

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293138 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.20

(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.28

(54) МИНИАТЮРИЗИРОВАННЫЕ ДИСТРОФИНЫ С ДОМЕНАМИ СВЯЗЫВАНИЯ
СПЕКТРИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/017,148

(32) 2020.04.29

(33) US

(86) PCT/US2021/029514

(87) WO 2021/222332 2021.11.04

(71) Заявитель:
БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Бэнкс Глен, Дэвис Джонатан Гарри,
Левеске Пол Чарлз (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)

(57) В изобретении описаны молекулы нуклеиновой кислоты, полипептиды, клетки, векторы и фармацевтические композиции, относящиеся к миниатюризированному дистрофину. Также раскрыты способы получения и способы терапевтического применения миниатюризированного дистрофина.

A1

202293138

202293138

A1

МИНИАТЮРИЗИРОВАННЫЕ ДИСТРОФИНЫ С ДОМЕНАМИ СВЯЗЫВАНИЯ

СПЕКТРИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет патентной заявки США, серийный номер 63/017148, зарегистрированной 29 апреля 2020 года, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Раскрытый в настоящей заявке объект изобретения в основном относится к полинуклеотидам, полипептидам, клеткам, векторам, применениям и наборам, относящимся к миниатюризированному дистрофину.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

5 Миодистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой рецессивно-наследуемую мышечную атрофию, поражающую приблизительно 1 из 3500 мужчин. МДД вызвана мутациями в гене дистрофина, расположенном на X-хромосоме. Мутации в этом гене приводят к нарушенной или отсутствующей экспрессии белка дистрофина.

Дистрофин является ключевым компонентом белкового комплекса, который отвечает за регуляцию целостности и функции мышечных клеток. Пациенты с МДД, как правило, теряют способность физически поддерживать себя в детстве и со временем становятся все слабее. Такое прогрессирующее истощение скелетных мышц и сердечная дисфункция, как правило, приводят к потере способности передвигаться и преждевременной смерти, преимущественно из-за сердечной или дыхательной недостаточности.

В прошлом были предприняты некоторые попытки лечения МДД. Однако доступные варианты лечения были значительно ограничены из-за большого размера кДНК дистрофина дикого типа (приблизительно 13,9 т.п.н.), которая не может быть введена и экспрессирована у пациентов с МДД с использованием стандартных вирусных векторов, в том числе аденоассоциированного вируса (AAV), который не может переносить более чем приблизительно 4,9 т.п.н. гетерологичной ДНК. Таким образом, существует необходимость разработки рекомбинантного гена дистрофина, который можно эффективно упаковать в вектор для генотерапии.

Было показано, что аденоассоциированный вирус (AAV) полезен в генотерапевтических подходах, направленных на коррекцию генетических дефицитов,

которые приводят к снижению или полному устранению уровней экспрессии белков ((Nathwani *et al.*, *Human Gene Therapy* 28:1004-1012 (2017); Keeler A.M. *et al.*, *Clin. Transl. Sci.* 10:242-248 (2017)), и потенциально полезны для нокдауна гена, редактирования или модификации генома и модуляции некодирующей РНК (Valdmanis *et al.*, *Human Gene Therapy* 28(4):361-372 (2017 April)).

Упаковка всей мышечно-специфической изоформы кДНК дистрофина в один капсид gAAV не может быть легко достигнута из-за большого размера кДНК дистрофина. Предыдущие исследования были сосредоточены на разработке меньших генетических конструкций, которые экспрессируют только определенные домены дистрофина. См. патенты США №№ 6869777 и 8501920, каждый из которых включен посредством ссылки. Однако эти подходы имели лишь ограниченный успех.

Остается потребность в более точных и эффективных средствах генотерапии для лечения пациентов с мутациями гена дистрофина и, в частности, в необходимости разработки рекомбинантного гена дистрофина, который можно было бы эффективно упаковать в вектор для генотерапии.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящем раскрытии предлагается молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид миниатюризированного дистрофина, содержащий модифицированный домен спектриновых повторов 16 (R16), где часть домена спектриновых повторов 16 (R16) замещена соответствующей частью отличающегося домена спектриновых повторов. В некоторых вариантах осуществления отличающийся домен спектриновых повторов представляет собой домен спектриновых повторов 2 (R2). В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен R16 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68, 69, 70 и 71. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина содержит от N-конца к C-концу шарнирный домен 1 (H1) домен, домен спектриновых повторов 1 (R1), модифицированный домен R16, домен спектриновых повторов 17 (R17), шарнирный домен 3 (H3), домен спектриновых повторов 23 (R23), домен спектриновых повторов 24 (R24) и шарнирный домен 4 (H4) дистрофина. В некоторых вариантах осуществления (i) домен H1 и домен R1 слиты напрямую, (ii) домен

R1 и модифицированный домен R16 слиты напрямую, (iii) модифицированный домен R16 и домен R17 слиты напрямую, (iv) домен R17 и домен H3 слиты напрямую, (v) домен H3 и домен R23 слиты напрямую, (vi) домен R23 и домен R24 слиты напрямую, или (vii) домен R24 и домен H4 слиты напрямую, или (vii) любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина не содержит домен спектриновых повторов 2 (R2), домен спектриновых повторов 3 (R3), домен спектриновых повторов 4 (R4), домен спектриновых повторов 5 (R5), домен спектриновых повторов 6 (R6), домен спектриновых повторов 7 (R7), домен спектриновых повторов 8 (R8), домен спектриновых повторов 9 (R9), домен спектриновых повторов 10 (R10), домен спектриновых повторов 11 (R11), домен спектриновых повторов 12 (R12), домен спектриновых повторов 13 (R13), домен спектриновых повторов 14 (R14), домен спектриновых повторов 15 (R15), домен спектриновых повторов 18 (R18), домен спектриновых повторов 19 (R19), домен спектриновых повторов 20 (R20), домен спектриновых повторов 21 (R21) и/или домен спектриновых повторов 22 (R22). В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина дополнительно содержит домен ABD1 и/или домен CR. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина состоит по существу или состоит от N-конца до C-конца из домена ABD1, домена H1, домена R1, модифицированного домена R16, домена R17, домена H3, домена R23, домена R24, домена H4 и домена CR дистрофина. В некоторых вариантах осуществления домен H1 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления домен R1 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен R16 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по

[illegible]

[illegible]

приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина демонстрирует более высокую экспрессию полипептида миниатюризированного дистрофина, чем ВХА-212372 (SEQ ID NO: 88). В некоторых вариантах осуществления экспрессия полипептида миниатюризированного дистрофина, по меньшей мере, приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,6 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,7 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,8 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,9 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,1 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,2 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,3 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,4 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,6 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,7 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,8 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,9 раза или, по меньшей мере, приблизительно в 3 раза выше чем экспрессия полипептида ВХА-212372 (SEQ ID NO: 88).

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, описываемая в настоящем документе, дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор является тканеспецифическим промотором. В некоторых вариантах осуществления промотор управляет экспрессией терапевтического белка в мышечных клетках, гепатоцитах, эндотелиальных клетках, нервных клетках, синусоидальных клетках или любом их сочетании. В некоторых вариантах осуществления промотор выбран из группы, состоящей из промотора C5-12(T), промотора MLC2v-cTNT455, промотора мышинного тиретина (mTTR), промотора эндогенного фактора VIII (F8), промотора альфа-1-антитрипсина человека (hAAT), минимального промотора альбумина человека, промотора мышинного альбумина, промотора тристетрапролина (TTP), промотора CASI, промотора гена синапсина 1, промотора CAG, промотора цитомегаловируса (CMV), промотора α 1-антитрипсина (AAT), мышечной креатинкиназы (MCK), тяжелой цепи альфа миозина (α MHC), миоглобина (MB), десмина (DES), SPc5-12, 2R5Sc5-12, dMCK, tMCK и фосфоглицератаиназы (PGK). В некоторых вариантах

осуществления промотор представляет собой промотор C5-12(T). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, описываемая в настоящем документе, дополнительно содержит интронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность расположена в положении 5' по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид миниатюризированного дистрофина. В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность расположена в положении 3' по отношению к промотору. В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность содержит синтетическую интронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, описываемая в настоящем документе, дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент. В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент расположен в положении 3' по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид миниатюризированного дистрофина. В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит мутированный посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), участок связывания микроРНК или последовательность ДНК, нацеленную на ядро, или любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления раскрытая молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность 3'UTR поли(A) хвоста. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'UTR поли(A) хвоста выбрана из группы, состоящей из поли(A) дистрофина, поли(A) bGH, поли(A) актина, поли(A) гемоглобина и любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3'UTR поли(A) хвоста содержит поли(A) дистрофина. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит энхансерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, описываемая в настоящем документе, дополнительно содержит первый ITR и/или второй ITR. В некоторых вариантах осуществления первый ITR и второй ITR идентичны. В некоторых вариантах осуществления первый ITR и/или второй ITR получены из аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, описываемая в настоящем документе, содержит последовательность, кодирующую гетерологичный компонент. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный компонент выбран из группы, состоящей из альбумина или его фрагмента, Fc-области иммуноглобулина, C-концевого пептида (СТР) β -субъединицы хорионического гонадотропина человека, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента, альбумин-связывающей

молекулы или ее производного, и любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления предлагается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, описываемую в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, ретровирусного вектора, поксвирусного вектора, бакуловирусного вектора, герпесвирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV выбран из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 и AAV11. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV представляет собой AAV8 или AAV9. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV представляет собой AAV9. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV представляет собой AAV8.

В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описываемые в настоящем документе, формулируют со средством доставки. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления средство доставки выбрано из группы, состоящей из липосом, нелипидных полимерных молекул, эндосом и любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описываемые в настоящем документе, формулируют для внутривенной, трансдермальной, интрадермальной, подкожной, легочной или пероральной доставки или любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описываемые в настоящем документе, формулируют для внутривенной доставки.

В некоторых вариантах осуществления предлагается полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты или вектором, описываемыми в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления предлагается клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описываемые в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO, клетку HEK293, клетку HBK, клетку COS, клетку NSO или клетку HT1080.

В некоторых вариантах осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (a) нуклеиновую кислоту, вектор, полипептид или клетку-хозяина, описываемые в настоящем документе; и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления предлагается набор, содержащий нуклеиновую кислоту, вектор, полипептид, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию, описываемые в настоящем документе, и инструкции по введению

нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида, клетки-хозяина или фармацевтической композиции нуждающемуся в этом индивидууму.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ получения полипептида миниатюризированного дистрофина, предусматривающий культивирование клетки-хозяина, описываемой в настоящем документе в подходящих условиях и выделение полипептида миниатюризированного дистрофина.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ экспрессии полипептида миниатюризированного дистрофина у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающий введение индивидууму нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции, описываемых в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ лечения индивидуума с заболеванием или состоянием, предусматривающий введение индивидууму нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида, клетки-хозяина или фармацевтической композиции, описываемых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание вызвано недостатком дистрофина. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой саркопению, поражение сердца, кахексию, миодистрофию Дюшенна (МДД), миодистрофию Беккера (МБД), X-сцепленную дилатационную кардиомиопатию (XLDC), плечелопаточно-лицевую миодистрофию, миотоническую миодистрофию, поясно-конечностную миодистрофию, окулофарингеальную миодистрофию, миодистрофию Эмери-Дрейфуса, дистальную миодистрофию и/или врожденную миодистрофию. В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, полипептид, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию вводят внутривенно, трансдермально, интрадермально, подкожно, перорально или легочно или любым их сочетанием. В некоторых вариантах осуществления способ, описываемый в настоящем документе, дополнительно предусматривает введение индивидууму второго средства. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления введение молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида, клетки-хозяина или фармацевтической композиции индивидууму приводит к увеличению экспрессии белка дистрофина относительно экспрессии белка дистрофина в организме индивидуума до введения, где экспрессия белка дистрофина увеличивается, по меньшей мере, приблизительно в 2 раза, по меньшей мере, приблизительно в 3 раза, по меньшей мере, приблизительно в 4 раза, по меньшей мере, приблизительно в 5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 6 раз, по меньшей мере, приблизительно в 7 раз, по меньшей мере, приблизительно в 8 раз, по меньшей мере, приблизительно в 9 раз, по меньшей мере,

приблизительно в 10 раз, по меньшей мере, приблизительно в 11 раз, по меньшей мере, приблизительно в 12 раз, по меньшей мере, приблизительно в 13 раз, по меньшей мере, приблизительно в 14 раз, по меньшей мере, приблизительно в 15 раз, по меньшей мере, приблизительно в 20 раз, по меньшей мере, приблизительно в 25 раз, по меньшей мере, приблизительно в 25 раз, по меньшей мере, приблизительно в 30 раз, по меньшей мере, приблизительно в 35 раз, по меньшей мере, приблизительно в 40 раз, по меньшей мере, приблизительно в 50 раз, по меньшей мере, приблизительно в 60 раз, по меньшей мере, приблизительно в 70 раз, по меньшей мере, приблизительно в 80 раз, по меньшей мере, приблизительно в 90 раз или, по меньшей мере, приблизительно в 100 раз. В некоторых вариантах осуществления предлагается молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид миниатюризированного дистрофина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления предлагается молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид миниатюризированного дистрофина, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, вектор, полипептид, клетка-хозяин, фармацевтическая композиция, набор или способ, описываемые в настоящем документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид миниатюризированного дистрофина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид миниатюризированного дистрофина BXA-220931 (SEQ ID NO: 83).

