные гомологичными генами гер, и все они несут три родственных капсидных белка, таких как экспрессированные в AAV2. Степень родства дополнительно подтверждается гетеродуплексным анализом, который выявляет обширную перекрестную гибридизацию между серотипами по всей длине генома, и наличие аналогичных сегментов самоотжига на концах, которые соответствуют "последовательностям инвертированного концевого повтора" (ITR). Подобные паттерны инфекционности также предполагают, что функции репликации в каждом серотипе находятся под сходным регуляторным контролем.

Используемый в данном документе термин "вектор AAV" относится к вектору, содержащему один или несколько представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевых повторов AAV (ITR). Такие векторы AAV могут реплицироваться и упаковываться в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов гер и сар.

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

AAV.

Рекомбинантные геномы AAV по данному изобретению включают молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению и одну или несколько ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах гAAV может происходить из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая серотипы AAV ARArh.74, 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, но не ограничиваясь ими. Получение псевдотипированного гAAV раскрыто, например, в WO 01/83692. Другие типы вариантов гAAV, например, гAAV с капсидными мутациями, также предложены. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11):1900-1909 (2014). Как отмечено выше в разделе "Уровень техники", в данной области известны нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV. Для стимулирования специфической экспрессии скелетных мышц можно использовать AAV1, AAV6, AAV8 или AAVrh.74.

ДНК-плазмиды по данному изобретению содержат геномы гAAV по данному изобретению. ДНК-плазмиды переносят в клетки, восприимчивые к инфицированию вирусом-помощником AAV (например, аденовирусом, аденовирусом с делецией E1 или герпесвирусом) для сборки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Способы продукции частиц гAAV, при которых в клетку вводят геном AAV, подлежащий упаковке, гены гер и сар и функции вируса-помощника, являются стандартными в данной области техники. Продукция гAAV требует присутствия в одной клетке (называемой в данном документе пакующей клеткой) следующих компонентов: генома гAAV, отделенных от генома гAAV (т.е. не входящих в состав генома) генов гер и сар AAV, и функций вируса-помощника. Гены гер и сар AAV могут принадлежать AAV любого серотипа, для которого можно получить рекомбинантный вирус, и могут принадлежать AAV серотипа, отличающегося от серотипа ITR генома гAAV, включая серотипы 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, но не ограничиваясь ими. Получение псевдотипированного гAAV описано, например, в WO 01/83692, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

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

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 статьях Ratschin et al., *Mol. Biol.*, 4:2072 (1984); Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:3251 (1985); McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski et al., *J. Virol.*, 63:3822-3828 (1989); па-

тенте 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., Vaccine 13:1244-1250 (1995); Paul et al., Human Gene Therapy, 4:609-615 (1993); Clark et al., Gene Therapy, 3:1124-1132 (1996); патенте США № 5786211; патенте США № 5871882; и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы тем самым полностью включены в данный документ посредством ссылок с особым вниманием на разделы документов, которые касаются продукции гAAV.

Таким образом, в данном изобретении предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном варианте реализации упаковывающие клетки могут являться стабильно трансформированными раковыми клетками, например клетками HeLa, клетками 293 и клетками PerC.6 (линии, родственной 293). В еще одном варианте реализации упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, например клетки 293 после небольшого количества пересевов (клетки почки плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты плода человека), клетки WI-38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода макака-резуса).

Рекомбинантный AAV (т.е. инкапсидированные инфекционные частицы гAAV) по данному изобретению содержат геном гAAV. В иллюстративных вариантах осуществления геномы обоих гAAV лишены ДНК гер и сар AAV, т.е., не содержат ДНК гер и сар AAV между ITR геномов. Примеры гAAV, которые могут быть сконструированы так, чтобы содержать молекулы нуклеиновой кислоты по данному изобретению, раскрыты в международной патентной заявке № PCT/US2012/047999 (WO 2013/016352), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В иллюстративном варианте осуществления рекомбинантный вектор AAV по данному изобретению получают методом тройной трансфекции (Xiao et al., J. Virol., 72, 2224-2232 (1998) с использованием векторной плазмиды AAV рAAV.МНСК7.микродистрофин, рNLRep2-Caprh74 и рHelp, рAAV содержит кассету экспрессии гена микродистрофина, фланкированную последовательностями инвертированного концевой повтора (ITR) AAV2. Именно эта последовательность инкапсидирована в вирионах AAVrh74. Плазмида содержит последовательность микродистрофина и энхансер МНСК7 и элементы основного промотора специфического для мышц промотора для управления экспрессией гена. Кассета экспрессии также содержит интрон SV40 (SD/SA) для обеспечения высокого уровня экспрессии гена и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста используется для эффективной терминации транскрипции.

PNLREP2-Caprh74 является плазмидой-помощником AAV, которая кодирует 4 белка гер AAV2 дикого типа и 3 белка капсида AAV VP дикого типа из серотипа rh74. Схематическая карта плазмиды рNLREP2-Caprh74 показана на фиг. 25.

Аденовирусная плазмида-помощник рHELP имеет 11635 п.н. и была получена от Applied Viromics. Плазмида содержит области генома аденовируса, которые важны для репликации AAV, а именно E2A, E4ORF6 и VA РНК (функции аденовируса E1 обеспечиваются клетками 293). Последовательности аденовируса, присутствующие в этой плазмиде, представляют только ~40% генома аденовируса и не содержат цис-элементов, критических для репликации, таких как концевые повторы аденовируса. Следовательно, получение инфекционного аденовируса в такой производственной системе не ожидается. Схематическая карта плазмиды рHELP показана на фиг. 26.

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

В другом варианте осуществления изобретения предложены композиции, содержащие гAAV по данному изобретению. Композиции по данному изобретению содержат 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 дозировках и концентрациях и включают буферы и поверхностно-активные вещества, такие как плуроники.

Титры гAAV, которые можно вводить в способах по данному изобретению, зависят, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(ов) клеток-мишеней; их можно определить посредством способов, стандартно применяемых в данной области техники. Титры гAAV могут варьировать от около 1×10^6 , около 1×10^7 , около 1×10^8 , около 1×10^9 , около 1×10^{10} , около 1×10^{11} , около 1×10^{12} , от около 1×10^{13} до около 1×10^{14} или более устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки можно также выражать в единицах геномов вируса (вг).

В данном изобретении предложены способы трансформации клетки-мишени с помощью гAAV *in vivo* или *in vitro*. Способы *in vivo* включают стадию введения эффективной дозы или эффективных множественных доз композиции, содержащей гAAV по данному изобретению, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития расстройства/заболевания, введение явля-

ется профилактическим. Если дозу вводят после развития расстройства/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 расстройством/болезненным состоянием, которое лечат, которая замедляет или предотвращает прогрессирование расстройства/болезненного состояния, которая замедляет или предотвращает прогрессирование расстройства/болезненного состояния, которая уменьшает степень заболевания, что приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или продлевает выживаемость. Примером заболевания, предполагаемого для профилактики или лечения способами по данному изобретению, является DMD.

В данном изобретении также предложена комбинированная терапия. Используемая в данном документе комбинированная терапия включает как одновременное лечение, так и последовательное лечение. В частности, в данном изобретении специально предложены комбинации способов со стандартным медицинским лечением (например, кортикостероидами), а также комбинации с новыми терапиями.

Введение эффективной дозы композиций может осуществляться стандартными в данной области способами, включая внутримышечное, парентеральное, внутривенное, пероральное, буккальное, назальное, легочное, внутрочерепное, внутрикостное, внутриглазное, ректальное или вагинальное, но не ограничиваясь ими. Способ(ы) введения и серотип(ы) компонентов AAV гAAV (в частности, ITR AAV и капсидный белок) по данному изобретению могут быть выбраны и/или согласованы специалистами в данной области с учетом инфекции и и/или болезненного состояния, подвергаемых лечению, и клетки/ткань(и)-мишени, которые должны экспрессировать белок микродистрофин.

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

В частности, фактическое введение гAAV по данному изобретению может быть осуществлено с использованием любого физического способа, который будет транспортировать рекомбинантный вектор гAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно данному изобретению включает инъекцию в мышцу и инъекцию в кровоток, но не ограничивается ими. Было продемонстрировано, что простого ресуспендирования гAAV в физиологическом растворе с фосфатным буфером достаточно для обеспечения носителя, полезного для экспрессии мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений для носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с гAAV (хотя в обычном режиме с гAAV следует избегать композиций, которые деградируют 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 которой включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде составов для инъекции или в виде составов для местного применения для доставки в мышцу посредством трансдермального транспорта. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для трансдермального транспорта, были ранее разработаны и могут быть использованы при практическом применении данного изобретения. RAAV можно использовать с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обработки.

Дозировки гAAV, которые можно вводить в способах, описанных в данном документе, зависят, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(ов) клеток-мишеней; их можно определить посредством способов, стандартно применяемых в данной области техники. Титры каждого введенного гAAV могут варьироваться 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} или до около 1×10^{15} или больше устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) на мл. Дозировки могут быть также выражены в единицах вирусных геномов (вг) (т.е. 1×10^7 вг, 1×10^8 вг, 1×10^9 вг, 1×10^{10} вг, 1×10^{11} вг, 1×10^{12} вг, 1×10^{13} вг, 1×10^{14} вг, 1×10^{15} соответственно). Дозировки также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (вг) на килограмм (кг) массы тела (т.е. 1×10^{10} вг/кг, 1×10^{11} вг/кг, 1×10^{12} вг/кг, 1×10^{13} вг/кг, 1×10^{14} вг/кг, 1×10^{15} вг/кг соответственно). Способы титрования AAV описаны в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10:1031-1039 (1999).

В частности, фактическое введение гAAV по данному изобретению может быть осуществлено с использованием любого физического способа, который будет транспортировать рекомбинантный вектор гAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно данному изобретению включает инъекцию в мышцу и инъекцию в кровоток, но не ограничивается ими. Было продемонстрировано, что простого ресуспендирования гAAV в физиологическом растворе с фосфатным буфером достаточно для обеспечения носителя, полезного для экспрессии мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений для носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с гAAV (хотя в обычном режиме с гAAV следует избегать композиций, которые деградируют 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 которой включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде составов

для инъекции или в виде составов для местного применения для доставки в мышцы посредством трансдермального транспорта. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для трансдермального транспорта, были ранее разработаны и могут быть использованы при практическом применении данного изобретения. RAAV можно использовать с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обработки.

Для целей внутримышечной инъекции можно использовать растворы в адьюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или в водном пропиленгликоле, а также стерильные водные растворы. Такие водные растворы могут быть забуферены при желании, и жидкий разбавитель сначала становится изотоническим с солевым раствором или глюкозой. Растворы гAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислотные фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсию гAAV также можно приготовить в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В этой связи все используемые стерильные водные среды легко доступны стандартными методами, хорошо известными специалистам в данной области.

Фармацевтические носители, разбавители или наполнители, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленно приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Подходящее жидкое состояние может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть вызвано различными противобактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекцируемых композиций может быть достигнута путем использования агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения гAAV в необходимом количестве в соответствующем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости с последующей стерилизацией на фильтре. Обычно дисперсии готовят путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и метод сублимационной сушки, 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 у субъекта, трансдуцируют с помощью гAAV и повторно вводят субъекту. Альтернативно можно использовать сингенные или ксеногенные мышечные клетки, когда эти клетки не будут генерировать неподходящий иммунный ответ у субъекта.

В данной области известны подходящие способы трансдукции и повторного введения трансдуцированных клеток субъекту. В одном варианте осуществления клетки могут трансдуцировать *in vitro* путем объединения гAAV с мышечными клетками, например, в соответствующих средах, и отбирать те клетки, которые несут интересующую ДНК, с использованием традиционных методов, таких как Саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с использованием селективных маркеров. Затем трансдуцированные клетки могут быть составлены в фармацевтические композиции, и композиция введена субъекту различными способами, такими как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу с использованием, например, катетера.

Трансдукция клеток гAAV по данному изобретению приводит к устойчивой экспрессии белка микродистрофина. Таким образом, в данном изобретении предложены способы введения/доставки гAAV, который экспрессирует белок микродистрофин, животному, предпочтительно человеку. Эти способы включают трансдукцию тканей (включая такие ткани, как мышцы, органы, такие как печень и мозг, и железы, такие как слюнные железы, но не ограничиваясь ими), одним или несколькими гAAV по данному изобретению. Трансдукция может быть осуществлена с помощью генных кассет, содержащих тканеспецифичные регулирующие элементы. Например, в одном варианте осуществления изобретения предложены способы трансформации мышечных клеток и мышечных тканей, управляемые специфичными для мышц регулирующими элементами, включая полученные из семейств генов актина и миозина, таких как

из семейства генов myoD (см. Weintraub et al., Science, 251:761-766 (1991)), специфичный для миоцитов энхансер-связывающий фактор MEF-2 (Cserjesi и Olson, Mol. Cell Biol., 11:4854-4862 (1991)), регулирующие элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека (Muscat et al., Mol. Cell Biol., 7:4089-4099 (1987)), гена актина сердечных мышц, элементы последовательности мышечной креатинкиназы (см. Johnson et al., Mol. Cell Biol., 9:3393-3399 (1989)) и элемент-энхансер креатинкиназы мышцы (mCK), регулирующие элементы, происходящие из быстро сокращающегося гена тропонина С скелетных мышц, медленно сокращающегося гена тропонина С сердечных мышц и медленно сокращающегося гена тропонина I: ядерные факторы, индуцируемые при гипоксии (Semenza et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:5680-5684 (1991)), стероид-индуцируемые элементы и промоторы, включающие глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:5603-5607 (1993)) и другие регулирующие элементы, но не ограничиваясь ими.

Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. В данном изобретении предложена устойчивая экспрессия микродистрофина трансдуцированными миофибриллами.

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

Термин "трансдукция" используется для обозначения введения/доставки кодирующей области микродистрофина в реципиентную клетку либо *in vivo*, либо *in vitro* с помощью дефективного по репликации гААV по данному изобретению, что приводит к экспрессии микродистрофина клеткой реципиента.

Таким образом, в данном изобретении предложены способы введения эффективной дозы (или доз, вводимых по существу одновременно или доз, вводимых с интервалами) гААV, которые кодируют микродистрофин, пациенту, нуждающемуся в этом.

Примеры

Пример 1. Получение конструкции рААV.МНСК7.микродистрофин.

Плазида рААV.МНСК7.микродистрофин содержит кассету экспрессии с кДНК микродистрофина человека, фланкированную последовательностями инвертированного концевых повтора ААV2 (ITR) (см. фиг. 1). Конструкция микродистрофина характеризовалась *god*-делацией в рамке считывания (R4-R23), в то время как шарниры 1, 2 и 4 и богатый цистеином домен остаются продуцирующими белок 138 кДа. Экспрессия белка микродистрофина (3579 п.н.) определялась промотором МНСК7 (795 п.н.). Плазмиду конструировали из плазмиды рААV.МСК.микродистрофин путем удаления промотора МСК и вставки промотора МНСК7. После основного промотора расположен эндогенный экзон 1 (нетранслируемый) МСК мышцы 53 п.н. для эффективной инициации транскрипции, за которым расположены SV40 поздние сигналы сплайсинга 16S/19S (97 п.н.) и короткий 5'UTR (61 п.н.). Интрон и 5'-UTR получены из плазмиды рСМVB (Clontech). Кассета с микродистрофином имела консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом АТГ и короткий синтетический сигнал поли А 53 п.н. для терминации мРНК. Кассета микродистрофина человека содержала домены (R4-R23/ Δ 71-78), как было описано ранее Harper et al. (Nature Medicine, 8, 253-261 (2002)). Комплементарную ДНК оптимизировали по кодону для использования для человека и синтезировали с помощью GenScript (Пискаатауэй, Нью-Джерси) (Mol. Ther., 18, 109-117 (2010)). Единственными вирусными последовательностями, включенными в этот вектор, были инвертированные концевые повторы ААV2, которые необходимы как для репликации вирусной ДНК, так и для ее упаковки. Кассета с микродистрофином имеет короткий 53 т.н. синтетический сигнал поли-А для терминации мРНК.

В предыдущих исследованиях была подтверждена экспрессия с использованием промотора МНСК7 в сердечных мышцах (Salva et al., Mol. Ther., 15, 320-329 (2007)) и экспрессия ААVrh74 в скелетной, сердечной мышцах и диафрагме (Sondergaard et al., Annals of Clinical and Transl Neurology, 2, 256-270 (2015)). Последовательность конструкции на фиг. 1 была инкапсидирована в вирионы ААVrh.74. Молекулярный клон серотипа ААVrh.74 был клонирован из лимфатического узла макака-резуса и описан в Rodino-Klapac et al., Journal of Translational medicine, 5, 45 (2007).

В табл. 1 приведены молекулярные признаки плазмиды рААV.МНСК7.микродистрофин (SEQ ID NO: 3).

Таблица 1

Молекулярные признаки плазмиды rAAV.МНСК7.микродистрофин

ТИП	НАЧАЛО	КОНЕЦ	НАЗВАНИЕ	ОПИСАНИЕ
ОБЛАСТЬ	7	116	5' ITR	Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа
ОБЛАСТЬ	236	1036	МНСК7	Комплекс тяжелая цепь миозина мышцы – энхансер/промотор слияния мышечной креатинкиназы E-box
ОБЛАСТЬ	1046	1195	Химерный интрон	5'-донорный сайт гена β -глобина человека и точка ветвления и 3'-акцепторный сайт сплайсинга переменной области тяжелой цепи IgG
ГЕН	1206	4786	кДНК дистрофина человека	кДНК микродистрофина человека
ОБЛАСТЬ	4787	4842	Поли-А	Синтетическая поли-А
ОБЛАСТЬ	4933	5042	3' ITR	Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа
ГЕН	6808	7668	AmpR	ген β -лактамазы
ОБЛАСТЬ	7823	8442	Ori	Точка начала репликации плазмиды

Пример 2. Исследования внутримышечной экспрессии с использованием rAAV.МНСК7.микродистрофин.

Исследования экспрессии проводили с использованием конструкции микродистрофина человека (rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, описанного в примере 1) путем внутримышечной инъекции. В переднюю большеберцовую мышцу mdx-мышей (мутантные мыши со спонтанной DMD^{mdx}, которые не экспрессируют дистрофин) делали инъекцию 1×10^{11} вг кассеты (n=5 в группе). Через шесть недель мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина (Dys3) с помощью N-концевого антитела для окрашивания дистрофина и гематоксилина и эозина (HE). На фиг. 2 показана диффузная экспрессия генов и снижение центрально расположенных ядер при дозе 1×10^{11} вг по сравнению с мышцами без обработки. Кроме того, наблюдалось снижение центральной нуклеации с увеличением среднего размера волокон/рамки после обработки конструкцией с микродистрофином. Уровни экспрессии конструкции rAAVrh74.МНСК7.микродистрофин были количественно оценены около 73%.

В дополнение к измерению локализации и уровней экспрессии микродистрофина, силу скелетных мышц измеряли после внутримышечной инъекции кассеты. Внутримышечная экспрессия конструкции rAAV.МНСК7.микродистрофин приводила к значительно большей выработке абсолютной и удельной силы по сравнению с контролями без обработки (фиг. 3А и 3В соответственно).

Пример 3. Системная доставка rAAVrh.74.МНСК7.микродистрофин mdx-мышам.

Группе mdx-мышей в возрасте 6 недель вводили инъекцией через хвостовую вену либо 2×10^{12} вг (8×10^{13} вг/кг), либо высокую дозу (планируемую терапевтическую дозу) 6×10^{12} вг (2×10^{14} вг/кг) rAAVrh.74.МНСК7.микродистрофин. После 12 недель обработки все мышцы были собраны и окрашены на дистрофин и восстановление компонентов DAPC. Системно инъецированные (в хвостовую вену) мыши демонстрировали высокий уровень окрашивания дистрофина во всех мышцах. На фиг. 4А представлена широко распространенная трансдукция скелетных, сердечных мышечных волокон и мышечных волокон диафрагмы после системной дозы 6×10^{12} вг (2×10^{14} вг/кг). На фиг. 4В показана количественная оценка процентного содержания мышечных волокон, экспрессирующих микродистрофин, в каждой ткани. Наконец, диафрагма была проверена на функциональное улучшение (фиг. 4В). Никаких существенных различий не наблюдалось при слабой дозе, однако при высокой дозе наблюдалось значительное улучшение. Важно отметить, что фиг. 5 демонстрирует, что другие компоненты DAPC были полностью восстановлены после доставки микродистрофина. Показан бета-саркогликан (B-SG).

Токсикологию/безопасность AAVrh.74.МНСК7.микродистрофин оценивали путем введения вектора посредством внутривенной (iv) инъекции в хвостовую вену mdx-мышей согласно табл. 2. Не было выявлено токсичности ни в одной из проанализированных мышечных тканей, включая переднюю боль-

шеберцовую мышцу (TA), икроножную мышцу (GAS), квадрицепс (QD), поясничную мышцу (PSO), трицепс (TRI) и диафрагму (DIA) (фиг. 6А и 6В). Количество центрально расположенных ядер уменьшалось при высокой дозе 6×10^{12} вг (2×10^{14} вг/кг). Исторически центральная нуклеация в скелетных мышцах у mdx-мышей соответствующего возраста без обработки составляет в среднем ~80%. Наконец, предварительные данные из небольшого размера выборки (n=3) демонстрируют сниженный уровень высвобождения креатинкиназы (ед/л) в сыворотке мышей, получавших высокую дозу (D). Независимые t-тесты были использованы для определения различий ($p < 0,05$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Таблица 2

План исследования токсикологии/безопасности
гAAVrh.74.МНСК7.микродистрофин на мышах

Номер Когорты	Исследуемый агент	Доза (вг/кг)	Обрабо тка День 0	Через День 1	Умервщение в конечной точке эксперимента		
					Неде ля 6	Дополн ительно	
(1)	Низкая доза	AAVrh.74.МНСК7. микродистрофин	8,0 x 10 ¹³	Однокра тная в/в инъекци я в хвостов ую вену mdx- мышей	Вес через 24 ч, клинические наблюдения	5М	+2
(2)	Высока я доза	AAVrh.74.МНСК7. микродистрофин	2,0 x 10 ¹⁴			5М	+2
(3)	Контро ль	Носитель (LRS)	0			5М	+2
ВСЕГО МЫШЕЙ						N=21	

Пример 4. Получение конструкции рAAV.МСК.микродистрофин.

Плазмиду рAAV.МСК.микродистрофин конструировали, вставляя экспрессионную кассету МСК, управляющую оптимизированной по кодону последовательностью кДНК микродистрофина человека, в клонирующий вектор AAV рsub201 (Samulski et al., J. Virol., 61(10):3096-3101). Мышечно-специфический регуляторный элемент был включен в конструкцию для стимулирования мышечно-специфической экспрессии генов. Этот регуляторный элемент включал основной энхансер МСК мыши (206 п.н.), слитый с основным промотором МСК 351 п.н. (проксимальный). После основного промотора конструкция включает эндогенный экзон 1 МСК мыши (нетранслируемый) 53 п.н. для эффективной инициации транскрипции, за которым расположены SV40 поздние сигналы сплайсинга 16S/19S (97 п.н.) и короткий 5'UTR (61 п.н.). Интрон и 5'UTR были получены из плазмиды рCMV β (Clontech). Кассета с микродистрофином имеет консенсусную последовательность Козак непосредственно перед началом ATG и короткий синтетический сигнал поли-А 53 п.н. для терминации мРНК. Кассета микродистрофина человека содержит домены (R4-R23/ Δ 71-78), как было описано ранее Harper et al., Nat. Med., 8(3):253-61, 2002.

Плаزمида рAAV.МСК.микродистрофин содержала кассету экспрессии с кДНК микродистрофина человека, фланкированную последовательностями инвертированного концевой повтора AAV2 (ITR) (см. фиг. 7). Эта последовательность была инкапсидирована в вирионы AAVrh.74. Молекулярный клон серотипа AAVrh.74 был клонирован из лимфатического узла макака-резуса и описан в Rodino-Klapac et al., Journal of Tran. Med., 45 (2007).

Пример 5. Анализ активности и дозы с использованием гAAV.МСК.микродистрофин.

Исследования экспрессии проводились с использованием конструкции микродистрофина человека (гAAV.МСК.микродистрофин, описанный в примере 1) путем внутримышечной инъекции. В переднюю большеберцовую мышцу (TA) mdx-мышей (мутантные мыши со спонтанной DMDmdx, которые не экспрессируют дистрофин) делали инъекцию 3×10^9 , 3×10^{10} или 1×10^{11} вг (n=3 в группе). Через четыре недели мышцы собирали и окрашивали на экспрессию дистрофина с использованием антител, специфичных для окрашивания N-концевого Dys3 и гематоксилина и эозина (HE). На фиг. 8 показана линейная корреляция между экспрессией и дозой, где очень низкая экспрессия (без эффекта) при 3×10^9 вг и 89% экспрессии при 1×10^{11} вг.

Пример 6. Вазкулярная доставка гAAV.МСК.микродистрофин mdx-мышам.

Использование модель перфузии изолированных конечностей (Rodino-Klapac et al., J. Trans. Med., 5(45):1-11, 2007), mdx-мышам (n=10) делали инъекции с 1×10^{11} вг гAAVrh1.74.МСК.микродистрофин через бедренную артерию и проводили анализ результатов. Через три месяца после переноса гена мыш-

цы нижних конечностей были собраны, и исследования эффективности продемонстрировали значительное улучшение как силы, так и устойчивости к повреждению, вызванному эксцентрическим сокращением (фиг. 9).

Иммуноокрашивание белка дистрофина в мышцах длинного разгибателя пальцев (EDL) и мышцах ТА демонстрирует экспрессию в mdx-миофибрилах после обработки rAAVrh1.74-МСК-микродистрофином (фиг. 9А). Инфицированные положительным контролем мышцы окрашивали идентичным образом и выдерживали соответствующее время. Фиг. 9В демонстрирует, что rAAVrh.74-МСК-микродистрофин значительно увеличивал нормализованную удельную силу по сравнению с mdx-мышцами, обработанными положительным контролем ($P < 0,05$ по сравнению с mdx). Кроме того, mdx-мышцы, инфицированные rAAVrh.74-МСК-микродистрофином (человека), сравнивали с контралатеральными mdx-мышцами EDL, инфицированными положительным контролем (синего цвета), и мышцами EDL дикого типа (ДТ C57B1/10) для снижения силы во время повторяющихся эксцентрических сокращений через 12 недель после переноса гена (фиг. 9С). Было обнаружено, что обработка rAAVrh.74-МСК-микродистрофином (микродистрофин) защищала от потери силы по сравнению с mdx-мышцами, подвергавшимися обработке положительным контролем ($P < 0,001$ по сравнению с mdx).

Пример 7. Исследования на приматах.