В некоторых вариантах осуществления предлагается молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, содержащую по порядку промотор C5-12(T) из SEQ ID NO: 109, интрон SV40 из SEQ ID NO: 110, кодирующую последовательность для миниатюризированного дистрофина BXA-220931 из SEQ ID NO: 111, 3'-UTR из SEQ ID NO: 112 и последовательность полиА из SEQ ID NO: 113.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, вектор, полипептид, клетка-хозяин, фармацевтическая композиция, набор или способ, описываемые в настоящем документе, содержат нуклеотидную последовательность, содержащую по порядку промотор C5-12(T) из SEQ ID NO: 109, интрон SV40 из SEQ ID NO: 110, кодирующую последовательность для миниатюризированного дистрофина BXA-220931 из SEQ ID NO: 111, 3'-UTR из SEQ ID NO: 112 и последовательность полиА из SEQ ID NO: 113.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена схематическая диаграмма полноразмерного белка дистрофина человека. ABD1: актин-связывающий домен-1; Н# (например, Н1): шарнирная область; R# (например, R1): домены спектриноподобных повторов; ABD2: актин-связывающий домен-2; CR: богатый цистеином домен; С-конец: С-концевой домен белка.

На фиг. 2 представлена схематические диаграммы миниатюризированных полипептидов дистрофина ВХА-212372, ВХА-212372-J4, ВХА-212372-J4V4, ВХА-212372-J4V11, ВХА-212372-J4V12, и ВХА-212372-J4V13 (ВХА-220931).

На фиг. 3 представлена экспрессия полипептида миниатюризированного дистрофина в сердечных миоцитах человека, полученных из изогенной индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (ИКМ) (несущих преждевременный стоп-кодон E2035X в гене дистрофина, который предотвращает экспрессию эндогенного дистрофина) после трансфекции плазмидами, экспрессирующими указанные полипептиды миниатюризированного дистрофина. Экспрессию полипептидов количественно определяли путем ИФА. Значимость: **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001 (односторонний дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки). Столбчатые диаграммы отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 4 представлена диаграмма с накоплением для относительного потенциала связывания для МНС класса I по сравнению со всеми другими пептидами в базе данных EIDB для вариантов соединения J4 миниатюризированного дистрофина ВХА-212372. Исходное неприродное соединение 4 (J4) (R1-R16) обозначено как соединение 1 на фиг. 4А и соединение 0 на фиг. 4В и имеет умеренный риск связывания с МНС класса I. Другие цифры на оси x указывают на варианты J4 (например, 13 = J4V13 и т.д.). Модификации последовательности соединения (J4V4, J4V11, J4V12, J4V13) показали сниженный потенциал связывания с МНС класса I. И J4V12, и J4V13 имели самую низкую теоретически рассчитанную аффинность связывания.

На фиг. 5 представлен профиль иммуногенного риска соединений полипептида миниатюризированного дистрофина. на фиг. 5А представлена гистограмма, показывающая долю образцов среди протестированной клеточной панели из 40 образцов, которые были активированы различными пептидами с соединением, как указано, и имели пролиферирующие CD4⁺ клетки (каждый квадрат представляет один образец пациента). На фиг. 5В представлена гистограмма, показывающая долю образцов среди протестированной клеточной панели из 40 образцов, которые были активированы различными пептидами с соединением, как указано, и имели пролиферирующие CD8⁺ клетки (каждый квадрат представляет один образец пациента).

На фиг. 6 представлена гистограмма, показывающая повышенную экспрессию белка миниатюризированного дистрофина в клетках тканевой культуры, трансфицированных экспрессирующей конструкцией с интроном SV40 и новым кодон-оптимизированным BXA-220931 (SEQ ID NO: 100), по сравнению с экспрессией белка в клетках тканевой культуры, трансфицированных сопоставимыми количествами соответствующей экспрессирующей конструкции без интрона SV40 и с более старой кодон-оптимизированной кодирующей последовательностью BXA-212372-J4V13 (SEQ ID NO: 101), как определено с помощью ИФА (ОЕ, относительные единицы). Значимость оценивали по однофакторному дисперсионному анализу с апостериорным критерием Тьюки. Столбчатые диаграммы отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 7 представлены гистограммы, показывающие влияние различных промоторов и интронов/5'UTR, связанных с репортерной конструкцией GFP, на экспрессию GFP в тканевой культуре. На фиг. 7А представлено влияние указанных промоторов на экспрессию GFP. Экспрессия представлена относительно к использованию промотора CMV (крайняя левая точка данных). На фиг. 7В представлен эффект указанных интронов/5'UTR на экспрессию GFP. Экспрессия представлена относительно экспрессии в отсутствие интрона (крайняя левая точка данных). Значимость относительно промотора CMV (фиг. 7А) и отсутствия интрона (фиг. 7Б): **P<0,01, ***P<0,001 (односторонний дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки). Столбчатые диаграммы отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 8 представлена экспрессия полипептидов миниатюризированного дистрофина у мышей и отсутствие агрегатов белка дистрофина. На фиг. 8А представлена иммунофлуоресцентная визуализация экспрессии полипептида миниатюризированного дистрофина и зародышевого агглютинина пшеницы (WGA) в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-BXA-212372-J4V4. На фиг. 8В показана иммунофлуоресцентная визуализация экспрессии полипептида миниатюризированного дистрофина и зародышевого агглютинина пшеницы (WGA) в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-BXA-212372-J4V11. На фиг. 8С представлена иммунофлуоресцентная визуализация экспрессии полипептида миниатюризированного дистрофина и зародышевого агглютинина пшеницы (WGA) в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-BXA-212372-J4V12. На фиг. 8D представлена иммунофлуоресцентная визуализация экспрессии полипептида миниатюризированного дистрофина и зародышевого агглютинина пшеницы (WGA) в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-BXA-212372-J4V13 (BXA-220931). Агрегаты белка дистрофина не обнаружены.

На фиг. 9 представлено восстановление nNOS на мышечной сарколемме мышей *mdx^{scsn}*, получавших указанные конструкции AAV9. Образцы окрашивали антителами к nNOS или WGA/DAPI, как указано.

На фиг. 10 показано влияние миниатюризированного дистрофина ВХА-220931 на физиологию индуцированных кардиомицитов (ИКМ), полученных из изогенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК), которые несут преждевременный стоп-кодон E2035X в гене дистрофина, который предотвращает экспрессию эндогенного дистрофина. ИКМ инфицировали вирусом AAV8-ВХА-220931 для получения экспрессии. На фиг. 10А представлена схема, иллюстрирующая экспериментальную установку и проведение импульса через микроэлектродный чип в тканевой культуре. На фиг. 10В представлен график, где скорость проведения у тестируемых ИКМ, экспрессирующих полипептид миниатюризированного дистрофина ВХА-220931, представлена как функция времени после трансфекции. ВХА-220931 увеличил скорость проведения у протестированных ИКМ. Необработанные ИКМ служили контролем. Значимость: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 (односторонний дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки). На фиг. 10С представлена гистограмма, показывающая экспрессию полипептида миниатюризированного дистрофина ВХА-220931 в клетках, в которых измеряли скорость проводимости. Необработанные ИКМ служили контролем. Столбчатые диаграммы отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 11 представлено взаимодействие с мишенью и экспрессия AAV9-ВХА-220931 и AAV9-ВХА-212374, определенная у мышей *mdx^{scsn}* в возрасте 4 недель. На фиг. 11А представлена гистограмма, показывающая относительное количество геномов вектора (VG) на мкг геномной ДНК в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-ВХА-220931 или AAV9-ВХА-212374. На фиг. 11В представлена гистограмма, показывающая относительное количество мРНК миниатюризированного дистрофина в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-ВХА-220931 или AAV9-ВХА-212374. На фиг. 11С представлена гистограмма, показывающая относительное количество белка миниатюризированного дистрофина в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-ВХА-220931 или AAV9-ВХА-212374. Экспрессия мРНК и белка миниатюризированного дистрофина оставалась выше уровня дистрофина дикого типа. Контролем служили мыши дикого типа и нелеченные мыши *mdx^{scsn}*. Столбчатые диаграммы отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 12 представлено взаимодействие с мишенью AAV9-ВХА-220931 и AAV9-ВХА-212374 и биораспределение соответствующих миниатюризированных дистрофинов, определенных у мышей *mdx^{scsn}* в возрасте 4 недель. На фиг. 12А представлена

иммунофлуоресцентная визуализация экспрессии миниатюризированных полипептидов дистрофина и $\alpha 2$ -ламинина в мышечной ткани диафрагмы мышей, получавших AAV9-BXA-220931 или AAV9-BXA-212374. Ядра визуализировали с помощью DAPI. Миниатюризированный дистрофин локализован совместно с $\alpha 2$ -ламинином, общим маркером мышечной сарколеммы. На фиг. 12В представлена гистограмма, указывающая относительное количество клеток в различных мышцах, положительных по миниатюризированному дистрофину (+ve = положительный). Контролем служили мыши дикого типа и нелеченные мыши *mdx^{scsn}*, окрашенные по дистрофину и $\alpha 2$ -ламинину. Столбчатые диаграммы отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 13 представлен гистологический анализ с окраской гематоксилином-эозином поперечно-полосатых мышц у мышей дикого типа, мышей *mdx^{scsn}* и мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-BXA-220931, в возрасте 12 недель. Лечение с помощью AAV9-BXA-220931 предотвращает дистрофический фенотип *mdx^{scsn}*.

На фиг. 14 представлено взаимодействие с мишенью и экспрессия AAV9-BXA-220931 и AAV9-BXA-212374, определенная у мышей *mdx^{scsn}* в возрасте 12 недель. На фиг. 14А представлена гистограмма, показывающая относительное количество геномов вектора (VG) на мкг геномной ДНК в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-BXA-220931 или AAV9-BXA-212374. На фиг. 14В представлена гистограмма, показывающая относительное количество мРНК миниатюризированного дистрофина в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-BXA-220931 или AAV9-BXA-212374. На фиг. 14С представлена гистограмма, показывающая относительное количество белка миниатюризированного дистрофина в мышечной ткани мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-BXA-220931 или AAV9-BXA-212374. Экспрессия мРНК и белка миниатюризированного дистрофина оставалась выше уровня дистрофина дикого типа. Контролем служили мыши дикого типа и нелеченные мыши *mdx^{scsn}*. Столбчатые диаграммы отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 15 представлена экспрессия обоих миниатюризированных дистрофинов ВХА-220931 и ВХА-212374, сохраняющаяся почти в каждом мышечном волокне, и предотвращение центральной нуклеации, аналогичное мышце дикого типа, в мышцах мышей *mdx^{scsn}* в возрасте 12 недель, получавших лечение AAV9-BXA-220931 или AAV9-BXA-212374. На фиг. 15А представлена иммунофлуоресцентная визуализация миниатюризированного дистрофина и ламинина в передней большеберцовой мышце мышей *mdx^{scsn}* в возрасте 12 недель, леченных AAV9-BXA-220931. Ядра визуализировали с помощью DAPI. Миниатюризированный дистрофин оставался на сарколемме почти каждого мышечного волокна, подобно дистрофину у мышей дикого типа. Контролем

служили нелеченные мыши *mdx^{scsn}*, окрашенные по дистрофину и ламинину. На фиг. 15B представлена гистограмма, показывающая долю клеток в различных мышцах, положительных по миниатюризированному дистрофину, у мышей *mdx^{scsn}*, леченных AAV9-BXA-220931 или AAV9-BXA-212374 (+ve = положительный результат). На фиг. 15C представлена гистограмма, показывающая долю мышечных клеток с центральными ядрами у мышей *mdx^{scsn}*, леченных AAV9-BXA-220931 или AAV9-BXA-212374. Контролем служили мыши дикого типа и нелеченные мыши *mdx^{scsn}*. Столбчатые диаграммы отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 16 представлено взаимодействие с мишенью AAV9-BXA-220931 и биораспределение соответствующего миниатюризированного дистрофина, определяемого в сердце мышей *mdx^{scsn}* в возрасте 12 недель. Полипептид миниатюризированного дистрофина и ламинин визуализировали методом иммунофлуоресценции в ткани сердечной мышцы мышей *mdx^{scsn}*, леченных AAV9-BXA-220931. Ядра визуализировали с помощью DAPI. Экспрессию миниатюризированного дистрофина BXA-220931 наблюдали почти в каждом кардиомиоците сердца. Контролем служили мыши дикого типа и нелеченные мыши *mdx^{scsn}*, окрашенные по дистрофину и ламинину.

На фиг. 17 представлено восстановление комплекса дистрофин-гликопротеин в сарколемме мышей *mdx^{scsn}* в возрасте 12 недель, леченных AAV9-BXA-220931. Способом иммунофлуоресценции визуализировали указанные маркеры мышечной сарколеммы, α -синтрофин, β -саркогликан и pNOS. Совместную локализацию pNOS с α -синтрофином и β -саркогликаном наблюдали у мышей *mdx^{scsn}*, леченных AAV9-BXA-220931, но не у мышей, леченных AAV9-BXA-212374, или у нелеченных мышей. Контролем служили нелеченные мыши *mdx^{scsn}*.

На фиг. 18 представлена оценка мышечной массы у леченных и нелеченных мышей *mdx^{scsn}* в возрасте 12 недель. Масса передней большеберцовой мышцы тяжелее у нелеченных мышей *mdx^{scsn}* из-за значительной мышечной дегенерации и регенерации. Лечение AAV9-BXA-220931 и AAV9-BXA-212374 предотвращало этот фенотип и приводило к нормальной мышечной массе. Контролем служили мыши дикого типа и нелеченные мыши *mdx^{scsn}*. Столбчатые диаграммы отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На фиг. 19 представлена совместная локализация миниатюризированных дистрофинов с анкирином G в костамерах в пределах сарколеммы мышей *mdx^{scsn}*, леченных AAV9-BXA-220931 и AAV9-BXA-212374, в возрасте 12 недель. Миниатюризированные дистрофины и анкирин G визуализировали методом иммунофлуоресценции. Оба миниатюризированных дистрофина BXA-220931 и BXA-

212374 локализуются как на Z-дисках, так и на М-дисках костамеров, подобно дистрофину в мышцах дикого типа. Контролем служили мышцы дикого типа и нелеченные мышцы *mdx^{scsn}*, окрашенные по дистрофину и анкирину G.

На фиг. 20 представлен анализ постсинаптической замыкательной пластинки 3-й мышцы длинного разгибателя пальцев у леченных и нелеченных мышцей *mdx^{scsn}* в возрасте 12 недель. Нейромышечные соединения метили α -бунгаротоксином. Постсинаптическая замыкательная пластинка непрерывна в мышцах дикого типа, но фрагментирована при мышечной дегенерации в мышцах мышцей *mdx^{scsn}*. Лечение AAV9-BXA-220931 и AAV9-BXA-212374 предотвращало фрагментацию нейромышечных соединений у мышцей *mdx^{scsn}*.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Обзор

Настоящее раскрытие относится к новым миниатюризированным дистрофинам или к кодирующим их генам. Миниатюризированные дистрофины могут быть функционально связаны с регуляторной кассетой. Настоящее раскрытие также относится к способам лечения индивидуума, страдающего миодистрофией, саркопенией, сердечной недостаточностью или кахексией. Кроме того, настоящее раскрытие относится к способам профилактического лечения индивидуума с риском развития миодистрофии, саркопении, сердечной недостаточности или кахексии. Способы лечения индивидуума, страдающего миодистрофией, саркопенией, сердечной недостаточностью или кахексией или подверженного риску их развития, могут предусматривать введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей ген миниатюризированного дистрофина и носитель для доставки.

Определения

Чтобы настоящее раскрытие можно было легче понять, некоторые термины определены заранее. Как применяют в настоящей заявке, если иное прямо не предусмотрено в настоящем документе, каждый из следующих терминов имеет значение, указанное ниже. Дополнительные определения изложены на всем протяжении заявки.

Термин «и/или», используемый в настоящем документе, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе или друг без друга. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В» в настоящем документе предназначен для включения «А и В», «А или В», «А» (отдельно), и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В, и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

Следует понимать, что во всех случаях, когда аспекты описаны в настоящем документе с формулировкой «содержащий», также предлагаются аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, в котором их обычно понимает специалист в области, к которой относится настоящее раскрытие. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, предоставляют специалисту общий словарь большинства терминов, используемых в этом раскрытии.

Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой по Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Заголовки, представленные в настоящем документе, не являются ограничениями различных аспектов раскрытия, которые могут быть получены посредством ссылки на описания в целом. Таким образом, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены ссылкой на описание во всей его полноте.

Дистрофин (DMD) представляет собой крупный сцепленный с X-хромосомой ген человека, кодирующий дистрофин. Белок дистрофина представляет собой цитоскелетный белок с молекулярной массой 427 кДа, который локализован на цитоплазматической поверхности сарколеммы и особенно распространен у костомеров в мышечных волокнах. Белок дистрофина имеет четыре основных функциональных домена: актин-связывающий N-концевой домен (ABD1); центральный стержневой домен, содержащий ряд стержней, называемых "домены спектриновых повторов", и шарниров; богатый цистеином домен; и C-конец.

Как применяют в настоящем документе, термин «полипептид миниатюризированного дистрофина» или «пептид миниатюризированного дистрофина» относится к полипептиду, который меньше по размеру, чем полноразмерный полипептид дистрофина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина способен изменять (увеличивать или уменьшать, соответственно) измеримое значение мышечной физиологии или анатомии при МДД на модели животных по меньшей мере, приблизительно на 10 или 20% от значения дикого типа, таким образом, что значение ближе к значению дикого типа (например, мышь *mdx* имеет измеримое значение мышечной физиологии или анатомии, которое составляет 50% от значения дикого типа, и это значение увеличивается, по меньшей мере, до 60% от

значения дикого типа; или мышь *mdx* имеет измеримое значение мышечной физиологии или анатомии, которое составляет 150% от значения дикого типа, и это значение уменьшается не более чем до 140% от значения дикого типа). В отдельных вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина способен изменять измеримое значение мышечной физиологии или анатомии при МДД у животных, по меньшей мере, приблизительно на 30% от значения дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина способен изменять измеримое значение мышечной физиологии или анатомии в модели МДД у животных до уровня, аналогичного значению дикого типа (например, $\pm 4\%$).

Как применяют в настоящем документе, термин «повторы спектрина» или «спектриноподобные повторы» относится к пептидам, состоящим приблизительно из 100 аминокислот, которые отвечают за палочковидную форму многих структурных белков, включая в качестве неограничивающих примеров, дистрофины, где повторы спектрина, как правило, присутствуют в нескольких экземплярах. Повторы спектрина могут содержать мутации природной последовательности пептида, такие как консервативные и/или неконсервативные изменения в аминокислотной последовательности, а также добавление или делецию до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот в конец/из конца повтора спектрина или в пределах повтора спектрина. В некоторых вариантах осуществления каждый повтор спектрина (каждый из R1-R24) имеет, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности с последовательностью природного повтора спектрина (каждого из природных R1-R24).

Как применяют в настоящем документе, термин «последовательности, кодирующие повторы» относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим пептиды повторов спектрина. Этот термин включает природные и синтетические последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие повторы спектрина (например, как природные, так и мутированные пептиды повторов спектрина).

Как применяют в настоящем документе, термин «домен спектриновых повторов» относится к области в полипептиде миниатюризированного дистрофина, которая содержит повторы спектрина полипептида миниатюризированного дистрофина.

Термин «слитый» относится к первой аминокислотной последовательности, которая связана внутри рамки считывания со второй аминокислотной последовательностью, с которой она обычно не связана в природе, образуя слитый» белок/полипептид. Эти слитые аминокислотные последовательности, которые обычно

существуют в отдельных белках, могут быть объединены в слитый полипептид, или аминокислотные последовательности, которые обычно существуют в том же белке, могут быть помещены в новом расположении в слитый полипептид. Слитый белок создают, например, с помощью химического синтеза пептидов или с помощью технологии рекомбинантных ДНК, посредством чего получают, а затем транслируют полинуклеотид, в котором пептидные области кодируются в желаемой связи. Слитый белок может также содержать вторую аминокислотную последовательность, связанную с первой аминокислотной последовательностью путем ковалентной, непептидной или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления «слияние» двух полипептидов достигается за счет линкера. Линкеры могут представлять собой аминокислоты или другие химические структуры. В некоторых вариантах осуществления линкеры могут быть синтетическими.

В некоторых вариантах осуществления «слияние» между двумя полипептидами представляет собой прямое слияние, т.е., без промежуточного линкера. Термин «слитый напрямую» или «прямое слияние» относится к соединению между двумя полипептидными цепями посредством пептидной связи. Например, первая аминокислота «слита напрямую» со второй аминокислотой, когда первая аминокислота «слита напрямую» со второй аминокислотой за счет пептидной связи.

«Гетерологичный» и «гетерологичный компонент» по отношению к полипептидной молекуле или полинуклеотидной молекуле, которая является частью более крупного полипептида или полинуклеотида, соответственно, описывает полипептид или полинуклеотид, который происходит из полипептида или полинуклеотида, другого, чем оставшаяся часть полипептида или полинуклеотида. Дополнительный гетерологичный компонент полипептида или полинуклеотида может происходить из того же организма, что и оставшийся полипептид или полинуклеотид, соответственно, описываемые в настоящем документе, или дополнительный компонент может происходить из другого организма. Например, гетерологичный полипептид может быть синтетическим или полученным из другого вида, другого типа клеток человека, или одного и того же или другого типа клеток разных людей. В одном из аспектов гетерологичный компонент представляет собой полипептид, слитый с другим полипептидом с получением полипептида. В другом аспекте гетерологичный компонент не является полипептидом, например, ПЭГ, конъюгированный с полипептидом или белком.

Как применяют в настоящем документе, термин «мышечная клетка» относится к клетке, полученной из мышечной ткани, включая в качестве неограничивающих примеров

клетки, полученные из скелетной мышцы, гладкой мышцы (например, из желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря и кровеносных сосудов) и сердечной мышцы. Термин включает мышечные клетки *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Таким образом, например, выделенный кардиомиоцит будет представлять собой мышечную клетку в том виде, в каком она существует в мышечной ткани, присутствующей у индивидуума *in vivo*. Этот термин также охватывает как терминально дифференцированные, так и недифференцированные мышечные клетки, такие как миоциты, мышечные трубки, миобласты, кардиомиоциты и кардиомиобласты.

Как применяют в настоящем документе, термин «мышечно-специфический» по отношению к регуляторному элементу гена (например, энхансерной последовательности, промоторной последовательности) означает, что регуляторный элемент управляет транскрипционной активностью преимущественно в мышечных клетках или в мышечной ткани (например, 20:1) по сравнению с транскрипционной активностью, управляемой регуляторным элементом в других тканях. Анализы для определения мышечной специфичности регуляторного элемента известны в данной области (например, анализ *in vitro* с использованием мышечных клеток и клеток печени мышей, трансфицированных экспрессирующим вектором, содержащим регуляторный элемент, для тестирования экспрессии бета-галактозидного репортера).