Чтобы применить доклинические результаты у мышей к клинической парадигме, примату, не являющемуся человеком (NHP), системно вводили дозу, чтобы оценить безопасность и эффективность для будущих клинических испытаний. Эффект суммарной дозы 2×10^{14} вг AAVrh74.МНСК7.микродистрофин.FLAG, доставленной внутривенно через головную вену, изучали на примате, не являющемся человеком. Эта доза была пропорциональна (на основе веса животного) системной дозе, вводимой мышам, и соответствовала средней дозе ($6,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы), вводимой мышам.

Исходные химические и иммунологические исследования, включая иммуноферментный спот-анализ (ELISpot) проводили для измерения количества Т-клеток против AAVrh.74 капсида и микродистрофина, а также титров антител анти-AAV. Три пептидных пула использовали для капсидного белка AAVrh.74 (Genemed Synthesis, Сан-Антонио, Техас), содержащих 34-36 пептидов, каждый длиной 18 аминокислот и перекрывающийся 11 остатками. Четыре пептидных пула, включающие белок микродистрофин.FLAG (Genemed Synthesis), каждый длиной 18 аминокислот и перекрывающийся 11 остатками. Конканавалин А (ConA) (Sigma, 1 мкг/мл) служил в качестве положительного контроля, а 0,25% диметилсульфоксид (ДМСО) - в качестве отрицательного контроля. Эти исследования повторяли каждые две недели на протяжении всего исследования. Через 3 месяца после обработки животных подвергали эвтаназии для получения аутопсии всех тканей. Иммунологические анализы не показали каких-либо неожиданных ответов на капсид или трансген с помощью ELISpot (фиг. 12А) и никаких неожиданных ответов антител на капсид AAVrh74 с помощью ELISA (фиг. 12В).

Кроме того, результаты полного анализа крови и химической панели показали небольшое повышение уровня ферментов печени, которые были нормализованы до исходного уровня без вмешательства или обработки, как показано в табл. 3 ниже.

Таблица 3

<i>Химический анализ крови</i>							
13-176	Исходный уровень	24 часа	2 недели	4 недели	6 недель	8 недель	12 недель
Общий белок (6,4-7 мг/дл)	7	7	6,7	6,6	6,6	6,6	6,7
Биллирубин, общий (0,15-0,23 мг/дл)	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,4	0,4

ALT (31–50 Ед/л)	39	38	75	104	182	172	65
AST (19–38 Ед/л)	35	63	50	92	98	121	64
Щелочная фосфатаза (504–821 Ед/л)	417	396	332	383	598	608	578
GGT	77	77	120	106	131	156	134
СК	109	504	164	183	137	126	123

На протяжении всего исследования не было никаких других неожиданных химических показателей. Наконец, полный анализ всех скелетных мышц продемонстрировал обильную экспрессию в мышечных волокнах посредством иммунофлуоресцентного окрашивания специфическим антителом FLAG и обнаружением вестерн-блоттингом с использованием мышинового моноклонального антитела к дистрофину (фиг. 14А, 14В).

Данные в совокупности демонстрируют, что системная доставка AAVrh74.МНСК7.микродистрофин.FLAg обеспечивает безопасность и эффективность при обильной экспрессии во всех скелетных мышцах примата, не являющегося человеком.

Пример 8. Доклиническое исследование для демонстрации эффективности.

Было проведено доклиническое исследование для демонстрации эффективности системной доставки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин при лечении дефицита скелетных и сердечных мышц у mdx-мышей. Для этого исследования использовали вектор AAVrh74, содержащий оптимизированный по кодону трансген микродистрофина человека, управляемый специфичным мышечным и сердечным промотором, МНСК7, как описано в примере 1.

Системные инъекции гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин через хвостовую вену mdx-мышам (нулевым дистрофином) были использованы для исследования доза-ответ. Результаты этого исследования продемонстрировали, что системные инъекции mdx-мышам были эффективными для нормализации гистологических и функциональных результатов, измеренных в конечностях и диафрагме в зависимости от дозы. Кроме того, после официальной проверки гистопатологии сертифицированным ветеринарным патологоанатомом не было отмечено значительной токсичности, связанной с вектором.

Вектор для этого исследования был получен от Национальной детской больницы Viral Vector Core с использованием метода тройной трансфекции клеток НЕК293 в условиях, пригодных для исследования. Характеристика вектора после получения включала определение титра с помощью количественной ПЦР со сверхспиральным стандартом, определение уровня эндотоксина (ЕЭ/мл) и оценку стерильности. Полученный вектор анализировали с помощью SDS-PAGE, чтобы проверить соответствие характеру исчерченности с ожидаемым гAAV. Вектор был изготовлен с использованием плазмиды, содержащей конструкцию микродистрофина, мышечный специфический промотор МНСК7 для управления экспрессией, консенсусную последовательность Козака (ССАСС), химерный интрон SV40, синтетический сайт полиаденилирования (53 п.н.) (фиг. 1). Экспрессирующая кассета микродистрофина была клонирована между ITR AAV2, упакованными в вектор AAVrh74, для усиленной трансдукции скелетной и сердечной ткани.

Определение активности испытательного образца гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин было достигнуто путем выполнения внутримышечных инъекций вектора mdx-мышам. Мыши дикого типа служат в качестве положительного контроля, а инъекции стерильного раствора Рингера с лактатом mdx-мышам служат в качестве отрицательного контроля.

Таблица 4

Обзор плана исследования гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

Путь доставки	Штамм животных	Суммарная доза (вг)	№ Мышей	Конечная	
				точка обработки	Анализ
В/м (Активность)	mdx	1E+11	3	1 мес	ИФ, Н&Е
В/в (Эффективность)	mdx	2E+12	5	3 мес	ИФ, Н&Е, Диаф. Физ. ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг
В/в (Эффективность)	mdx	6E+12	8	3 мес	ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг
В/в (Эффективность)	mdx	1,2E+13	8	3 мес	ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат., Биораспределение, Вестерн-блоттинг ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат.
В/в (Эффективность)	C57BL/6	6E+12	5	3 мес	ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат.
В/в (Эффективность)	mdx	6E+12	5	6 мес	ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., ТА Физ., Пат.
В/в (Эффективность)	mdx	—	8	3 мес	ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., Пат.
В/в (Эффективность)	C57BL/6	—	6	3 мес	ИФ, Н&Е, Диаф. Физ., Пат.

ИФ: иммунофлуоресценция;

Н&Е: окрашивание гематоксилином и эозином;

Диаф./ТА Физ.: измерения удельной силы в диафрагме и мышце ТА;

Пат: формальная гистопатология;

"-": без инъекции.

Все животные, которым вводили инъекцию, обрабатывали в возрасте 4-5 недель и умерщвляли через 3 или 6 месяцев после инъекции. Контрольных мышей умерщвляли в возрасте 4 месяцев и 7 месяцев.

Животным, указанным в табл. 4, вводили в указанном возрасте (4-5 недель) инъекцию в хвостовую вену для системной доставки. Чтобы выполнить точную дозировку с помощью внутримышечной инъекции, животных кратковременно анестезировали ингаляцией изофлурана. Дозы вводили путем прямой инъекции в переднюю мышцу большеберцовой нижней задней конечности. Для точного дозирования при системной доставке анестезия не требовалась. Дозы вводились васкулярно через хвостовую вену. Были приняты меры для точного внесения всей дозы вектора в сосуд. После того как дозирование было выполнено, животных помещали на грелку до восстановления спонтанного движения, а затем возвращали в клетку. Наблюдения за каждым животным проводили еженедельно в течение всей продолжительности исследования.

В соответствующем возрасте, указанном в табл. 4, мышей передозировали смесью кетамин/ксилазин (200/20 мг/кг). Кровь собирали с помощью пункции сердца, и цельную кровь отправляли на полный анализ крови (CBC), а сыворотку хранили при -80°C до анализа химического состава сыворотки в лаборатории Charles Rivers. Затем ткани собирали и отправляли на анализ независимому ветеринарному гистопатологу и для хранения.

Внутримышечная доставка гAAVrh174.МНСК7.микродистрофин мышам с нулевым дистрофином при суммарной дозе 1×10^{10} вг приводила к ~70% экспрессии дистрофина в инъецированных мышцах ТА. Иммунофлуоресцентная визуализация мышцы, получавшей дозированный вектор, подтвердила экспрессию гена микродистрофина.

Восстановление экспрессии дистрофина после системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином.

Определение эффективности испытательного образца гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин достигали путем выполнения системных инъекций mdx-мышам (генотип: C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx/J}) с использованием эскалации дозы при низкой, средней и высокой дозе ($2,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы; $6,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы; $1,2 \times 10^{13}$ вг суммарной дозы) для оценки экспрессии трансгена и эффективности вектора при системной доставке в моменты времени 3 и 6 месяцев после инъекции. Мышам вводили инъекции в возрасте 4-5 недель, а полную аутопсию проводили через 3 и 6 месяцев после инъекции. Исходя из среднего веса животных в группе эти дозы равны 8×10^{13} , 2×10^{14} и 6×10^{14} вг/кг. Инъекция равного объема раствора Рингера с лактатом служила отрицательным контролем. Инъекция равного объема раствора Рингера с лактатом мышам C57BL/6 служила в качестве положительного контроля. Безопасность определяли путем выполнения системных инъекций мышам ДТ в дозе $6,0 \times 10^{12}$ вг суммарной дозы (обозначается как группа ДТ ТХ-средняя доза). Иммунофлуоресцентное окрашивание скелетных мышц передней большеберцовой мышцы (ТА), икроножной мышцы (GAS), квадрицепса (QUAD), ягодичной мышцы (GLUT), поясничной мышцы, трицепса (TRI), диафрагмы (DIA) и сердца проводили для определения восстановления дистрофина и для обеспечения эффективности вирусного вектора гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин.

Скелетные мышцы (ТА, QUAD, GLUT, TRI) были извлечены вместе с сердцем и диафрагмой для анализа. Органы были также удалены для токсикологических исследований и исследований биораспределения. Экспрессия трансгена микродистрофина оставалась высокой после 3-6 месяцев обработки. Это сопровождалось улучшением мышечной гистопатологии и улучшением функции без каких-либо побочных эффектов со стороны органов-мишеней.

Изменение дистрофического фенотипа у mdx-мышей, системно обработанных гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином.

Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) скелетных мышц, диафрагмы и сердца было проведено для определения изменения и улучшения дистрофической патологии после системного введения инъекции гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин в суммарной дозе 2×10^{12} вг (низкая доза; n=1) 6×10^{12} вг суммарной дозы (средняя доза; n=8) и $1,2 \times 10^{13}$ вг суммарной дозы (высокая доза; n=8) для каждой дозы с эвтаназией через 12 недель после инъекции. Через 24 недели после инъекции оценивали вторую когорту животных, обработанную средней дозой (6×10^{12} вг суммарной дозы), для выявления и улучшения патологии дистрофина (n=5).

Иммунофлуоресцентное окрашивание для белка микродистрофина человека использовали для определения экспрессии трансгена микродистрофина в левой и правой сторонах шести скелетных мышц (ТА, GAS, QUAD, GLUT, psoas, TRI), а также диафрагмы и сердца у всех мышей с нулевым дистрофином, которым вводили инъекцию вектора микродистрофина. Это было выполнено, чтобы определить восстановление дистрофина и обеспечить эффективность вирусного вектора гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин при 2×10^{12} вг суммарной дозы (низкая доза; n=2), 6×10^{12} вг суммарной дозы (средняя доза; n=8) и $1,2 \times 10^{13}$ вг суммарной дозы (высокая доза; n=8) для каждой дозы с эвтаназией через 12 недель после инъекции.

Чтобы оценить эффективность экспрессии и трансдукции, изображения всех трех дозирующих когорт и левой и правой сторон каждой мышцы были использованы для количественной оценки. Для каждой мышцы было получено четыре 20-кратных изображения, и для каждого изображения был определен процент положительных микродистрофиновых волокон, что привело к среднему проценту трансдукции для каждой мышцы. На фиг. 14 и 15 представлены репрезентативные изображения обработанных мышей средней дозой (6×10^{12} вг; 2×10^{14} вг/кг) и высокой дозой ($1,2 \times 10^{13}$ вг; 6×10^{14} вг/кг). Мыши с нулевым дистрофином, которым вводили инъекции раствора Рингера с лактатом и которые соответствовали по возрасту, были включены как отрицательный контроль, а мыши дикого типа, которым вводили инъекции раствора Рингера с лактатом, были включены как положительный контроль. Для сердца показано $\geq 75\%$ у всех проанализированных животных.

В мышцах необработанных животных обнаружена обильная миопатия, в том числе жировая инфильтрация, центральная нуклеация, фиброз и очаговые области некроза. Окрашивание H&E на фиг. 16 и 17 иллюстрирует этот дистрофический фенотип у мышей с нулевым дистрофином по сравнению с нормальными мышами ДТ и улучшение мышечной патологии после обработки средней дозой (6×10^{12} вг; 2×10^{14} вг/кг) или высокой дозой ($1,2 \times 10^{13}$ вг; 6×10^{14} вг/кг). Количественная оценка гистологических параметров показала снижение центральной нуклеации (фиг. 18) и нормализацию среднего диаметра волокна (фиг. 16 и 17) у обработанных мышей во всех мышцах в зависимости от дозы. Окрашивание сириусом красным продемонстрировало снижение отложения коллагена в диафрагме как в когорте со средней, так и с высокой дозами по сравнению с необработанными (mdx LR) когортами (фиг. 19).

Функциональная оценка системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином.