Как применяют в настоящем документе, термин «аденоассоциированный вирус» или «AAV» в качестве неограничивающих примеров включает AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAV змей, AAV птиц, бычий AAV, AAV собак, AAV лошадей, овечий AAV, козий AAV, AAV креветок, AAV приматов, AAV не приматов и AAV овец, серотипы и клады AAV, раскрытые Gao et al. (J. Virol. 78:6381 (2004)) и Moris et al. (Virol. 33:375 (2004)), и любой другой AAV, известный сейчас или обнаруженный позже. См., например, Fields *et al.* VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers). AAV относится к *Dependoparvovirus* из семейства вирусов *Parvoviridae*. Например, AAV может быть AAV, полученным из природного вируса «дикого типа», AAV, полученным из генома рекомбинантного AAV (rAAV), упакованного в капсид, полученного из белков капсида, кодируемых природным геном *cap*, и/или из генома rAAV, упакованного в капсид, полученный из капсидных белков, кодируемых неприродным капсидным геном *cap*. Как применяют в настоящем документе, «AAV» можно использовать для обозначения самого вируса или его производных. Термин охватывает все подтипы и как природные, так и рекомбинантные формы, если прямо не указано иное. «AAV приматов» относится к AAV,

поражающему приматов, «AAV не приматов» относится к AAV, поражающему животных, кроме приматов, «бычий AAV» относится к AAV, поражающему крупных рогатых млекопитающих, и т.д. См., например, Bernard N. Fields *et al.*, Virology, Volume 2, Chapter 69 (3 d ed., Lippincott-Raven Publishers).

Термин «гAAV» относится к «рекомбинантному AAV». В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный AAV имеет геном AAV, в котором часть или все гены *rep* и *cap* заменены гетерологичными полинуклеотидными последовательностями.

«Вектор AAV» или «аденоассоциированный вирусный вектор», как применяют в настоящем документе, представляет собой гAAV, содержащий полинуклеотидную последовательность, не происходящую из AAV (т.е., полинуклеотид, гетерологичный по отношению к AAV), как правило, последовательность, представляющую интерес для генетической трансформации клеток. Как правило, гетерологичный полинуклеотид окружен, по меньшей мере, одной и, как правило, двумя последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV.

«Бескапсидный» или «с отсутствием капсида» (или их варианты) вирусный (например, AAV) геном или молекула нуклеиновой кислоты относится к геному или молекуле нуклеиновой кислоты без капсида. В некоторых вариантах осуществления бескапсидный геном или молекула нуклеиновой кислоты не содержит последовательности, кодирующие, например, белок Rep AAV.

«AAV» или «вирусная частица AAV» или «вектор AAV» или «векторная частица гAAV» относится к вирусной частице, состоящей, по меньшей мере, из одного капсидного белка AAV (как правило, из всех капсидных белков AAV дикого типа) и инкапсулированного полинуклеотида. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т. е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который необходимо доставить в клетку млекопитающего), ее, как правило, обозначают как «векторную частицу гAAV» или просто «векторную частицу AAV».

«Вирус-помощник» для AAV относится к вирусу, который позволяет AAV (например, AAV дикого типа) реплицироваться и упаковываться клеткой млекопитающего. В данной области известно множество таких вирусов-помощников для AAV, в том числе аденовирусы, вирусы герпеса и поксвирусы, такие как вирус осповакцины. Аденовирусы включают ряд различных подгрупп, хотя аденовирус типа 5 из подгруппы С является наиболее широко используемым. Многочисленные аденовирусы человека, не принадлежащие к человеку млекопитающих и птиц известны и доступны из хранилищ, таких как ATCC. Вирусы семейства герпеса включают, например, вирус простого герпеса (HSV) и вирус Эпштейна-Барр (EBV), а также цитомегаловирусы (CMV)

и вирусы псевдобешенства (PRV), все из которых также доступны в хранилищах, таких как ATCC.

Как применяют в настоящем документе, термин «инвертированный концевой повтор» (или «ITR») относится к одноцепочечной последовательности нуклеотидов, за которой следует обратно комплементарная ей последовательность. Промежуточная последовательность нуклеотидов между начальной последовательностью и обратно комплементарной последовательностью может быть любой длины, включая ноль. Геном AAV, как правило, содержит инвертированные концевые повторы (ITR) на обоих концах, где каждый конец, как правило, является палиндромным и может образовывать шпильку.

Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к биополимеру, состоящему из множества нуклеотидных мономеров, ковалентно связанных в цепь.

Термин «тропизм», как применяют в настоящем документе, относится к способности вируса (например, AAV) инфицировать только один или несколько определенных типов клеток и к его способности взаимодействовать только со специфическими поверхностными молекулами клеток для проникновения в клетку, необязательно и предпочтительно с последующей экспрессией (например, транскрипцией и, необязательно, трансляцией) последовательностей, переносимых вирусом (например, AAV) в клетку (например, для рекомбинантного вируса экспрессия гетерологичной нуклеотидной последовательности/последовательностей).

Как применяют в настоящем документе, термин «трансдукция» относится к проникновению вируса (например, AAV) в клетку и переносу генетического материала, содержащегося в вирусе, в клетку для экспрессии вирусного генома. Как правило, вирус (например, AAV) проникает в клетки в соответствии со своей тропностью.

«Введение» относится к физическому введению терапевтического средства индивидууму с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Иллюстративные пути введения, например, для терапии AAV, включают внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интратекальное, внутрилегочное, внутриочаговое, внутрикапсулярное, внутриглазное, внутрисердечное, интрадермальное, интраперитонеальное, транстрахеальное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, подкапсульное, субарахноидальное, интраспинальное, эпидуральное, интрасерноальное, пероральное, ректальное, местное, эпидермальное, мукозальное, интраназальное, вагинальное, ректальное и сублингвальное введение. Введение также можно проводить, например, один раз, несколько раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов времени.

«Лечение» или «терапия» индивидуума относится к любому типу вмешательства или процесса, осуществляемого по отношению к индивидууму, или к введению активного средства индивидууму с задачей обращения вспять, облегчения, улучшения состояния, ингибирования, замедления или предотвращения возникновения, прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояний или биохимических признаков, связанных с заболеванием.

«Терапевтически эффективное количество», «терапевтическая доза», «эффективная доза» или «эффективная дозировка», как применяют в настоящем документе, означают количество или дозу, которая достигает терапевтической цели, как описано в настоящем документе. Специалисту в данной области дополнительно понятно, что терапевтически эффективное количество и т.д. можно ввести путем однократной дозы, или его можно достичь введением многократных доз (т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и более доз). Способность терапевтического средства способствовать регрессу заболевания или ингибировать развитие или рецидивы заболевания можно оценивать с помощью различных способов, известных практикующему врачу, например, у индивидуумов-людей в ходе клинических испытаний, в системах животных моделей, прогнозирующих эффективность у людей, путем анализа активности средства в анализах *in vitro*.

«Индивидуум» включает любого человека или не являющегося человеком животного. Термин «не являющийся человеком» в качестве неограничивающих примеров включает позвоночных, таких как не являющиеся человеком приматы, овцы, собаки и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. Термины «индивидуум» и «пациент» в настоящем документе используются взаимозаменяемо.

Как применяют в настоящем документе, термины « μg » и « μM » используют взаимозаменяемо с « мкг » и « мкМ », соответственно.

Употребление альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее либо один, либо оба, либо любое сочетание альтернатив. Как применяют в настоящем документе, неопределенные артикли следует понимать как относящиеся к «одному или нескольким» любого перечисляемого или нумеруемого компонента или объекта.

Приблизительно или примерно: как применяют в настоящем документе, термин «приблизительно» или «примерно» применительно к одному или нескольким интересующим значениям относится к значению, которое похоже на установленное эталонное значение и находится в пределах диапазона значений, попадающих в 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любом направлении (более чем или менее чем) от установленного

эталонного значения, если не указано иное или иным образом не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превысит 100% от возможного значения). Когда термин «приблизительно» или «примерно» применяют в настоящем документе по отношению к определенному значению, значение без термина «приблизительно» или «примерно» также описано в настоящем документе.

Как описано в настоящем документе, под любым диапазоном концентраций, диапазоном процентного содержания, диапазоном соотношений или диапазоном целых чисел следует понимать значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую от целого числа), если не указано иное.

Различные аспекты раскрытия более подробно описаны в следующих подразделах.

Полинуклеотиды и полипептиды

Миниатюризированный дистрофин

Настоящее раскрытие относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид миниатюризированного дистрофина. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина содержит, по меньшей мере, три шарнирных домена дистрофина и, по меньшей мере, пять доменов повторов спектрина.

Дистрофин представляет собой палочковидный цитоплазматический белок, который соединяет цитоскелет мышечного волокна с окружающим его внеклеточным матриксом через клеточную мембрану. Этот белок преимущественно локализован в мышцах, используемых для движения (скелетные мышцы) и в сердечной мышце. Небольшое количество дистрофина присутствует в нервных клетках головного мозга. В скелетных и сердечных мышцах дистрофин является частью группы белков (белкового комплекса), которые вместе укрепляют мышечные волокна и защищают их от травм при сокращении и расслаблении мышц. Дистрофиновый комплекс действует как якорь, соединяя структурный каркас каждой мышечной клетки (цитоскелет) с решетчатой структурой белков и других молекул вне клетки (внеклеточный матрикс). Дистрофиновый комплекс также может играть роль в клеточной сигнализации, взаимодействуя с белками, которые посылают и получают химические сигналы.

Ген DMD, кодирующий полноразмерный белок дистрофина, является одним из самых длинных известных генов человека и содержит 2,3 млн п.н. (0,08% генома человека) в локусе Xp21. Первичный транскрипт в мышцах имеет размер приблизительно 2100 т.п.н и требует 16 часов для транскрипции; зрелая мРНК имеет размер 14,0 т.п.н. Мышечный транскрипт с 79 экзонами кодирует белок из 3685 аминокислотных остатков.

В настоящем документе описаны аминокислотные и нуклеотидные последовательности для дистрофина. Аминокислотная последовательность, составляющая человеческий дистрофин дикого типа, изоформа Dp427m, известна в базе UniProt под идентификационным № NP_003997.1 и показана в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотная последовательность полноразмерного белка дистрофина (NP_003997.1).

SEQ ID NO: 1
MLWWEVEDCYEREDVQKKFTTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDLQDGRRLDLLLE GLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLI WNIILHWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGL ALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPD KKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHHYSQQITVSL AQQYERTSSPKPRFKSYAYTQAAVYTTSDPTRSPFPSQHLEAPEDKSFGSSLMESVNL LDRYQTALIEVLWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGR VGNILQLGSKLIGTGKLSSEDEETEVEQEMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLM LQNKQLKELNDWLTKTEERTRKMEEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVR VNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKW QRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSM GKLYSLKQDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQ PSLTQTTVMETVTTVTTREQILVKHAQEELPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELH SWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKA EKFRKLQDASRSAQALVEQ MVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQCLEQMTT TAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGP MLDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQSETKLS IPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSE FEEIEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPA LGDSEILKKQLKQCRLVSDIQTIPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETTELKELNT QWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAE EEEYLERDFEYKTP DELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLTN YQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNEVEFKLKTENIPGGAEI SEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDELINEELETFSNRWRELHEEAVR RQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLT SHEISLEEMKKHNQGEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQK PANFEQRLQES KMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIV QKKQTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTE

WLAATDMELTKRSAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTV
 LGKKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFDQNVDHITKWIIQA
 DTLLESEKKKPQQKEDVLKRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVE
 PQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLLPLEAEIQQGVNLKEEDFNK
 DMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRRK
 KALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEELN
 AVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMM
 VMTEDMPLISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLC AKDFEDLFKQEE SLKNI
 KDSLQQSSGRIDIIH SKKTAALQSATPVERVKLQEALSQ LDFQWEKVNKMYKDRQG
 RFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIG
 QRQTVVRTLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSNLRWQEVCKQLSDRKKRLEE QK
 NILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQKLEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQ
 LNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLE
 KKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEILSK
 GQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKA VNRLQLELRAKQPD LAPGLTTIGASPTQTV
 TLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVM
 VGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERIQ
 NQWDEVQEHLQNRREQNLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYT
 VDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENINA
 SWRSIHKRVSEREA ALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWL TEAETTANVLQDATRKERLL
 EDSKGVKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDN
 MNFKWSELRRKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDF
 PAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPREL PPEER
 AQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKL RQ
 AEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLS
 PYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISP
 NKVPYYINHETQTTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLD
 LLSLSAACDALDQHNLKQNDQPM DILQIINCLTTIYDRLEQEHN NLVNVPLCVD MCL
 NWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGII SLCKAHLEDKYRYL FKQVASSTGFCDQRR LGL
 LLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVW
 LPVLHRVAAAETA KHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHK
 MHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNM
 ETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLND SISPNESI
 DDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGELERILADLEEENRNLQAEY
 DRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILED

HNKQLESQHLRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTS
SMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

В данной области известны различные другие изоформы дистрофина, которые являются результатом альтернативного сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления конструкции содержат нуклеотидные последовательности, указанные в таблице 2, или их части.

Также в настоящем документе описана нуклеотидная последовательность, кодирующая полноразмерный белок дистрофина.

Таблица 2. Нуклеотидная последовательность полноразмерного белка дистрофина (изоформа Dp427m).

SEQ ID NO: 2
GGGATTCCCTCACTTTCCCCCTACAGGACTCAGATCTGGGAGGCAATTACCTTCGG AGAAAAACGAATAGGAAAACTGAAGTGTTACTTTTTTTAAAGCTGCTGAAGTTT GTTGGTTTCTCATTGTTTTTAAGCCTACTGGAGCAATAAAGTTTGAAGAACTTTTA CCAGGTTTTTTTTATCGCTGCCTTGATATACACTTTTCAAATGCTTTGGTGGGAAG AAGTAGAGGACTGTTATGAAAGAGAAGATGTTCAAAGAAAACATTCACAAAAT GGGTAAATGCACAATTTTCTAAGTTTGGGAAGCAGCATATTGAGAACCTCTTCAGT GACCTACAGGATGGGAGGCGCCTCCTAGACCTCCTCGAAGGCCTGACAGGGCAAA AACTGCCAAAAGAAAAGGATCCACAAGAGTTCATGCCCTGAACAATGTCAACA AGGCACTGCGGGTTTTGCAGAACATAATGTTGATTTAGTGAATATTGGAAGTAC TGACATCGTAGATGGAAATCATAAACTGACTCTTGGTTTGATTTGGAATATAATCC TCCACTGGCAGGTCAAAAATGTAATGAAAAATATCATGGCTGGATTGCAACAAAC CAACAGTGAAAAGATTCTCCTGAGCTGGGTCCGACAATCAACTCGTAATTATCCA CAGGTTAATGTAATCAACTTCACCACCAGCTGGTCTGATGGCCTGGCTTTGAATGC TCTCATCCATAGTCATAGGCCAGACCTATTTGACTGGAATAGTGTGGTTTGCCAGC AGTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATTCAACATCGCCAGATATCAATTAGG CATAGAGAACTACTCGATCCTGAAGATGTTGATACCACCTATCCAGATAAGAAG TCCATCTTAATGTACATCACATCACTCTTCCAAGTTTTGCCTCAACAAGTGAGCAT TGAAGCCATCCAGGAAGTGGAATGTTGCCAAGGCCACCTAAAGTGAATAAGA AGAACATTTTCAGTTACATCATCAAATGCACTATTCTCAACAGATCACGGTCAGTC TAGCACAGGGATATGAGAGAACTTCTTCCCCTAAGCCTCGATTCAAGAGCTATGC CTACACACAGGCTGCTTATGTCACCACCTCTGACCCTACACGGAGCCCATTTCCTT CACAGCATTTGGAAGCTCCTGAAGACAAGTCATTTGGCAGTTCATTGATGGAGAG TGAAGTAAACCTGGACCGTTATCAAACAGCTTTAGAAGAAGTATTATCGTGGCTT CTTTCTGCTGAGGACACATTGCAAGCACAAAGGAGAGATTTCTAATGATGTGGAAG

TGGTGAAAGACCAGTTTCATACTCATGAGGGGTACATGATGGATTTGACAGCCCA
 TCAGGGCCGGGTTGGTAATATTCTACAATTGGGAAGTAAGCTGATTGGAACAGGA
 AAATTATCAGAAGATGAAGAACTGAAGTACAAGAGCAGATGAATCTCCTAAATT
 CAAGATGGGAATGCCTCAGGGTAGCTAGCATGGAAAAACAAAGCAATTTACATA
 GAGTTTTAATGGATCTCCAGAATCAGAACTGAAAGAGTTGAATGACTGGCTAAC
 AAAAACAGAAGAAAGAACAAGGAAAATGGAGGAAGAGCCTCTTGGACCTGATCT
 TGAAGACCTAAAACGCCAAGTACAACAACATAAGGTGCTTCAAGAAGATCTAGA
 ACAAGAACAAGTCAGGGTCAATTCTCTCACTCACATGGTGGTGGTAGTTGATGAA
 TCTAGTGGAGATCACGCAACTGCTGCTTTGGAAGAACAACCTTAAGGTATTGGGAG
 ATCGATGGGCAAACATCTGTAGATGGACAGAAGACCGCTGGGTTCTTTTACAAGA
 CATCCTTCTCAAATGGCAACGTCTTACTGAAGAACAGTGCCTTTTTAGTGCATGGC
 TTTCAGAAAAAGAAGATGCAGTGAACAAGATTCACACAACCTGGCTTTAAAGATCA
 AAATGAAATGTTATCAAGTCTTCAAAAACCTGGCCGTTTTTAAAAGCGGATCTAGAA
 AAGAAAAAGCAATCCATGGGCAAACCTGTATTCACTCAAACAAGATCTTCTTTCAA
 CACTGAAGAATAAGTCAGTGACCCAGAAGACGGAAGCATGGCTGGATAACTTTGC
 CCGGTGTTGGGATAATTTAGTCCAAAAACCTTGAAAAGAGTACAGCACAGATTTCA
 CAGGCTGTCACCACCACTCAGCCATCACTAACACAGACAACCTGTAATGGAAACAG
 TAACTACGGTGACCACAAGGGAACAGATCCTGGTAAAGCATGCTCAAGAGGAACT
 TCCACCACCACCTCCCCAAAAGAAGAGGCAGATTACTGTGGATTCTGAAATTAGG
 AAAAGGTTGGATGTTGATATAACTGAACTTCACAGCTGGATTACTCGCTCAGAAG
 CTGTGTTGCAGAGTCCTGAATTTGCAATCTTTCGGAAGGAAGGCAACTTCTCAGAC
 TTAAAAGAAAAAGTCAATGCCATAGAGCGAGAAAAAGCTGAGAAGTTCAGAAAA
 CTGCAAGATGCCAGCAGATCAGCTCAGGCCCTGGTGGAACAGATGGTGAATGAGG
 GTGTTAATGCAGATAGCATCAAACAAGCCTCAGAACAACCTGAACAGCCGGTGGAT
 CGAATTCTGCCAGTTGCTAAGTGAGAGACTTAACTGGCTGGAGTATCAGAACAAC
 ATCATCGCTTTCTATAATCAGCTACAACAATTGGAGCAGATGACAACCTACTGCTGA
 AAACCTGGTTGAAAATCCAACCCACCACCCCATCAGAGCCAACAGCAATTAAAAGT
 CAGTTAAAAATTTGTAAGGATGAAGTCAACCGGCTATCAGGTCTTCAACCTCAA
 TTGAACGATTAAAAATTCAAAGCATAGCCCTGAAAGAGAAAGGACAAGGACCCA
 TGTTCCCTGGATGCAGACTTTGTGGCCTTTACAAATCATTTTAAGCAAGTCTTTTCTG
 ATGTGCAGGCCAGAGAGAAAGAGCTACAGACAATTTTTGACACTTTGCCACCAAT
 GCGCTATCAGGAGACCATGAGTGCCATCAGGACATGGGTCCAGCAGTCAGAAACC
 AAACCTCTCCATACCTCAACTTAGTGTCACCGACTATGAAATCATGGAGCAGAGAC
 TCGGGGAATTGCAGGCTTTACAAAGTTCTCTGCAAGAGCAACAAAGTGGCCTATA
 CTATCTCAGCACCACTGTGAAAGAGATGTGGAAGAAAGCGCCCTCTGAAATTAGC

CGGAAATATCAATCAGAATTTGAAGAAATTGAGGGACGCTGGAAGAAGCTCTCCT
 CCCAGCTGGTTGAGCATTGTCAAAAGCTAGAGGAGCAAATGAATAAACTCCGAAA
 AATTCAGAATCACATACAAACCCTGAAGAAATGGATGGCTGAAGTTGATGTTTTT
 CTGAAGGAGGAATGGCCTGCCCTTGGGGATTTCAGAAATTCTAAAAAAGCAGCTGA
 AACAGTGCAGACTTTTAGTCAGTGATATTCAGACAATTCAGCCCAGTCTAAACAG
 TGTCAATGAAGGTGGGCAGAAGATAAAGAATGAAGCAGAGCCAGAGTTTGCTTC
 GAGACTTGAGACAGAACTCAAAGAACTTAACACTCAGTGGGATCACATGTGCCAA
 CAGGTCTATGCCAGAAAGGAGGCCCTTGAAGGGAGGTTTGGAGAAAACCTGTAAGC
 CTCCAGAAAGATCTATCAGAGATGCACGAATGGATGACACAAGCTGAAGAAGAG
 TATCTTGAGAGAGATTTTGAATATAAAACTCCAGATGAATTACAGAAAGCAGTTG
 AAGAGATGAAGAGAGCTAAAGAAGAGGCCCAACAAAAAGAAGCGAAAGTGAAA
 CTCCTTACTGAGTCTGTAAATAGTGTCTAGCTCAAGCTCCACCTGTAGCACAAGA
 GGCCTTAAAAAAGGAACTTGAAACTCTAACCACCAACTACCAGTGGCTCTGCACT
 AGGCTGAATGGGAAATGCAAGACTTTGGAAGAAGTTTGGGCATGTTGGCATGAGT
 TATTGTCATACTTGAGAGAAAGCAAACAAGTGGCTAAATGAAGTAGAATTTAACT
 TAAAACCACTGAAAACATTCCTGGCGGAGCTGAGGAAATCTCTGAGGTGCTAGAT
 TCACTTGAAAATTTGATGCGACATTCAGAGGATAACCCAAATCAGATTCGCATATT
 GGCACAGACCCTAACAGATGGCGGAGTCATGGATGAGCTAATCAATGAGGAACTT
 GAGACATTTAATTCTCGTTGGAGGGAACTACATGAAGAGGCTGTAAGGAGGCAAA
 AGTTGCTTGAACAGAGCATCCAGTCTGCCCAGGAGACTGAAAAATCCTTACACTT
 AATCCAGGAGTCCCTCACATTCATTGACAAGCAGTTGGCAGCTTATATTGCAGAC
 AAGGTGGACGCAGCTCAAATGCCTCAGGAAGCCCAGAAAAATCCAATCTGATTTGA
 CAAGTCATGAGATCAGTTTAGAAGAAATGAAGAAACATAATCAGGGGAAGGAGG
 CTGCCCAAAGAGTCCTGTCTCAGATTGATGTTGCACAGAAAAAATTACAAGATGT
 CTCCATGAAGTTTCGATTATTCCAGAAACCAGCCAATTTTGAGCAGCGTCTACAAG
 AAAGTAAGATGATTTTAGATGAAGTGAAGATGCACTTGCCTGCATTGGAAACAAA
 GAGTGTGGAACAGGAAGTAGTACAGTCACAGCTAAATCATTGTGTGAACTTGTAT
 AAAAGTCTGAGTGAAGTGAAGTCTGAAGTGGAAATGGTGATAAAGACTGGACGT
 CAGATTGTACAGAAAAAGCAGACGGAAAAATCCCAAAGAAGCTTGATGAAAGAGTA
 ACAGCTTTGAAATTGCATTATAATGAGCTGGGAGCAAAGGTAACAGAAAGAAAG
 CAACAGTTGGAGAAATGCTTGAAATTGTCCCGTAAGATGCGAAAGGAAATGAATG
 TCTTGACAGAATGGCTGGCAGCTACAGATATGGAATTGACAAAGAGATCAGCAGT
 TGAAGGAATGCCTAGTAATTTGGATTCTGAAGTTGCCTGGGGAAAGGCTACTCAA
 AAAGAGATTGAGAAACAGAAGGTGCACCTGAAGAGTATCACAGAGGTAGGAGAG
 GCCTTGAAAACAGTTTTTGGGCAAGAAGGAGACGTTGGTGGAAGATAAACTCAGTC