Чтобы определить, обеспечивает ли перенос гена микродистрофина функциональную силу поврежденной мышце, оценивали функциональные свойства как диафрагмы, так и передней большеберцовой мышцы у mdx-мышей, мышей ДТ и мышей, которым вводили вектор, при трех уровнях дозы. Повышение дозы включало низкую дозу (8×10^{13} вг/кг), среднюю дозу (2×10^{14} вг/кг) и высокую дозу (6×10^{14} вг/кг). Функциональная оценка системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином с использованием оценки удельной силы *ex vivo* и снижения выходной силы после эксцентрических сокращений в ТА была использована через 24 недели после инъекции у животных, которым системно вводили инъекции гAAVrh74.МНСК7.микро дистрофина в дозе 6×10^{12} вг (средняя доза). Кроме того, удельная сила выхода в диафрагме была оценена у тех же животных.

Как показано на предыдущих фигурах, гистопатология демонстрировала более нормализованную среду с улучшениями в центральной нуклеации, отложении коллагена и размере волокон при средних и высоких дозах. Доставка в хвостовую вену гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин привела к постепенному улучшению удельной силы выхода в диафрагме (176,9 мН/мм² в группе со средней дозой в сравнении с 227,78 мН/мм² в группе с высокой дозой). Кроме того, долгосрочно обрабатываемая группа представляет мышью через 6 месяцев после инъекции (средняя доза 2×10^{14} вг/кг), и не было отклонений при долгосрочном выходной силе в диафрагме (176,9 мН/мм² в сравнении с 194,9 мН/мм²) (фиг. 20).

Кроме того, функциональный дефицит в передней большеберцовой мышце у mdx-мышей наблюдался по сравнению с мышами ДТ. Mdx-мышцы продемонстрировали снижение выходной силы на 50% по сравнению с мышами ДТ (171,3 мН/мм² в сравнении с 291,65 мН/мм²) и большую потерю силы после эксцентрических сокращений (32% потери в mdx; 5% потери в ДТ). Системная доставка средней дозы гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин приводила к 65,5% дистрофина в передней большеберцовой мышце и восстановлению удельной выходной силы, которая улучшилась до 235,4 мН/мм² и защищала мышцу от повреждения при повторном эксцентрическом сокращении только при уменьшении силы на 25% (фиг. 21). Группа ДТ средняя доза представляет обработанную группу дикого типа, чтобы продемонстрировать отсутствие токсичности и поддержание функциональных результатов, измеренных после обработки вектором.

Сущность изобретения

После первоначальной демонстрации биоактивности путем внутримышечной инъекции было достигнуто сопоставимое или повышенное восстановление микродистрофина при вазиккулярной доставке при трансдукции скелетных мышц, диафрагмы и сердца. Эффективность продемонстрировала изменение дистрофических признаков в зависимости от дозы путем уменьшения воспаления, уменьшения количества вырождающихся волокон и улучшения функционального восстановления за счет защиты от эксцентрических сокращений в передней большеберцовой мышце и диафрагме. Функциональные преимущества вектора включают поэтапное улучшение до уровней дикого типа при генерации силы в диафрагме и ТА.

Пример 9 Токсикология и биораспределение системной обработки гAAVrh74.МНСК7.микродистрофином.

Органы и ткани mdx-мышей, которым системно вводили инъекцию гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, собирали для количественной ПЦР в реальном времени для выявления специфических последовательностей ДНК вектора. Белок, извлеченный из всех собранных органов и тканей, использовали для вестерн-блоттинга для обнаружения микродистрофина в органах, не являющихся мишенями.

В испытательный образец вводили три уровня дозы: низкую (2×10^{12} вг; 8×10^{13} вг/кг), среднюю (6×10^{12} вг; 8×10^{14} вг/кг) и высокую дозу ($1,2 \times 10^{13}$ вг; 6×10^{14} вг/кг) внутривенным путем в возрасте 4-5 недель. Чтобы оценить безопасность вектора, проводили окрашивание H&E на криосрезах мышечной ткани и всех основных органов, собранных у тех же самых групп мышей, которые были описаны ранее. Также были включены органы и мышцы мышей C57BL6 ДТ, которых системно обрабатывали вектором при средней дозе. Обработанные раствором Рингера с лактатом mdx-мышцы и мышцы ДТ также были включены для гистопатологического анализа. Эти срезы были официально проверены на токсичность сторонним сертифицированным ветеринарным патологоанатомом, и ни в одной из проб мышей не было обнаружено никаких побочных эффектов; результаты приведены ниже.

Детали группы и план исследования показаны ниже.

Таблица 5

План исследования безопасности гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин

Путь доставки	Штамм животных	Суммарная доза (вг)	Количество мышей	Конечная точка обработки	Номер отчета о патологии
Внутривенно	mdx	2×10^{12}	5	3 мес	AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.1
Внутривенно	mdx	6×10^{12}	7	3 мес	AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.1/001.2
Внутривенно	mdx	1.2×10^{13}	8	3 мес	AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.2
Внутривенно	C57BL/6	6×10^{12}	5	3 мес	AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.2
Внутривенно	mdx	6×10^{12}	5	6 мес	AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.3
Внутривенно	mdx	—	8	3 мес	AAVrh74–mdx–МЫШЬ–001.2
Внутривенно	C57BL/6	—	6	3 мес	AAVrh74–
					mdx–МЫШЬ–001.2

Гистопатологический обзор трансдуцированной вектором ткани.

В/в инъекция гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин не выявила каких-либо микроскопических изменений в миофибриллах каких-либо исследованных скелетных мышц. Кроме того, никаких повреждений, связанных с обработкой, не было обнаружено ни в одной из тканей, оцененных гистологически. Любые отмеченные изменения наблюдались как у обработанных, так и у контрольных мышечных образцов и считались случайными результатами. Взятые вместе, эти данные указывают на то, что этот испытательный образец хорошо переносился испытуемыми. Кроме того, по сравнению с контрольными образцами от неопознанных по возрасту, необработанных mdx-мышей, введение гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин уменьшало атрофию миофибрила у обработанных mdx-мышей, показывая, таким образом, что испытательный образец может улучшить степень миопатии, связанной с дефицитом mdx.

В дополнение к обзору заболевших mdx-мышей, систематически обработанных вектором, гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин системно доставляли пяти мышам ДТ C57BL/6 в дозе, идентичной минимально эффективной дозе (MED), установленной в исследованиях выше для mdx-мышей, 6×10^{12} вг суммарной дозы (2×10^{14} вг/кг). Это позволило при исследовании внутривенной доставки испытуемого изделия у здоровых мышечных образцов более точно определить, являются ли какие-либо побочные эффекты исключительно результатом лечения. В данном документе снова были собраны различные скелетные мышцы, включая диафрагму, а также сердце и пять других органов, и срезы H&E каждой ткани были формально рассмотрены независимым ветеринарным патологоанатомом.

Биораспределение генома вектора.

Наличие специфических последовательностей ДНК испытательного образца исследовали с использованием количественного ПЦР-анализа в реальном времени (кПЦР). Анализ биораспределения проводили на образцах ткани, собранных у mdx-животных, получавших три дозы вектора согласно уровню дозы. Положительным сигналом было что-либо, равное или превышающее 100 копий одноцепочечных ДНК/мкг обнаруженной геномной ДНК. Ткани собирали при аутопсии и использовали наборы векторно-специфических праймерных зондов, специфичных для последовательностей промотора МНСК7. На фиг. 22 и в табл. 6 ниже представлены копии векторного генома, обнаруженные в каждом образце ткани у мышей, которым инъецировали гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин.

Таблица 6

Количество копий генома вектора в органах и мышцах от mdx-мышей, получавших три дозы вектора согласно уровню дозы

Ткань	2,00E+12	6,00E+12	1,20E+13
	(среднее количество копий вг/мкг)	(среднее количество копий вг/мкг)	(среднее количество копий вг/мкг)
Сердце	2,84E+04	7,65E+05	5,35E+06
Легкое	3,14E+04	2,52E+05	1,49E+06
Печень	4,36E+04	1,11E+07	1,80E+07
Почка	1,96E+04	3,27E+05	1,06E+06
Селезенка	5,69E+04	5,27E+05	5,78E+05
Гонада	5,74E+04	3,68E+04	3,50E+05
Диафрагма	2,22E+04	3,55E+05	2,32E+06
Поясничная мышца	1,28E+05	1,60E+05	1,57E+06
Трицепс	1,60E+05	5,45E+05	2,50E+06
Квадрицепс	2,66E+06	6,57E+05	2,29E+06
Икроножная мышца	1,69E+05	5,80E+05	2,93E+06
Передняя большеберцовая мышца	5,86E+05	1,25E+05	1,32E+06

Значения приведены в вг/мкг геномной ДНК.

Транскрипт гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин был обнаружен в разных уровнях во всех собранных тканях. Как и ожидалось, самые высокие уровни были отмечены в скелетных мышцах и сердце. Самые низкие уровни были обнаружены в гонаде, легких, почках и селезенке. Эти данные указывают на то, что испытательный образец эффективно доставлялся во все исследуемые ткани мышей, которым вводили вектор.

Как показывают результаты кПЦР, приведенные выше, внутривенная доставка гAAVrh74.МНСК7.микродистрофин привела к распределению транскрипта вектора в разных уровнях в большинстве тканей, причем самые высокие уровни наблюдаются в печени, сердце и мышце квадрицепса (средняя доза) и печени, сердце и икроножной мышце (высокая доза). Следовательно, целью этой части исследования было определение экспрессии белка трансгена микродистрофина человека в указанных тканях для обеспечения функциональности специфического для мышц промотора МНСК7. Вестерн-блоттинг использовали для выявления экспрессии микродистрофина в образцах ткани.

Экспрессию белка и биораспределение вектора также оценивали с использованием кПЦР и вестерн-блоттинга (фиг. 23), и эти данные указывают на нормальные уровни вектора в сторонних органах и минимальное обнаружение белка микродистрофина в печени, обработанной высокой дозой. Эти результаты коррелировали с отсутствием токсичности в печени, как определено патологоанатомом. Кроме того, химические составы сыворотки были проанализированы независимыми CRO (Charles River Laboratories), которые указывают нормальные значения во всех проанализированных химических составах. Было три аномальных значения в ферменте печени AST, 2 из которых были продемонстрированы в группе mdx-LR и 1 из которых в группе средней дозы (фиг. 23). Подгруппа животных подверглась анализу креатинкиназы (СК), однако образцы были проанализированы до и после физиологической оценки. Анализ сыворотки подтверждает отсутствие токсичности после доставки испытательного образца.

Экспрессия белка микродистрофина наблюдалась в разных количествах во всех образцах скелетных мышц, а также в образцах сердца (фиг. 24). Тем не менее было обнаружено минимальное количество белка в печени в когортах с высокой дозой. Считается, что это доброкачественный результат, и, возможно, присутствие в печени обусловлено экспрессией в гладких мышцах печени. Важно отметить, что не

было никаких неблагоприятных гистопатологических эффектов в печени, отмеченных в отчете независимого патологоанатома.

Гистопатологический обзор показал, что в когорте mdx-LR обнаружена широко распространенная миопатия, затрагивающая все семь оцениваемых скелетных мышц, а также стенку правого желудочка сердца. Основные результаты гистопатологического обзора включали выраженную и обильную атрофию миофибрилл (30-75% нормального размера миофибрилл), минимальное или легкое воспаление мононуклеарных клеток, увеличение интерстициального пространства и увеличение цитоплазматических минеральных отложений. Диафрагма демонстрирует наиболее заметные изменения в инфильтрации мононуклеарных клеток и атрофии миофибрилл. Сердце демонстрирует несколько небольших очагов минимального накопления мононуклеарных клеток в миокарде желудочков. Когорты, которым вводили вектор, имели значительно уменьшенную миопатию во всех тканях скелетных мышц и сердце. Снижение гистопатологических результатов происходило в зависимости от дозы, в то время как группа с высокой дозой имела значительно меньшую дегенерацию и воспаление. Не было никаких побочных эффектов из-за обработки вектором gAAVrh74.МНСК7.микродистрофин, как было задокументировано в обработанной когорте ДТ, и в mdx-когорте, которой вводили дозу вектора. Были случайные находки в печени и легких у mdx-мышей и мышей ДТ независимо от обработки, при которой у мышей наблюдалась легкая вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов. Следовательно, испытательный образец был безопасным, эффективным, а защитный эффект зависел от дозы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вектор AAVrh74, содержащий в направлении от 5' к 3' инвертированный концевой повтор (ITR), специфический для мышц контрольный элемент МНСК7; химерную интронную последовательность SV40, нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, поли А-хвост и ITR, где специфический для мышц контрольный элемент МНСК7 функционально связан с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

2. Рекомбинантный вектор AAVrh74 по п.1, дополнительно содержащий химерную интронную последовательность, которая находится между указанной нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 и указанным специфическим для мышц контрольным элементом МНСК7, причем химерная интронная последовательность представлена в виде нуклеотидов 1046-1195 SEQ ID NO: 3.

3. Рекомбинантный вектор AAV по п.1 или 2, где поли А-хвост находится в 3' указанной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, причем последовательность указанного поли А-хвоста представлена как нуклеотиды 4787-4842 SEQ ID NO: 3.

4. Рекомбинантный AAVrh74 по п.1, содержащий нуклеотиды 7-5042 SEQ ID NO: 3.

5. Композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAVrh74 по любому из пп.1-4, для увеличения мышечной силы или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

6. Композиция, содержащая рекомбинантный вектор AAVrh74 по любому из пп.1-4, для лечения мышечной дистрофии.