TTCTGAATAGTAACTGGATAGCTGTCACCTCCCGAGCAGAAGAGTGGTTAAATCTT
 TTGTTGGAATACCAGAAACACATGGAAACTTTTGACCAGAATGTGGACCACATCA
 CAAAGTGGATCATTGAGGCTGACACACTTTTGGATGAATCAGAGAAAAAGAAACC
 CCAGCAAAAAGAAGACGTGCTTAAGCGTTTAAAGGCAGAACTGAATGACATACG
 CCCAAAGGTGGACTCTACACGTGACCAAGCAGCAAACTTGATGGCAAACCGCGGT
 GACCACTGCAGGAAATTAGTAGAGCCCCAAATCTCAGAGCTCAACCATCGATTTG
 CAGCCATTTACACAGAATTAAGACTGGAAAGGCCTCCATTCCTTTGAAGGAATT
 GGAGCAGTTTAACTCAGATATACAAAAATTGCTTGAACCACTGGAGGCTGAAATT
 CAGCAGGGGGTGAATCTGAAAGAGGAAGACTTCAATAAAGATATGAATGAAGAC
 AATGAGGGTACTGTAAAAGAATTGTTGCAAAGAGGAGACAACCTTACAACAAAGA
 ATCACAGATGAGAGAAAGAGAGAGGAAATAAAGATAAAACAGCAGCTGTTACAG
 ACAAACATAATGCTCTCAAGGATTTGAGGTCTCAAAGAAGAAAAAAGGCTCTAG
 AAATTTCTCATCAGTGGTATCAGTACAAGAGGCAGGCTGATGATCTCCTGAAATG
 CTTGGATGACATTGAAAAAAAATTAGCCAGCCTACCTGAGCCCAGAGATGAAAGG
 AAAATAAAGGAAATTGATCGGGAATTGCAGAAGAAGAAAGAGGAGCTGAATGCA
 GTGCGTAGGCAAGCTGAGGGCTTGTCTGAGGATGGGGCCGCAATGGCAGTGGAGC
 CAACTCAGATCCAGCTCAGCAAGCGCTGGCGGGAAATTGAGAGCAAATTTGCTCA
 GTTTCGAAGACTCAACTTTGCACAAATTCACACTGTCCGTGAAGAAACGATGATG
 GTGATGACTGAAGACATGCCTTTGGAAATTTCTTATGTGCCTTCTACTTATTTGACT
 GAAATCACTCATGTCTCACAAGCCCTATTAGAAGTGGAACAACCTTCTCAATGCTCC
 TGACCTCTGTGCTAAGGACTTTGAAGATCTCTTTAAGCAAGAGGAGTCTCTGAAG
 AATATAAAAGATAGTCTACAACAAAGCTCAGGTCGGATTGACATTATTCATAGCA
 AGAAGACAGCAGCATTGCAAAGTGCAACGCCTGTGGAAAGGGTGAAGCTACAGG
 AAGCTCTCTCCAGCTTGATTTCCAATGGGAAAAAGTTAACAAAATGTACAAGGA
 CCGACAAGGGCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTTCATTATGAT
 ATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACAC
 AAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAGGAACTCCA
 GGATGGCATTGGGCAGCGGCAAACTGTTGTCAGAACATTGAATGCAACTGGGGAA
 GAAATAATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTATTCTACAGGAAAAAATTGG
 GAAGCCTGAATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAA
 AGAGGCTAGAAGAACAAGAAATATCTTGTCAGAATTTCAAAGAGATTTAAATGA
 ATTTGTTTTATGGTTGGAGGAAGCAGATAACATTGCTAGTATCCCACTTGAACCTG
 GAAAAGAGCAGCAACTAAAAGAAAAGCTTGAGCAAGTCAAGTTACTGGTGGAAG
 AGTTGCCCTGCGCCAGGGAATTCTCAAACAATTAAATGAACTGGAGGACCCGT
 GCTTGTAAGTGCTCCCATAGCCCAGAAGAGCAAGATAAACTTGAAAATAAGCTC

AAGCAGACAAATCTCCAGTGGATAAAGGTTTCCAGAGCTTTACCTGAGAAACAAG
 GAGAAATTGAAGCTCAAATAAAAGACCTTGGGCAGCTTGAAAAAAGCTTGAAG
 ACCTTGAAGAGCAGTTAAATCATCTGCTGCTGTGGTTATCTCCTATTAGGAATCAG
 TTGGAAATTTATAACCAACCAACCAAGAAGGACCATTTGACGTTTCAGGAAACTG
 AAATAGCAGTTCAAGCTAAACAACCGGATGTGGAAGAGATTTTGTCTAAAGGGCA
 GCATTTGTACAAGGAAAAACCAGCCACTCAGCCAGTGAAGAGGAAGTTAGAAGA
 TCTGAGCTCTGAGTGGGAAGGCGGTAAACCGTTTACTTCAAGAGCTGAGGGCAAAG
 CAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCCTCTCCTACTCAGACTGT
 TACTCTGGTGACACAACCTGTGGTTACTAAGGAAACTGCCATCTCCAAACTAGAA
 ATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTGGCAGATTTCAACCGGGCTTG
 GACAGAACTTACCGACTGGCTTTCTCTGCTTGATCAAGTTATAAAATCACAGAGG
 GTGATGGTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAGATGATCATCAAGCAGAAGGCAA
 CAATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCCCCAGTTGGAAGAACTCATTACCGCTGC
 CCAAAATTTGAAAAACAAGACCAGCAATCAAGAGGCTAGAACAATCATTACGGA
 TCGAATTGAAAGAATTCAGAATCAGTGGGATGAAGTACAAGAACACCTTCAGAAC
 CGGAGGCAACAGTTGAATGAAATGTTAAAGGATTCAACACAATGGCTGGAAGCTA
 AGGAAGAAGCTGAGCAGGTCTTAGGACAGGCCAGAGCCAAGCTTGAGTCATGGA
 AGGAGGGTCCCTATACAGTAGATGCAATCCAAAAGAAAATCACAGAAACCAAGC
 AGTTGGCCAAAGACCTCCGCCAGTGGCAGACAAATGTAGATGTGGCAAATGACTT
 GGCCCTGAAACTTCTCCGGGATTATTCTGCAGATGATACCAGAAAAGTCCACATG
 ATAACAGAGAATATCAATGCCTCTTGAGAGAAGCATTCATAAAAGGGTGAGTGAGC
 GAGAGGCTGCTTTGGAAGAACTCATAGATTACTGCAACAGTTCCCCCTGGACCT
 GGAAAAGTTTCTTGCTGGCTTACAGAAGCTGAAACAACCTGCCAATGTCCTACAG
 GATGCTACCCGTAAGGAAAGGCTCCTAGAAGACTCCAAGGGAGTAAAAGAGCTG
 ATGAAACAATGGCAAGACCTCCAAGGTGAAATTGAAGCTCACACAGATGTTTATC
 ACAACCTGGATGAAAACAGCCAAAAAATCCTGAGATCCCTGGAAGGTTCCGATGA
 TGCAGTCCTGTTACAAAGACGTTTGGATAACATGAACTTCAAGTGGAGTGAACCT
 CGGAAAAAGTCTCTCAACATTAGGTCCCATTGGAAGCCAGTTCTGACCAGTGGA
 AGCGTCTGCACCTTTCTCTGCAGGAACCTTCTGGTGTGGCTACAGCTGAAAGATGAT
 GAATTAAGCCGGCAGGCACCTATTGGAGGCGACTTTCCAGCAGTTCAGAAGCAGA
 ACGATGTACATAGGGCCTTCAAGAGGGAATTGAAAACCTAAAGAACCTGTAATCAT
 GAGTACTCTTGAGACTGTACGAATATTTCTGACAGAGCAGCCTTTGGAAGGACTA
 GAGAACTCTACCAGGAGCCCAGAGAGCTGCCTCCTGAGGAGAGAGCCCAGAAT
 GTCACTCGGCTTCTACGAAAGCAGGCTGAGGAGGTCAATACTGAGTGGGAAAAAT
 TGAACCTGCACTCCGCTGACTGGCAGAGAAAAATAGATGAGACCCTTGAAAGACT

CCAGGAACTTCAAGAGGCCACGGATGAGCTGGACCTCAAGCTGCGCCAAGCTGAG
 GTGATCAAGGGATCCTGGCAGCCCGTGGGCGATCTCCTCATTGACTCTCTCCAAGA
 TCACCTCGAGAAAGTCAAGGCACTTCGAGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAAC
 GTGAGCCACGTCAATGACCTTGCTCGCCAGCTTACCACTTTGGGCATTGAGCTCTC
 ACCGTATAACCTCAGCACTCTGGAAGACCTGAACACCAGATGGAAGCTTCTGCAG
 GTGGCCGTCGAGGACCGAGTCAGGCAGCTGCATGAAGCCCACAGGGACTTTGGTC
 CAGCATCTCAGCACTTTCTTTCCACGTCTGTCCAGGGTCCCTGGGAGAGAGCCATC
 TCGCCAAACAAAGTGCCCTACTATATCAACCACGAGACTCAAACAACCTTGCTGGG
 ACCATCCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAG
 ATTCTCAGCTTATAGGACTGCCATGAAACTCCGAAGACTGCAGAAGGCCCTTTGCT
 TGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCTGCATGTGATGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAG
 CAAAATGACCAGCCCATGGATATCCTGCAGATTATTAATTGTTTGACCACTATTTA
 TGACCGCCTGGAGCAAGAGCACAACAATTTGGTCAACGTCCCTCTCTGCGTGGAT
 ATGTGTCTGAACTGGCTGCTGAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCC
 GTGTCCTGTCTTTTAAACTGGCATCATTTCCCTGTGTAAAGCACATTTGGAAGAC
 AAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACAGGATTTTGTGACCAGC
 GCAGGCTGGGCCTCCTTCTGCATGATTCTATCCAAATTCCAAGACAGTTGGGTGAA
 GTTGCATCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCAAGTGTCCGGAGCTGCTTCCAATT
 TGCTAATAATAAGCCAGAGATCGAAGCGGCCCTCTTCCTAGACTGGATGAGACTG
 GAACCCCAGTCCATGGTGTGGCTGCCCCGTCTGCACAGAGTGGCTGCTGCAGAAA
 CTGCCAAGCATCAGGCCAAATGTAACATCTGCAAAGAGTGTCCAATCATTGGATT
 CAGGTACAGGAGTCTAAAGCACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTT
 CTGGTCGAGTTGCAAAAGGCCATAAAATGCACTATCCCATGGTGGAAATATTGCAC
 TCCGACTACATCAGGAGAAGATGTTCGAGACTTTGCCAAGGTACTAAAAACAAA
 TTTCGAACCAAAAGGTATTTTGCGAAGCATCCCCGAATGGGCTACCTGCCAGTGC
 AGACTGTCTTAGAGGGGGACAACATGGAAACTCCCGTTACTCTGATCAACTTCTG
 GCCAGTAGATTCTGCGCCTGCCTCGTCCCCTCAGCTTTCACACGATGATACTCATT
 CACGCATTGAACATTATGCTAGCAGGCTAGCAGAAATGGAAAACAGCAATGGATC
 TTATCTAAATGATAGCATCTCTCCTAATGAGAGCATAGATGATGAACATTTGTAA
 TCCAGCATTACTGCCAAAGTTTGAACCAGGACTCCCCCTGAGCCAGCCTCGTAGT
 CCTGCCCAGATCTTGATTTCTTAGAGAGTGAGGAAAGAGGGGAGCTAGAGAGAA
 TCCTAGCAGATCTTGAGGAAGAAAACAGGAATCTGCAAGCAGAATATGACCGTCT
 AAAGCAGCAGCACGAACATAAAGGCCTGTCCCCACTGCCGTCCCCTCCTGAAATG
 ATGCCACCTCTCCCCAGAGTCCCCGGGATGCTGAGCTCATTGCTGAGGCCAAGCT
 ACTGCGTCAACACAAAGGCCGCCTGGAAGCCAGGATGCAAATCCTGGAAGACCA

CAATAAACAGCTGGAGTCACAGTTACACAGGCTAAGGCAGCTGCTGGAGCAACCC
 CAGGCAGAGGCCAAAGTGAATGGCACAACGGTGTCTCTCCTTCTACCTCTCTAC
 AGAGGTCCGACAGCAGTCAGCCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTC
 GGACTCCATGGGTGAGGAAGATCTTCTCAGTCCTCCCCAGGACACAAGCACAGGG
 TTAGAGGAGGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGAAGAA
 ATACCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAGGAAGTCTTTTCCACATG
 GCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCCTTAGTATCAGTCATGACAGATGAAG
 AAGGAGCAGAATAAATGTTTTACAACCTCCTGATTCCCGCATGGTTTTTATAATATT
 CATAACAACAAAGAGGATTAGACAGTAAGAGTTTACAAGAAATAAATCTATATTTT
 TGTGAAGGGTAGTGGTATTATACTGTAGATTTTCTAGTATTTCTAAGTCTGTTATTG
 TTTTGTTAACAATGGCAGGTTTTTACACGTCTATGCAATTGTACAAAAAAGTTATAA
 GAAAACCTACATGTAAAATCTTGATAGCTAAATAACTTGCCATTTCTTTATATGGAA
 CGCATTTTGGGTTGTTTAAAAATTTATAACAGTTATAAAGAAAGATTGTAAACTAA
 AGTGTGCTTTATAAAAAAAGTTGTTTATAAAAAACCCCTAAAAACAAAACAAACA
 CACACACACACACATACACACACACACACAAAACCTTTGAGGCAGCGCATTGTTTT
 GCATCCTTTTGGCGTGATATCCATATGAAATTCATGGCTTTTTCTTTTTTTGCATAT
 TAAAGATAAGACTTCCTCTACCACCACACCAAATGACTACTACACACTGCTCATTT
 GAGAAGTGTGAGCTGAGTGGGGCAGGCTTGAGTTTTTCATTTTCATATATCTATATGT
 CTATAAGTATATAAATACTATAGTTATATAGATAAAGAGATACGAATTTCTATAG
 ACTGACTTTTTTCCATTTTTTTAAATGTTTCATGTCACATCCTAATAGAAAGAAATTACT
 TCTAGTCAGTCATCCAGGCTTACCTGCTTGGTCTAGAATGGATTTTTTCCCGGAGCC
 GGAAGCCAGGAGGAAACTACACCACACTAAAACATTGTCTACAGCTCCAGATGTT
 TCTCATTTTAAACAACCTTTCCACTGACAACGAAAGTAAAGTAAAGTATTGGATTTT
 TTAAAGGGAACATGTGAATGAATACACAGGACTTATTATATCAGAGTGAGTAAT
 CGGTTGGTTGGTTGATTGATTGATTGATTGATACATTCAGCTTCCTGCTGCTAGCA
 ATGCCACGATTTAGATTTAATGATGCTTCAGTGGAAATCAATCAGAAGGTATTCTG
 ACCTTGTGAACATCAGAAGGTATTTTTTAACTCCCAAGCAGTAGCAGGACGATGA
 TAGGGCTGGAGGGCTATGGATTCCCAGCCCATCCCTGTGAAGGAGTAGGCCACTC
 TTTAAGTGAAGGATTGGATGATTGTTTATAAATACATAAAGTTCTCTGTAATTACAA
 CTAAATTATTATGCCCTCTTCTCACAGTCAAAAGGAACTGGGTGGTTTGGTTTTTG
 TTGCTTTTTTAGATTTATTGTCCCATGTGGGATGAGTTTTTAAATGCCACAAGACAT
 AATTTAAAATAAATAAACTTTGGGAAAAGGTGTAAGACAGTAGCCCCATCACATT
 TGTGATACTGACAGGTATCAACCCAGAAGCCCATGAACTGTGTTTCCATCCTTTGC
 ATTTCTCTGCGAGTAGTTCCACACAGGTTTGTAAGTAAGTAAGAAAGAAGGCAAA
 TTGATTCAAATGTTACAAAAAACCCTTCTTGGTGGATTAGACAGGTAAATATAT

AAACAAACAAACAAAAATTGCTCAAAAAAGAGGAGAAAAGCTCAAGAGGAAAA
GCTAAGGACTGGTAGGAAAAAGCTTTACTCTTTCATGCCATTTTATTTCTTTTGGAT
TTTTAAATCATTCAATAGATACCACCGTGTGACCTATAATTTTGCAAATCTG
TTACCTCTGACATCAAGTGTAATTAGCTTTTGGAGAGTGGGCTGACATCAAGTGTA
ATTAGCTTTTGGAGAGTGGGTTTTGTCCATTATTAATAATTAATTAATTAACATCA
AACACGGCTTCTCATGCTATTTCTACCTCACTTTGGTTTTGGGGTGTTCCTGATAAT
TGTGCACACCTGAGTTCACAGCTTCACCACTTGTCCATTGCGTTATTTTCTTTTTCC
TTTATAATTCTTTCTTTTTCTTCATAATTTTCAAAAGAAAACCCAAAGCTCTAAGG
TAACAAATTACCAAATTACATGAAGATTTGGTTTTTGTCTTGCAATTTTTTCTTTA
TGTGACGCTGGACCTTTTCTTTACCCAAGGATTTTAAAACTCAGATTTAAACAA
GGGGTTACTTTACATCCTACTAAGAAGTTTAAGTAAGTAAGTTTCATTCTAAAATC
AGAGGTAAATAGAGTGCATAAATAATTTGTTTTAATCTTTTTGTTTTCTTTTAGA
CACATTAGCTCTGGAGTGAGTCTGTCATAATTTGAACAAAAATTGAGAGCTTTA
TTGCTGCATTTTAAGCATAATTAATTTGGACATTATTTTCGTGTTGTGTTCTTTATAA
CCACCGAGTATTAACTGTAAATCATAATGTAAGTGAAGCATAAACATCACATGG
CATGTTTTGTCATTGTTTTTCAGGTACTGAGTTCTTACTTGAGTATCATAATATATTG
TGTTTTAACACCAACACTGTAACATTTACGAATTATTTTTTTAACTTCAGTTTTAC
TGCATTTTCACAACATATCAGACTTCACCAAATATATGCCTTACTATTGTATTATA
GTACTGCTTTACTGTGTATCTCAATAAAGCACGCAGTTATGTTAC

Полноразмерный белок дистрофина дикого типа (изоформа Dp427m) содержит 24 спектриноподобных повтора, по меньшей мере, четыре шарнирных области, активизирующий домен (ABD1), богатый цистеином домен (CR) и С-концевой домен (С-конец). Полипептидная последовательность каждого домена показана в таблице 3, а нуклеотидная последовательность каждого домена показана в таблице 4.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности доменов дистрофина.

Описание и идентификатор последовательности	Последовательность
ABD1 (SEQ ID NO:3)	MLWWEVEEDCYEREDVQKKFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDL QDGRRLDLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNN VDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQ TNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPD LFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDK KSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVE

Шарнир 1 (SEQ ID NO:4)	MLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQQGYERTSSPKPRFKS YAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQHLEAPEDKSFSSLMES
Повтор спектрина 1 (SEQ ID NO:5)	EVNLDTRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFH EGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNL NSRWECLRVASMEKQSNLH
Повтор спектрина 2 (SEQ ID NO:6)	RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEEPLGPDLEDLKRQV QQHKVLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLK VLGDRWANICRWTEDRWVLLQDI
Повтор спектрина 3 (SEQ ID NO:7)	LLKWQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQK LAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDN FARCWDNLVQKLEKSTAQISQA
Шарнир 2 (SEQ ID NO:8)	VTQTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVKHAQEELPPPPQKKRQIT VD
Повтор спектрина 4 (SEQ ID NO:9)	SEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVNA IEREKA EKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNS RWIEFCQLLSERLNLWLEY
Повтор спектрина 5 (SEQ ID NO:10)	QNNIAFYNNQLQQLEQMTTAEENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKD EVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLDADFVAFTNHFQKV FSDVQAREKELQTIFD
Повтор спектрина 6 (SEQ ID NO:11)	TLPPMRYQETMSAIRTWVQQSETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQ ALQSSLQEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEEIEGRW KKLSSQLVEHCQKLEEQ
Повтор спектрина 7 (SEQ ID NO:12)	MNKLRLKIQNHQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQC RLLVSDIQTIPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETTELKELNTQW DHMCQQVYARKEALKGG
Повтор спектрина 8 (SEQ ID NO:13)	LEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAEEYLERDFEYKTPDELQKAVEE MKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLT TNYQWLCTRLNGKCKTLEEV
Повтор спектрина 9 (SEQ ID NO:14)	WACWHELLSYLEKANKWLNEVEFKLKTENIPGGAEIEVLDLSLE NLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDELINEELETFSRWRELHE EAVRRQKLLEQS
Повтор спектрина 10 (SEQ ID NO:15)	IQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAQAQMPQEAQKIQS DLTSHEISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRL

Повтор спектрин 11 (SEQ ID NO:16)	FQKPANFEQRLQESKMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQLNHC VNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKKQTENPKELDERVTALKLH YNELGAKVTERKQQLEKC
Повтор спектрин 12 (SEQ ID NO:17)	LKLSRKMREMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPSNLDSEVA WGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKETLVEDKLSLLNS NWIAVTSRAEEWLNLLLEY
Повтор спектрин 13 (SEQ ID NO:18)	QKHMETFQDQNVHDITKWIIQADTLLDESEKPKPQQKEDVLKRLKA ELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLVEPQISELNHRFAAIS HRIKTGKASIPLK
Повтор спектрин 14 (SEQ ID NO:19)	ELEQFNSDIQKLLPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNEDNEGTVKEL LQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRRKKAL EI
Повтор спектрин 15 (SEQ ID NO:20)	SHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQK KKEELNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQF RRLNFAQ
L3 (20-мерный линкер) (SEQ ID NO:21)	IHTVREETMMVMTEDMPLI
Повтор спектрин 16 (SEQ ID NO:22)	SYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEECLKN IKDSLQSSGRIDIIHKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEK VNKMYKDRQGRFDRS
Повтор спектрин 17 (SEQ ID NO:23)	VEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKE LQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSNLRWQE VCKQLSDRKKRLEEQ
Повтор спектрин 18 (SEQ ID NO:24)	KNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQLKEKLEQVKLL VEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWI KVSRALEKQGEIEAQIKDLGQL
Повтор спектрин 19 (SEQ ID NO:25)	EKKLEDLEEQLNHLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQ AKQPDVEEILSKGQHLKYEKQATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLQ ELRAKQPD
Шарнир 3 (SEQ ID NO:26)	APGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLE
Повтор спектрин 20 (SEQ ID)	VPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIHKQ KATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQ

NO:27)	WDEVQEHLQNRQQLNEM
Повтор спектрина 21 (SEQ ID NO:28)	LKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYTVDAIQKKITET KQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENIN ASWRSIHKRVSEREAALEET
Повтор спектрина 22 (SEQ ID NO:29)	HRLQFPLDLEKFLAWL TEAETTANVLQDATRKERLLED SKGVK ELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQR RLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHLEAS
Повтор спектрина 23 (SEQ ID NO:30)	SDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDV HRAFKRELKTKEPVMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEE RAQNVTRLLRKQAEENVTEWEKLNLSADWQRKIDET
Повтор спектрина 24 (SEQ ID NO:31)	LERLQELQEATDELDLKL RQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKV KALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRW KLLQVAVEDRVRQLHE
Шарнир 4 (SEQ ID NO:32)	AHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPKNVPYYINHETQTTCWDHP KMTELYQSLADLNNVRFSA YRTAMKL
CR (SEQ ID NO:33)	RRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHN LKQNDQPM DILQIINCLTTIY DRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGII SLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRR LGLLLHDSIQIPRQLGE VASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLP VLHRVAAAETA KHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFS GRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFA KHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
С-конец (SEQ ID NO:34)	PVT LINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSY LND SISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEER GELERILADLEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTS PQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDH NKQLESQ LHLRLRQ LLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSTSDSMG EEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности, кодирующие домены дистрофина