7. Композиция по п.6, в которой мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна.

8. Композиция по любому из пп.5-7, составленная для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

9. Композиция по любому из пп.5-8, составленная для системного введения.

10. Композиция по любому из пп.8 или 9, составленная для парентерального введения путем инъекции, инфузии или имплантации.

11. Применение рекомбинантного вектора AAV по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для увеличения мышечной силы или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

12. Применение рекомбинантного вектора AAV по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии.

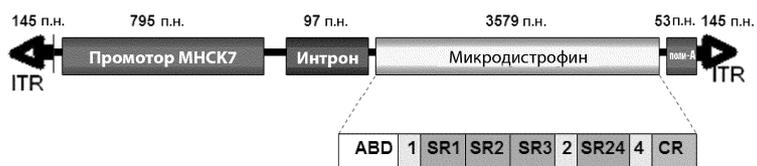
13. Применение рекомбинантного вектора AAV по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для уменьшения или предотвращения фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

14. Применение по любому из пп.11-13, в котором мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна.

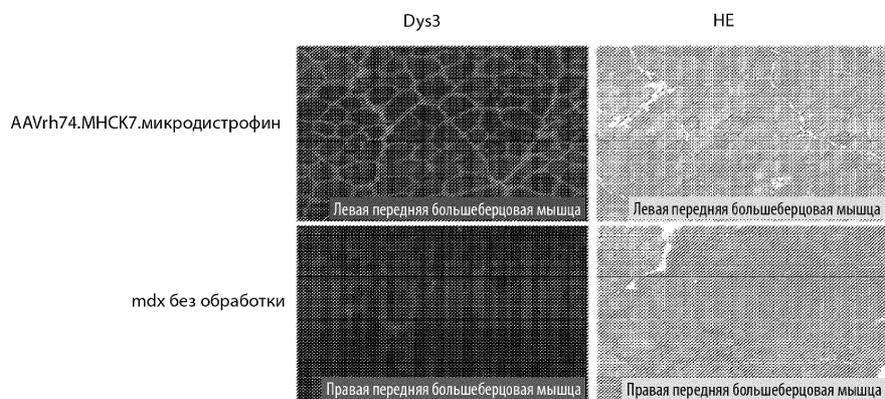
15. Применение по любому из пп.11-13, в котором лекарственное средство составлено для внутримышечного или внутривенного введения.

16. Применение по любому из пп.11-13, в котором лекарственное средство составлено для системной доставки.

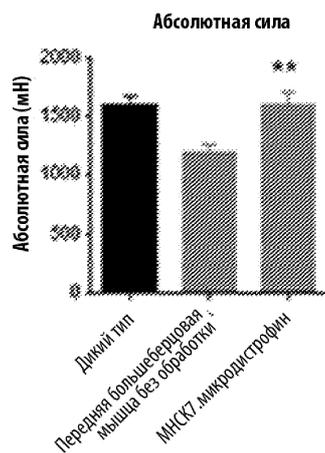
17. Применение по п.16, в котором лекарственное средство составлено для парентерального введения путем инъекции, инфузии или имплантации.



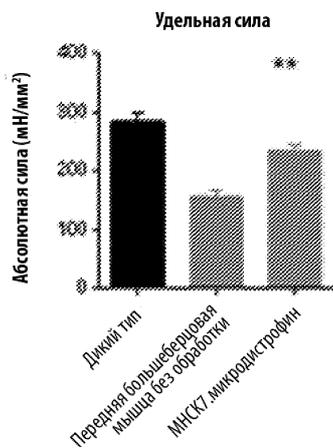
Фиг. 1



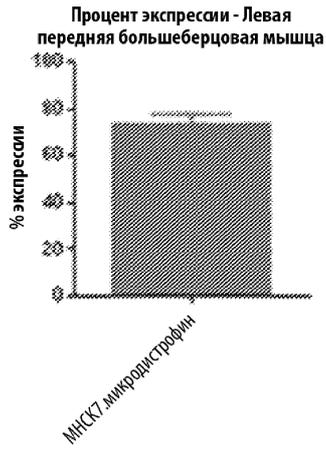
Фиг. 2



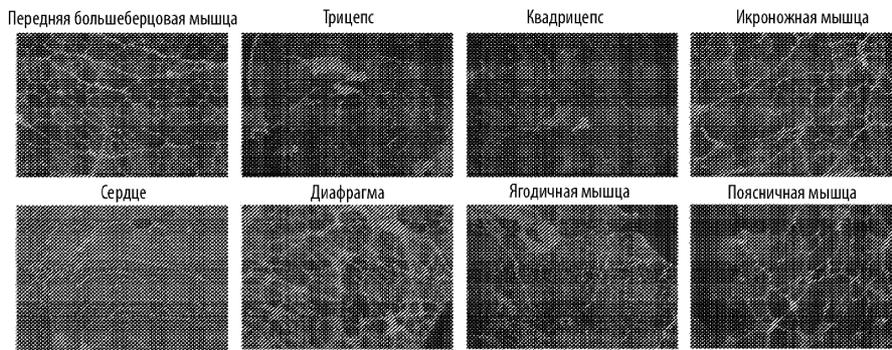
Фиг. 3А



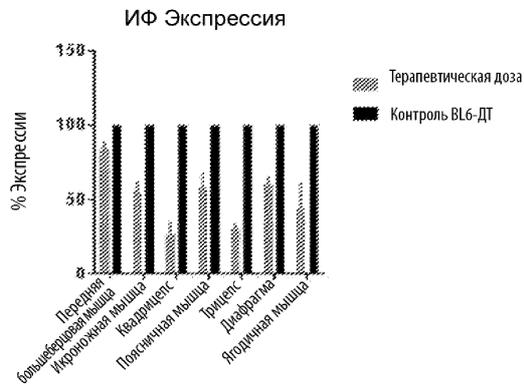
Фиг. 3В



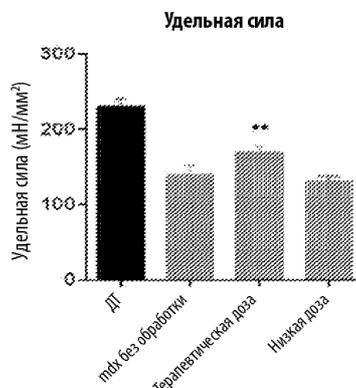
Фиг. 3С



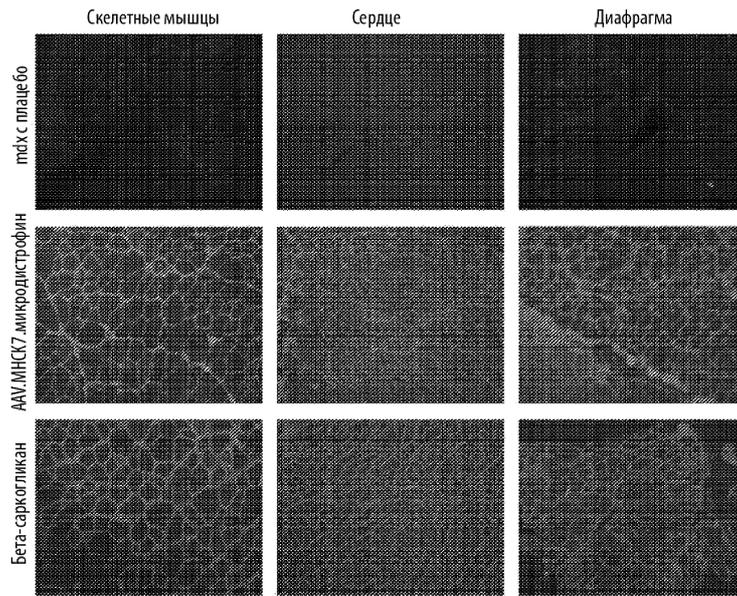
Фиг. 4А



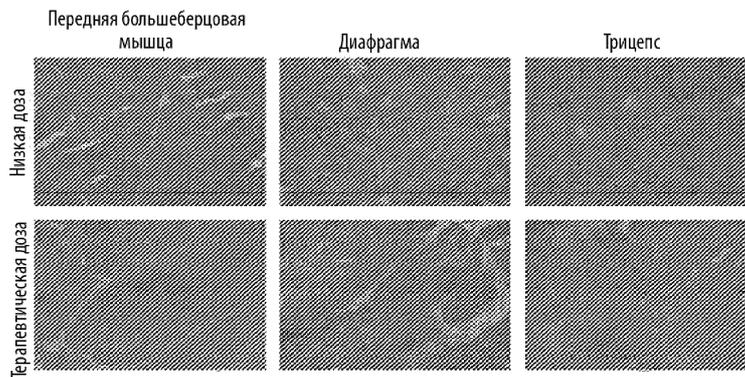
Фиг. 4В



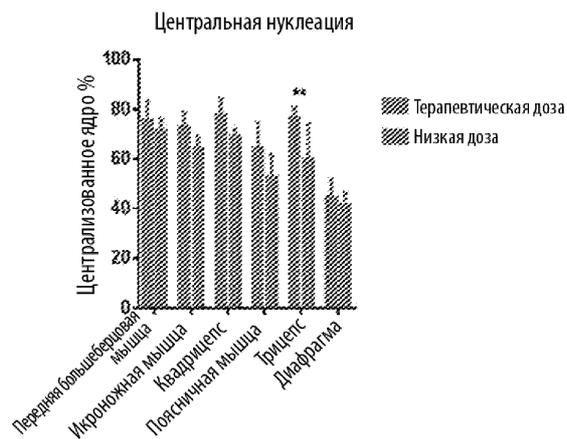
Фиг. 4С



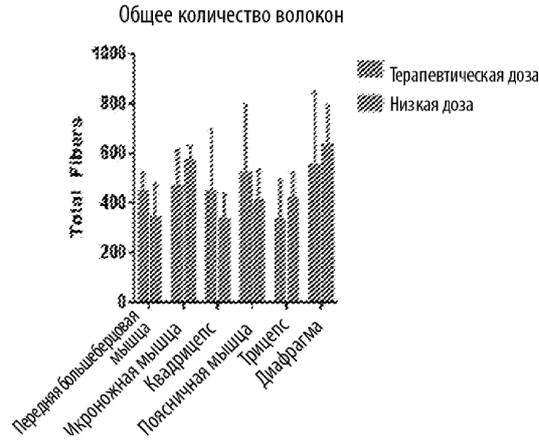
Фиг. 5



Фиг. 6А



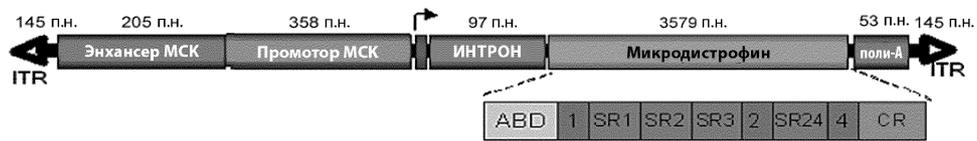
Фиг 6В



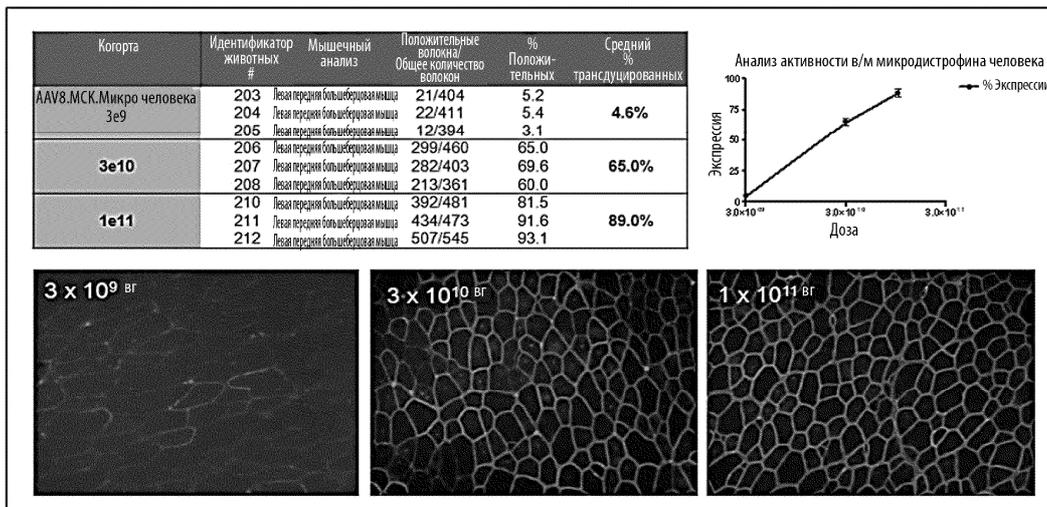
Фиг. 6С



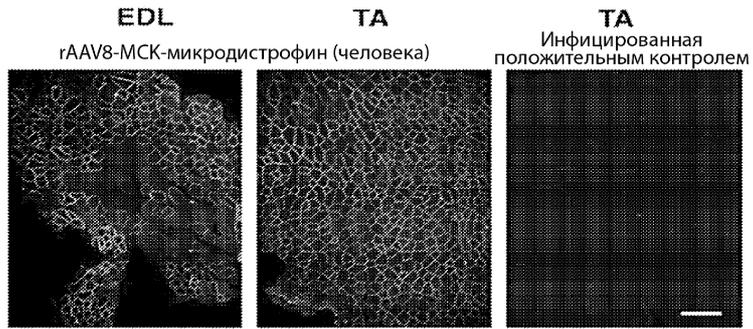
Фиг. 6D



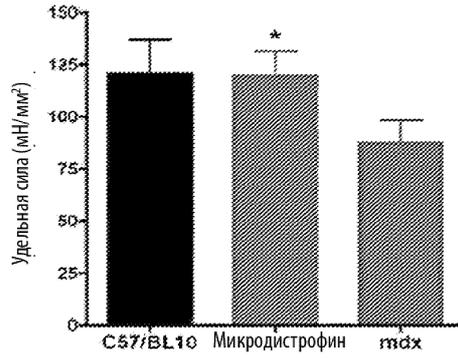
Фиг. 7



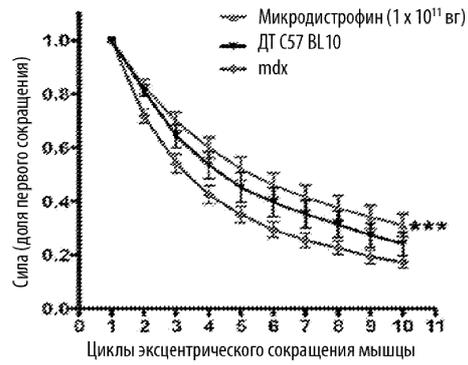
Фиг. 8



Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9С

GGAAGTGGTGAAGGATCAGTTCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGGG
GCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAACTGATCGGCACCGGAACTGAGTGAGGACGA
GGAAACAGAAGTGACAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCTGGAGTGTCTGAGAGTGGCTA
GTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTCTGATGGACCTGCAGAACCAAGAACTGAAAGAGC
TGAACGACTGGCTGACAAAGACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCC
GACCTGGAGGATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGA
GCAGGTGCGGGTGAACCTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGC
CACCGCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGGGCCAACATTTGCCGGTGA
CCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAG
TGCTCTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTA
AGGATCAGAACGAAATGCTGTCTAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAA
AGAAGCAGAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCCTGAAGAACAAGA
GCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGACAACTGGTGAGAA
AACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCTAGCCTGACCCAGAC
AACCGTATGGAACCGTGACCACCGTGACAACCCGGAACAGATCCTGTTGAACATGCCAGGA
AGAGCTGCCACCTCCACCTCCCAGAGAAGAGAACCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGC
CACTGACGAACCTGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGTCTTGGCAGCCTGTGGG
CGATCTGCTGATTGATTCCTGCAGGACCACTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGGCGAAATTTGCT
CCACTGAAGGAGAACCTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAG
CTGAGCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCT
GTGGAAGACCGGGTGCAGCAGTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAAGCCAGCCAGCACTTT
CTGAGCACATCCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCAACAAGGTGCCCTACTATAITTA
ATCACGAGACCCAGACCACTTGTGGGACCATCCAAGATGACAGAAGTGTACCAGTCCCTGGCCGA
CTGAAACAACGTGAGGTTTTAGCGCTTACAGAACCCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCT
GTGCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCGCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAAC
GATCAGCAATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGG
AGCACAACAACCTGGTGAACGTGCCCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGTAACGTGTA
TGACACTGGGCGCACCGGCCGATCAGAGTGTGAGTTTTAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAG
GCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTGTGACC
AGCGCCGCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTA
GTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCCGAGCTGTTCCAGTTTGCCAATAACAACCTGA
AATCGAGGCTGCTGTTCTGGATTGGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCCTGTG
CTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGT
CCCATTATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTCTTT
TCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGAATATTGCACCCCAACTACAT
CTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAAGAGGTACTIONG
CAAGCACCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGACAGAGTCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGA
TACAATGTGAGCGGCCGCAATAAAAAGATCTTTATTTTATTAGATCTGTGTTGTTTTTTGTGTG
CTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGA
TGGAGTTGGCCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAAGGTGCCCCG
ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCACTGAGCGAGCGAGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAA
GAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTCCAGACG
ATTGAGCGTCAAAATGTAGGATTTCCATGAGCGTTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGTAATATTGT
TCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGTGTTCTTACTCAGGCAAGTGTATTACTAATC
AAAGAAGTATTGCGACAACGGTAAATTTGCGTGTGACAGACTCTTTACTCGGTGGCCTCACTGA

Фиг. 10 (продолжение)

TTATAAAACACTTCTCAGGATTCTGCGCTACCGTTCTCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCCTCTGTT
 TAGCTCCCCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGC
 GCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC
 CAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTCGCTTCTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCCGGGCTTCCCGGT
 CAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTAGTGATTTACGGCACCTCGACCCCAAAA
 ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTACGT
 TGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTGTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTC
 TATCTTTTGATTATAAGGGATTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAA
 AAAATTAACCGCAATTTAACAAAAATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTATACAATCTTCTGT
 TTTTGGGGCTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCA
 TCGATTCTTGTGTCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACTCTCAAAAAT
 AGCTACCTCTCCGGCATGAATTTACAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTGACTG
 TCTCCGGCTTCTCACCCTTTGAATCTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAAATATG
 AGGGTTCTAAAAATTTTATCCTTGCCTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCAT
 AATGTTTTTGGTACAACCGATTAGCTTATGCTCTGAGGCTTATTGCTTAATTTTGCTAATCTTTGC
 CTGCGCTGATGATTTATTGGATGTTGGAAGTCTCTGATGCGGTATTTTCTCTACGCATCTGTGCGG
 TATTTACACCCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCC
 GACACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACA
 AGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGATGTGTGACAGGTTTTACCGTCATACCGAAACCGCGGAGA
 CGAAAGGGCCTCGTATACGCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTCTTAGACGTC
 AGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATCAAATA
 TGATATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAGGAAAGATAGAG
 TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCA
 GAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTG
 GATCTCAACAGCGGTAAGATCTTGGAGTTTTTCCCGCAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT
 TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGC
 ATACACTTCTCAGAACTGCTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCAT
 GACAGTAAGAGAAATTGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTG
 ACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCC
 TTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGATGCGCTG
 TAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAA
 TTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT
 GGTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGCTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCAGCTGGGGCC
 AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTACAGGCAACTATGGATGAACG
 AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTAC
 TCATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT
 GATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAA
 GATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGTTGCAACAAAAAACCAC
 CGCTACCAGCGGTGGTTTGTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTT
 AGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT
 CTGTAGCACCAGTACATACCTCGCTCTGTAATCCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG
 TCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACG
 GGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGT
 GAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
 GGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGT
 CGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGGATTTTGTGATGCTGTCAGGGGGGGCGGAGCTATGG
 AAAACGCCAGCAACCGCGCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTCACATGTTCTTT
 CCTGCTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGGGTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCG
 CAGCCGAACGACCGGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

Фиг. 10 (продолжение)

SEQ ID NO: 5

rAAVrh74.MSK.микродистрофин

Основные признаки:

Промотор MSK

Химерная интронная последовательность

Кодон-оптимизированная последовательность микродистрофина человека

Хвост поли-А

Устойчивость к ампициллину

Каркас плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCCGCGCTCGCTC
GCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGCCTCAGTGAG
CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGATGTTAATGATTAA
CCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGCCATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAG
GAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCCC
CCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCACCCCGGTGCCTGGGCTTAGGCTCTGTACACCATGG
AGGAGAAGCTCGCTCTAAAATAACCTGTCCCTGGTGGGCTGTGGGGACTGAGGGCAGGCTGTA
ACAGGCTTGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGG
CGAAGGGCCAGCTGTCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAAGTGCAGCAAGTCAG
CCTTGGGGCAGCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCGGGGTGGGCA
CGGTGCCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCTCCCTGGGGACAGCCCTCC
TGGCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCCGGGTACCA
CCACCTCCACAGCACAGACAGCACTCAGGAGCCAGCCAGCCAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTT
ATTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGTCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCCTTACT
TCTAGGCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGCCACCA
TGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGAAGAAGACTTTTACC
AAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGC
AGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAG
GGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAAC
GTGGATCTGGTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAACTGACACTGGGCCTG
ATCTGGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGCTGCAG
CAGACCAATCCGAGAAGATCCTGCTGCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGCAACTATCCCAGGTGA
ACGTGATTAACCTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAG
GCCTGATCTGTTGACTGGAATAGCGTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAAACATGCC

Фиг. 11

TTCAATATCGCTCGGTACCAGCTGGGGATCGAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACTACAT
ACCCAGATAAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTAAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGTCT
ATTGAAGCCATTTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCGCCCCCAAGTGAAGTAAAGAGGAGCAITTTTC
AGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCAC
CAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCTACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACCTAGCGAC
CCTACTAGATCCCCCTTTCCATCCAGCACCTGGAGGCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCT
GATGGAAAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGC
TGAGTCTGAAGACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGTGAAGGATC
AGTTCCACACACAGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACAGGGGGCGGTGGGCAATATCC
TGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGAAACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTCAG
GAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGAGAAGCAGTCC
AACTGCACCGGGTCTAAACTGATCGGCACCGGAAACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTCAG
AAGACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACTGGAGGATCTGAA
GAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGTGCGGGTGAATC
CCCTGACACATATGGTGGTGGTGGGACGAATCTAGTGGAGATCACGCCACCGCCCTGGAGG
AACAGCTGAAGGTGCTGGGGACCGGTGGGCCAACATTTGCCGTGGACCGAGGACAGGTGGGTG
CTGCTGCAGGACATCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTTTTGTGCTGG
CTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGCTTTAAGGATCAGAACGAAATG
CTGTCTAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCAGAGCATGGGC
AAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCTGAAGAACAAGAGCGTGACCCAGAAGACA
GAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCGCTGCTGGGACAACCTGGTGCAGAACTGGAGAAAAGTACA
GCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGTGAAACCG
TGACCACCGTGACAACCCGGAACAGATCCTGGTGAACATGCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACC
TCCCAGAAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAACTGGACC
TGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGTCTTGGCAGCCTGTGGCGATCTGCTGATTGATT
CCCTGCAGGACCCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGGGCAAATTTGCTCCACTGAAGGAGAAGC
TGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCATACAATCT
GAGCACACTGGAGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGACCGGGTGC
GGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGCA
GGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGTGCCCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACC
ACTTGTGGGACCATCCAAGATGACAGAAGTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGT
TTAGCGTTACAGAACCCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTCCCTGGATCTGCTGTC
CCTGTCCGCCCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATC
CTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAACAACCTGGTGA

Фиг. 11 (продолжение)

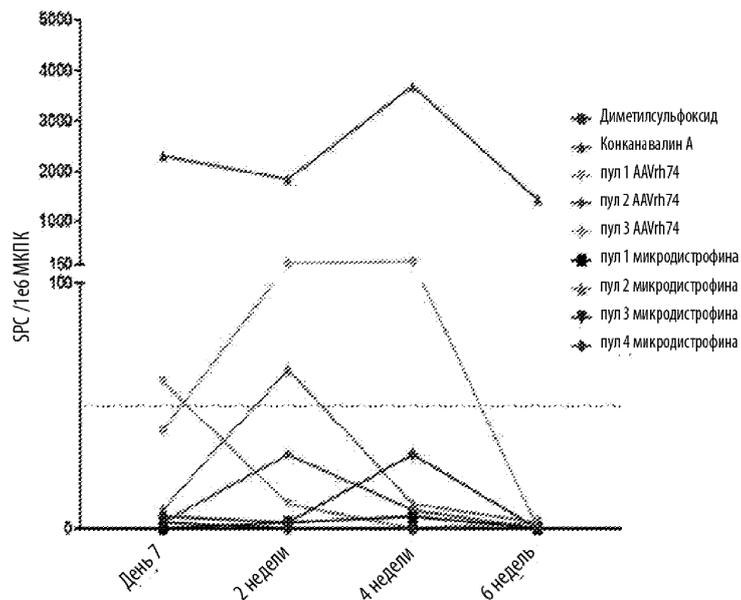
ACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACACTGGGCGCACCGG
CCGGATCAGAGTGTGAGTTTTAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAGGCCACCTGGAGGACAAG
TACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTGTGACCAGCGCCGCTGGGACTGC
TGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACAT
CGAACCCAGCGTGCAGCTGTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTGTGTTCC
TGGATTGGATGCGCCTGGAACACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCG
CCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGCCATTATCGGCTTTCGCTA
CAGGAGTCTGAAACATTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTCCGGAAGAGTGGCCAAA
GGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGGAAATTTGCACCCCACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCG
ATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAAGAGTACTTCGCCAAGCACCCCGCATGGG
GTATCTGCCAGTGCAGACAGTGTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGTGAGCGGCCG
AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCTAGAGCATGGCTACGTA
GATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT
CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGTGCGCCGACGCCGGGCTTTGCCCG
GGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGC
CCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTTCAGACGATTGAGCGTCAAATGTAG
GTATTTCCATGAGCGTTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAG
GCCGATAGTTTGAGTTCTTACTACAGGCAAGTGATGTTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAAC
GGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGG
ATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTAATCGGCCCTCCTGTTAGCTCCCGCTCTGATTCTA
ACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAA
GCGCGGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTC
CTTTGCTTTCTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCAAATCGGGGGT
CCCTTAGGGTCCGATTTAGTGATTTACGGCACCTCGACCCAAAAAATGATTAGGGTGATGGTT
CACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAT
AGTGGACTCTTGTCCAACCTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGG
ATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAACAAAAATTAACGCGAATTTAA
CAAAATATAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCTGTTTTTGGGGCTTTCTGATTA
TCAACCGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCATCGATTCTCTGTTGTCTCC
AGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAGTACCCTCTCCGGCATG
AATTTATCAGCTAGAACGGTGAATATCATATTGATGGTGATTGACTGTCTCCGGCCTTTCTACCCC
GTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAAATATAGAGGGTTCTAAAAATTTTA
TCCTTGCCTTAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGTACAACCG
ATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATCTTTGCCCTGCTGATGATTTAT

Фиг. 11 (продолжение)

GGATGTTGGAAGTTCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATG
GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACCCCGCAACACCCG
CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGG
GAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGAT
ACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTATGATAATAATGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGG
GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAATAACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC
AATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC
GCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCGAAGAACGCTGGTGAAGTA
AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCCGTAAG
ATCCTTGAGAGTTTTGCCCGAAGAACGTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG
CGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGCAACTCGGTCCGCGCATACACTATTTCTCAGAAT
GACTTGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
GCAGTGCTGCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGCAACTGCGGCCAAGTACTTCTGACAACGATCGGAGGACC
GAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCACAACATGGGGATCATGTAAGTCCGCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACG
TTGCGCAAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAAGACTGGATGGA
GGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGTGTATTGCTGATAAAA
TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGAT
TGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAA
AATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT
GAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTT
TGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAC
CAAATACTGCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTGTAGCACCCGGTACA
TACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTT
GGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC
AGCCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAG
CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCACCTCT
GACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACG
CGGCCTTTTACGGTTCCTGCCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGA
TTCTGTGGATAACCGTATTACCGGGTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAG
CGCAGCGAGTCAGTGACGACCAAGCGGAAGAGC

Фиг. 11 (продолжение)

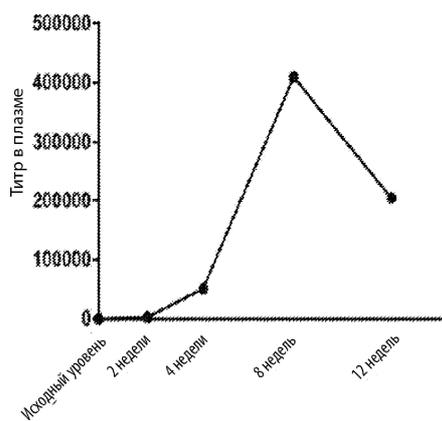
ОБЩИЙ 13-176



Дни после переноса гена

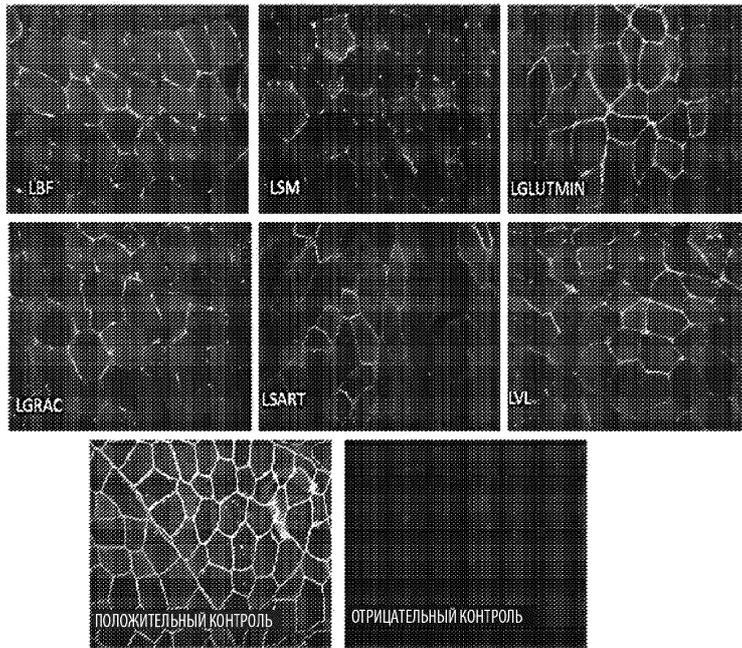
Фиг. 12А

В-клеточный ответ 13-176

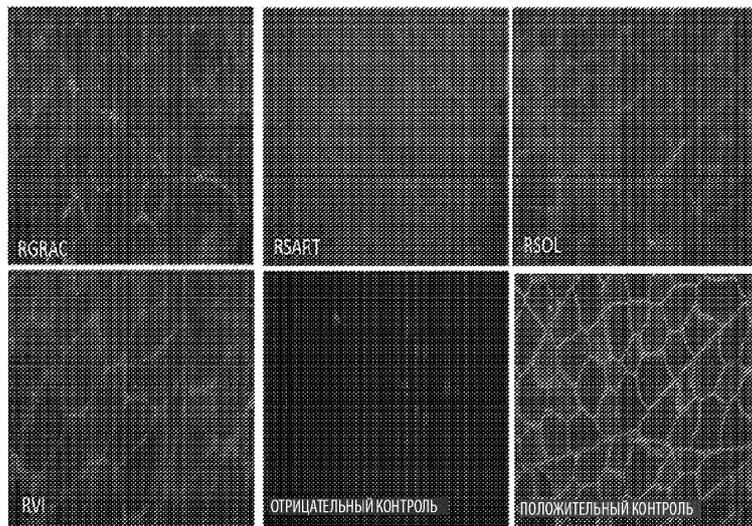


После переноса гена

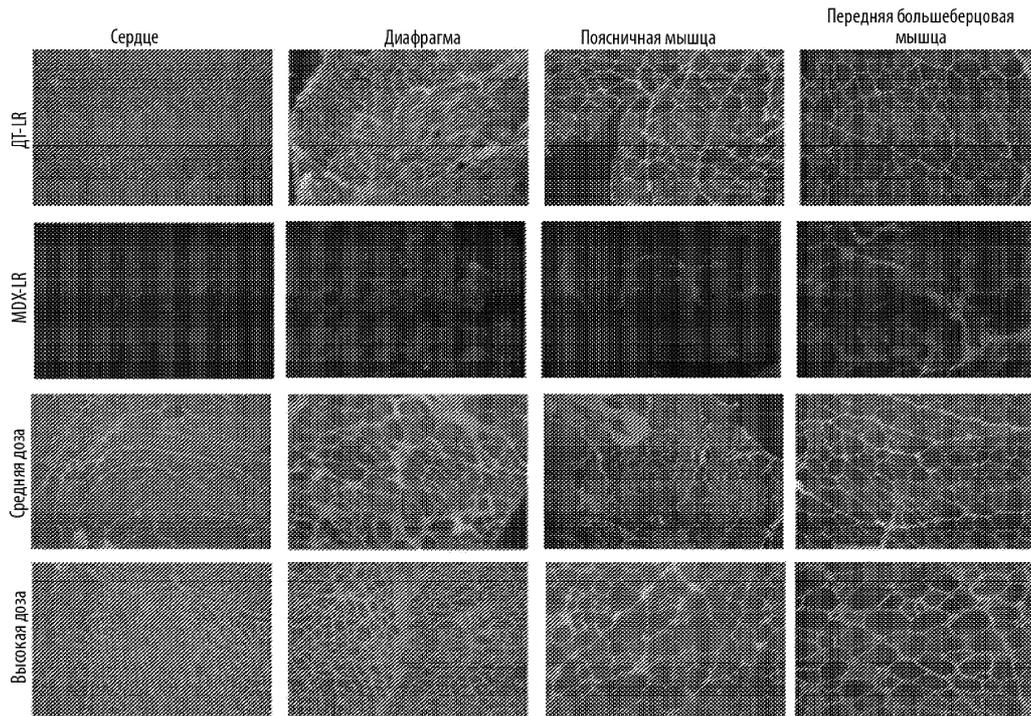
Фиг. 12В



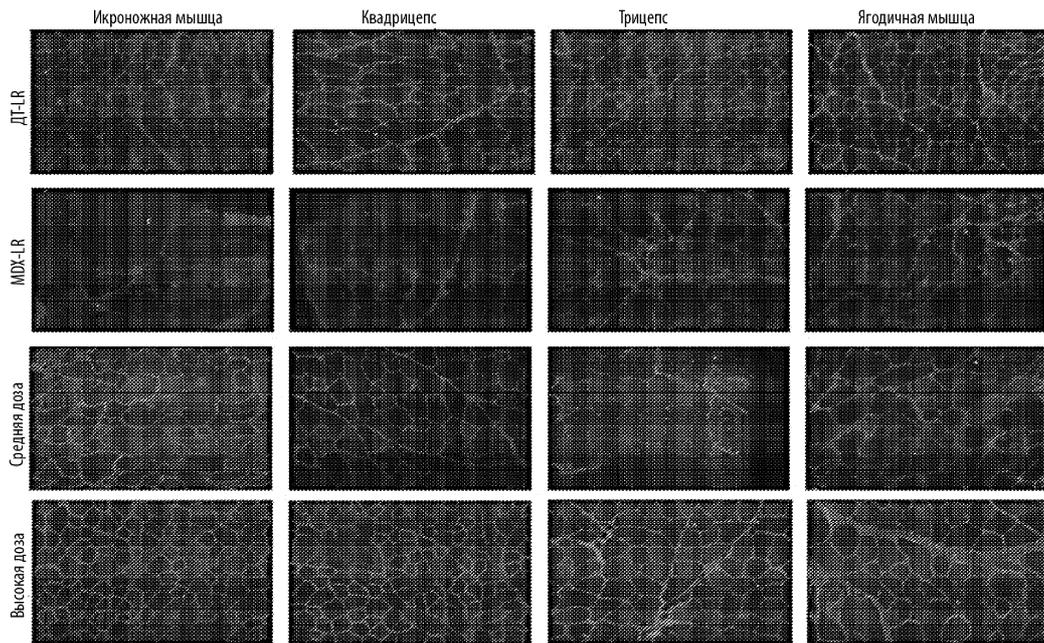
Фиг. 13А



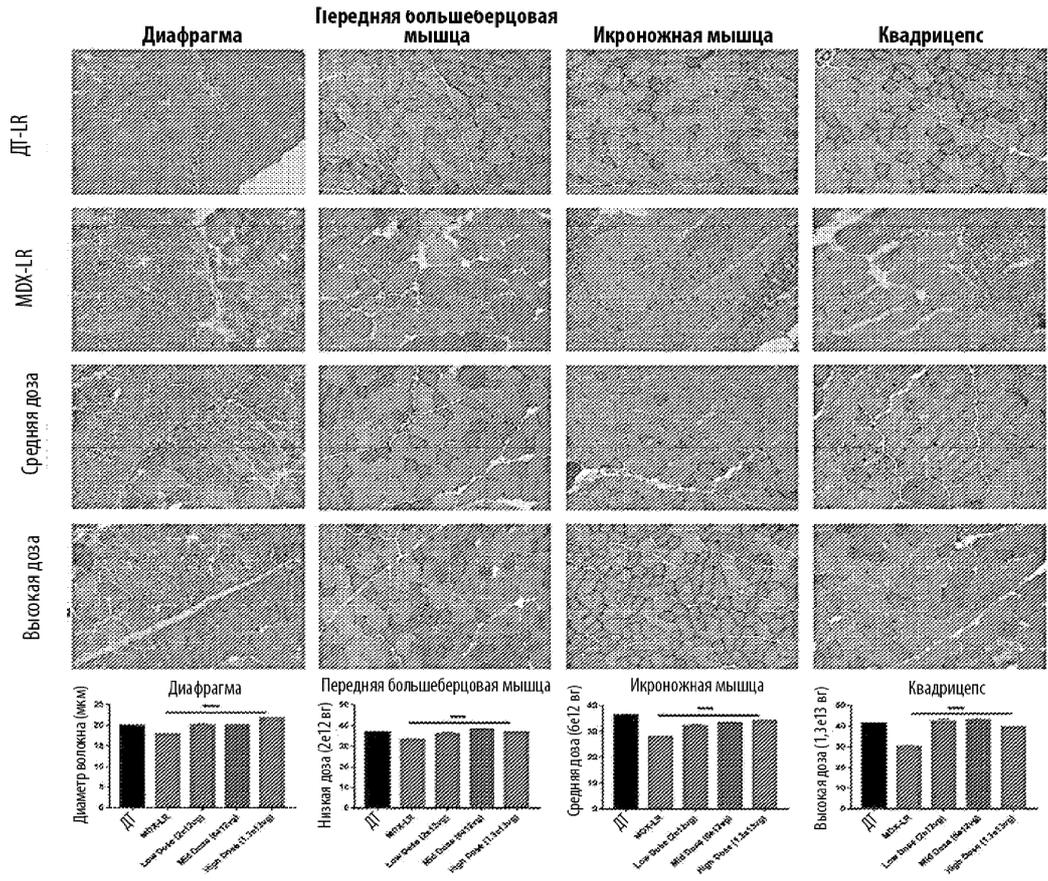
Фиг. 13В



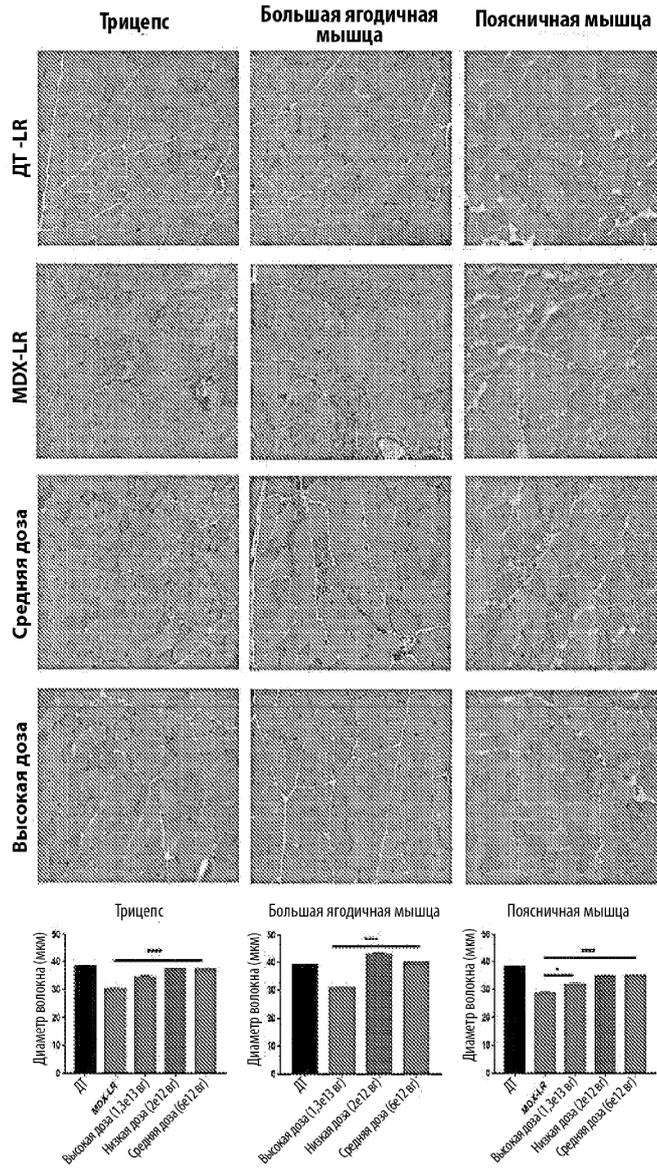
Фиг. 14



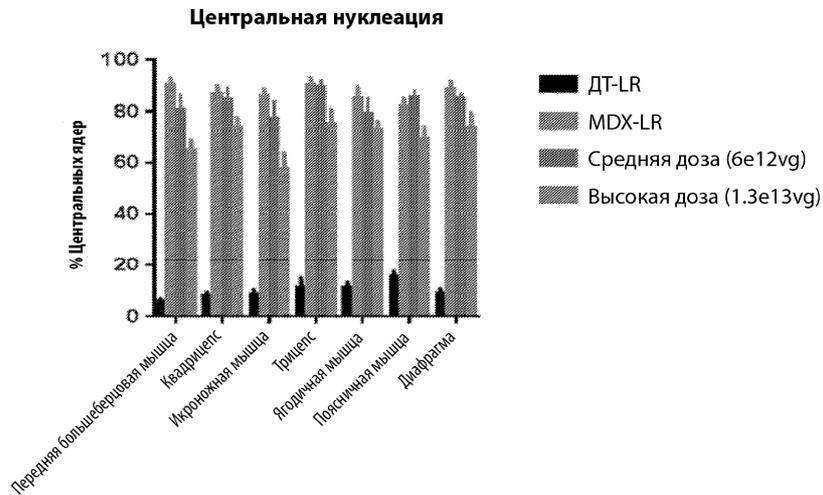
Фиг. 15



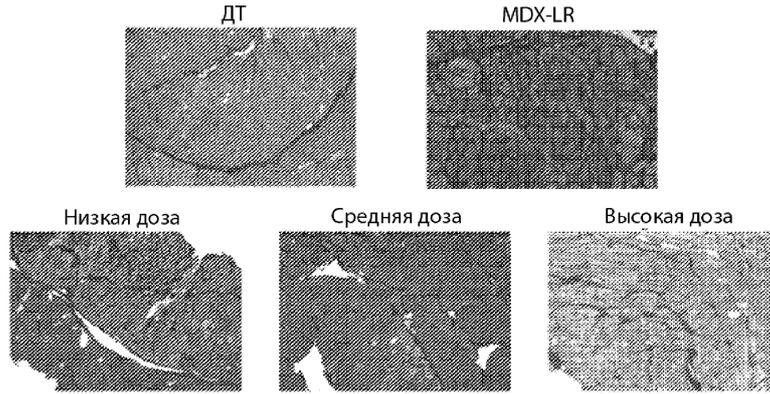
Фиг. 16



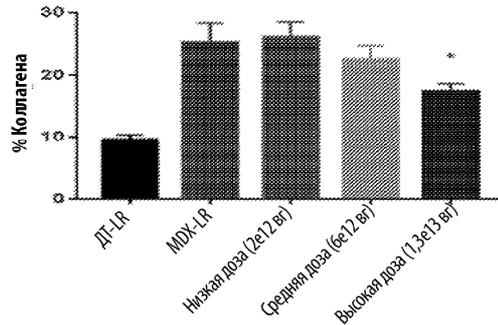
Фиг. 17



Фиг. 18

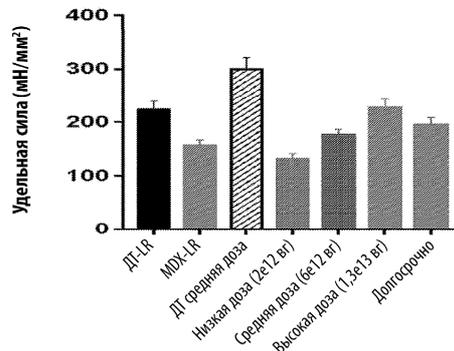


Сириус красный - Диафрагма

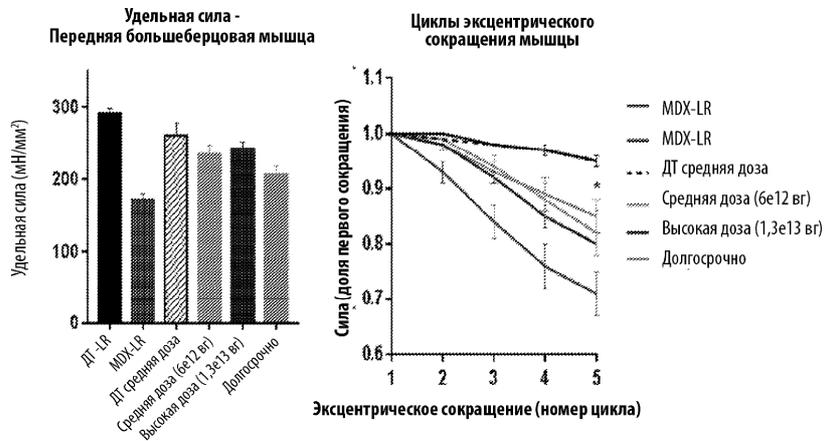


Фиг. 19

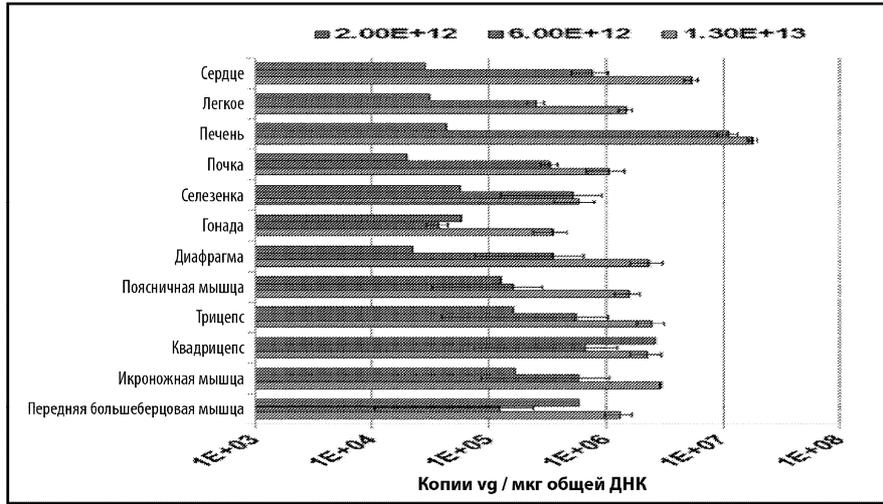
Удельная сила - Диафрагма



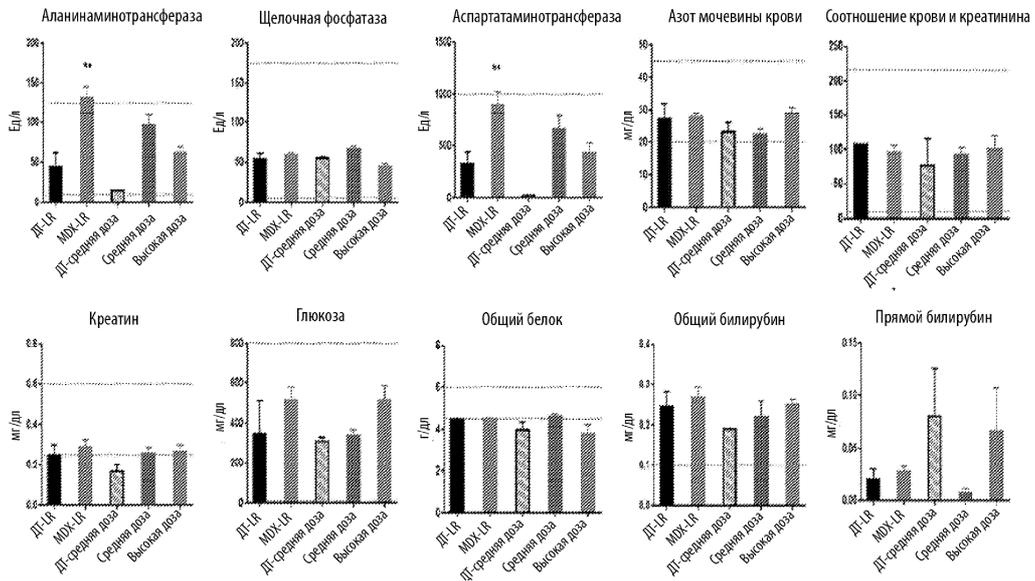
Фиг. 20



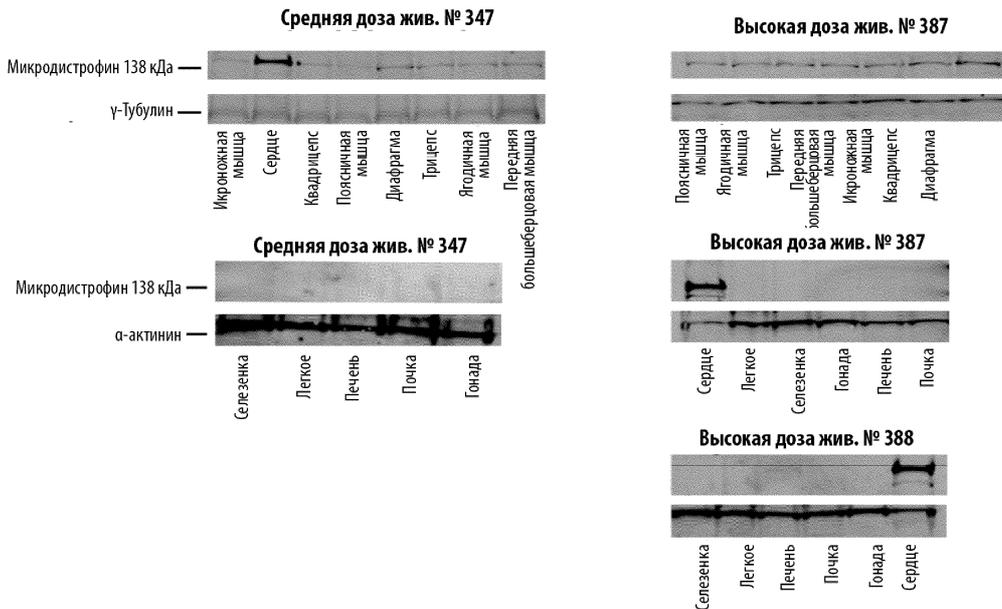
Фиг. 21



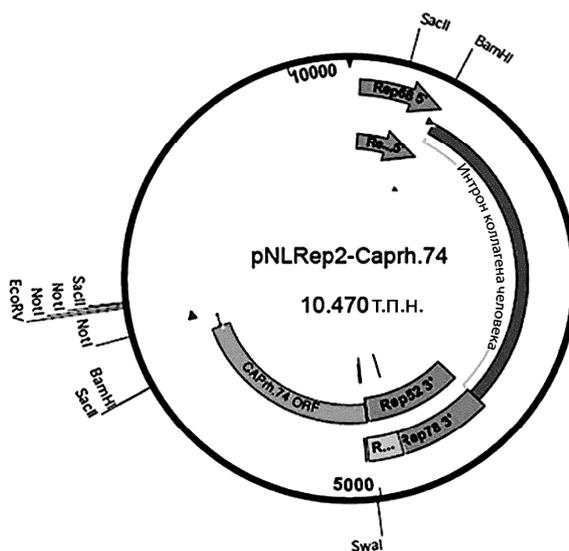
Фиг. 22



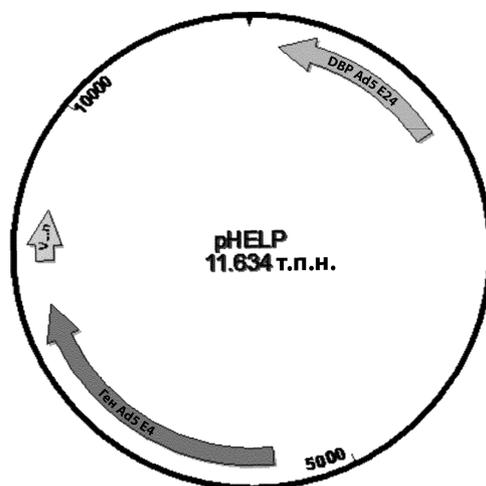
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26