Описание идентификатор последовательности	и	Последовательность
5'-нетранслируемая область		gggattccct cactttcccc ctacaggact cagatctggg aggcaattac cttcggagaa 60

(SEQ ID NO:35)	aaacgaatag gaaaaactga agtgttactt ttttaaagc tgctgaagtt tgttggttc 120 tcattgtttt taagcctact ggagcaataa agtttgaaga acttttacca gggtttttt 180 atcgctgcct tgatatacac tttcaaa 208
ABD1 (SEQ ID NO:36)	atgctttggt gggaagaagt agaggactgt tatgaaagag aagatgttca aaagaaaaca 60 ttcacaaaat gggtaaatgc acaattttct aagtttggga agcagcatat tgagaacctc 120 ttcagtgacc tacaggatgg gaggcgcctc ctagacctcc tcgaaggcct gacagggcaa 180 aaactgccaa aagaaaaagg atccacaaga gttcatgccc tgaacaatgt caacaaggca 240 ctgcgggttt tgcagaacaa taatgttgat ttagtgaata ttggaagtac tgacatcgta 300 gatggaaatc ataaactgac tcttggttg atttgaata taactctcca ctggcaggtc 360 aaaaatgtaa tgaaaaatat catggctgga ttgcaacaaa ccaacagtga aaagattctc 420 ctgagctggg tccgacaatc aactcgtaat tatccacagg ttaatgtaat caacttcacc 480 accagctggg ctgatggcct ggctttgaat gctctcatcc atagtcatag gccagacctc 540 tttgactgga atagtgtggt ttgccagcag tcagccacac aacgactgga acatgcattc 600 aacatcgcca gatatcaatt aggcatagag aaactactcg atcctgaaga tgttgatacc 660 acctatccag ataagaagtc catcttaatg tacatcacat cactcttcca agttttgect 720 caacaagtga gcattgaagc catccaggaa gtggaa 756
Шарнир 1 (SEQ ID NO:37)	atgttgccaa ggccacctaa agtgactaaa gaagaacatt ttcagttaca tcatcaaatg 60 cactattctc aacagatcac ggctagctca gcacagggat atgagagaac ttcttccct 120 aagcctcgat tcaagagcta tgcctacaca caggctgctt atgtcaccac ctctgacct 180 acacggagcc catttcttc acagcatttg gaagctcttg aagacaagtc atttggcagt 240 tcattgatgg agagt 255
Повтор спектрина 1 (SEQ ID NO:38)	gaagtaaacc tggaccgtta tcaaacagct ttagaagaag tattatcggt gcttcttct 60 gctgaggaca cattgcaagc acaaggagag atttctaatt atgtggaagt ggtgaaagac

		120 cagtttcata ctcatgaggg gtacatgatg gatttgacag cccatcaggg ccgggttggt 180 aatattctac aattgggaag taagctgatt ggaacaggaa aattatcaga agatgaagaa 240 actgaagtac aagagcagat gaatctccta aattcaagat gggaatgcct cagggtagct 300 agcatggaaa aacaagcaa ttacat 327
Повтор спектрина (SEQ ID NO:39)	2	agagttttaa tggatctcca gaatcagaaa ctgaaagagt tgaatgactg gctaacaaaa 60 acagaagaaa gaacaaggaa aatggaggaa gagcctcttg gacctgatct tgaagacctt 120 aaacgccaag tacaacaaca taaggtgctt caagaagatc tagaacaaga acaagtcagg 180 gtcaattctc tcaactacat ggtggtggta gttgatgaat ctagtggaga tcacgcaact 240 gctgctttgg aagaacaact taaggtattg ggagatcgat gggcaaacat ctgtagatgg 300 acagaagacc gctgggttct ttacaagac atc 333
Повтор спектрина (SEQ ID NO:40)	3	cttctcaaat ggcaacgtct tactgaagaa cagtgccttt ttagtgcattg gctttcagaa 60 aaagaagatg cagtgaacaa gattcacaca actggcttta aagatcaaaa tgaatgtta 120 tcaagtcttc aaaaactggc cgttttaaaa gcggatctag aaaagaaaaa gcaatccatg 180 ggcaaaactgt attcactcaa acaagatctt cttcaacac tgaagaataa gtcagtgacc 240 cagaagacgg aagcatggct ggataacttt gcccggtgtt gggataattt agtccaaaaa 300 cttgaaaaga gtacagcaca gatttcacag gct 333
Шарнир 2 (SEQ ID NO:41)		gtcaccacca ctacgccatc actaacacag acaactgtaa tggaaacagt aactacggtg 60 accacaaggg aacagatcct ggtaaagcat gctcaagagg aactccacc accacctccc 120 caaaagaaga ggcagattac tgtggat 147
Повтор спектрина	4	tctgaaatta ggaaaaggtt ggatgttgat ataactgaac ttcacagctg gattactcgc 60

(SEQ ID NO:42)	tcagaagctg tgttcagag tcctgaattt gcaatcttc ggaaggaagg caacttctca 120 gacttaaaag aaaaagtcaa tgccatagag cgagaaaaag ctgagaagtt cagaaaactg 180 caagatgcca gcagatcagc tcaggccctg gtggaacaga tggatgaatga ggggtgtaat 240 gcagatagca tcaaacaagc ctcaagaaca ctgaacagcc ggtggatcga attctgccag 300 ttgctaagtg agagacttaa ctggctggag tat 333
Повтор спектрина 5 (SEQ ID NO:43)	cagaacaaca tcatcgcttt ctataatcag ctacaacaat tggagcagat gacaactact 60 gctgaaaact gggtgaaaat ccaaccacc accccatcag agccaacagc aattaaaagt 120 cagttaaaaa ttgtaagga tgaagtcaac cggctatcag gtcttcaacc tcaaattgaa 180 cgattaaaaa ttcaaagcat agccctgaaa gagaaaggac aaggacccat gttctggat 240 gcagactttg tggcctttac aaatcatttt aagcaagtct tttctgatgt gcaggccaga 300 gagaaagagc tacagacaat ttttgac 327
Повтор спектрина 6 (SEQ ID NO:44)	actttgccac caatgcgcta tcaggagacc atgagtgcc a tcaggacatg ggtccagcag 60 tcagaaacca aactctccat acctcaactt agtgtcaccg actatgaaat catggagcag 120 agactcgggg aattgcaggc ttacaaagt tctctgcaag agcaacaaag tggcctatac 180 tatctcagca ccaactgtgaa agagatgtcg aagaaagcgc cctctgaaat tagccggaaa 240 tatcaatcag aatttgaaga aattgaggga cgctggaaga agctctcctc ccagctggtt 300 gagcattgtc aaaagctaga ggagcaa 327
Повтор спектрина 7 (SEQ ID NO:45)	atgaataaac tccgaaaaat tcagaatcac atacaaccc tgaagaaatg gatggctgaa 60 gttgatgttt ttctgaagga ggaatggcct gcccttgggg attcagaaat tctaaaaag 120 cagctgaaac agtgcagact ttagtcagt gatattcaga caattcagcc cagtctaaac 180

		agtgtcaatg aaggtgggca gaagataaag aatgaagcag agccagagtt tgcttcgaga 240 cttgagacag aactcaaaga acttaacact cagtgggatc acatgtgccca acaggtctat 300 gccagaaagg aggccttgaa gggaggt 327
Повтор спектрина (SEQ ID NO:46)	8	ttggagaaaa ctgtaagcct ccagaaagat ctatcagaga tgcacgaatg gatgacacaa 60 gctgaagaag agtatcttga gagagatttt gaatataaaa ctccagatga attacagaaa 120 gcagttgaag agatgaagag agctaaagaa gaggcccaac aaaaagaagc gaaagtgaaa 180 ctccttactg agtctgtaaa tagtgtcata gctcaagctc cacctgtagc acaagaggcc 240 ttaaaaaagg aacttgaaac tctaaccacc aactaccagt ggctctgcac taggctgaat 300 gggaaatgca agactttgga agaagtt 327
Повтор спектрина (SEQ ID NO:47)	9	tgggcatggt ggcatgagtt attgtcatac ttggagaaag caaacaagtg gctaaatgaa 60 gtagaattta aacttaaac cactgaaaac attcctggcg gagctgagga aatctctgag 120 gtgctagatt cacttgaaaa ttgatgcga cattcagagg ataacccaaa tcagattcgc 180 atattggcac agaccctaac agatggcgga gtcattgatg agctaataa tgaggaactt 240 gagacattta attctcgttg gagggaaacta catgaagagg ctgtaaggag gcaaaagttg 300 cttgaacaga gc 312
Повтор спектрина (SEQ ID NO:48)	10	atccagtctg cccaggagac tgaaaaatcc ttacacttaa tccaggagtc cctcacattc 60 attgacaagc agttggcagc ttatattgca gacaaggtgg acgcagctca aatgcctcag 120 gaagcccaga aaatccaatc tgatttgaca agtcatgaga tcagtttaga agaaatgaag 180 aaacataatc aggggaagga ggctgcccaa agagtctgt ctcagattga tgttcacag 240

		aaaaaattac aagatgtctc catgaagttt cgatta 276
Повтор спектрина (SEQ ID NO:49)	11	ttccagaaac cagccaattt tgagcagcgt ctacaagaaa gtaagatgat ttagatgaa 60 gtgaagatgc acttgccctgc attggaaaca aagagtgtgg aacaggaagt agtacagtca 120 cagctaaatc atttgttgaa cttgtataaa agtctgagtg aagtgaagtc tgaagtggaa 180 atggtgataa agactggacg tcagattgta cagaaaaagc agacggaaaa tcccaaagaa 240 cttgatgaaa gagtaacagc ttgaaattg cattataatg agctgggagc aaaggttaaca 300 gaaagaaaagc aacagttgga gaaatgc 327
Повтор спектрина (SEQ ID NO:50)	12	ttgaaattgt cccgtaagat gcgaaaggaa atgaatgtct tgacagaatg gctggcagct 60 acagatatgg aattgacaaa gagatcagca gttgaaggaa tgcctagtaa tttggattct 120 gaagttgcct ggggaaaggc tactcaaaaa gagattgaga aacagaaggt gcacctgaag 180 agtatcacag aggtaggaga ggccttgaaa acagttttgg gcaagaagga gacgttggtg 240 gaagataaac tcagtcttct gaatagtaac tggatagctg tcacctcccg agcagaagag 300 tggttaaatc tttgttgga atac 324
Повтор спектрина (SEQ ID NO:51)	13	cagaaacaca tggaacttt tgaccagaat gtggaccaca tcacaaagtg gatcattcag 60 gctgacacac ttttgatga atcagagaaa aagaaacccc agcaaaaaga agacgtgctt 120 aagcgtttaa aggcagaact gaatgacata cgcccaaagg tggactctac acgtgaccaa 180 gcagcaaact tgatggcaaa ccgcggtgac cactgcagga aattagtaga gcccacaaatc 240 tcagagctca accatcgatt tgcagccatt tcacacagaa ttaagactgg aaaggcctcc 300 attcctttga ag 312
Повтор спектрина	14	gaattggagc agtttaactc agatatacaa aaattgcttg aaccactgga ggctgaaatt 60

(SEQ ID NO:52)	cagcagggggg tgaatctgaa agaggaagac ttcaataaag atatgaatga agacaatgag 120 ggtactgtaa aagaattgtt gcaaagagga gacaacttac aacaaagaat cacagatgag 180 agaaagagag aggaaataaa gataaaacag cagctgttac agacaaaaca taatgctctc 240 aaggatttga ggtctcaaag aagaaaaaag gctctagaaa tt 282
Повтор спектрина 15 (SEQ ID NO:53)	ttctatcagt ggtatcagta caagaggcag gctgatgac tcctgaaatg cttggatgac 60 attgaaaaaa aattagccag cctacctgag cccagagatg aaaggaaaat aaaggaaatt 120 gatcgggaat tgcagaagaa gaaagaggag ctgaatgcag tgcgtaggca agctgagggc 180 ttgtctgagg atggggccgc aatggcagtg gagccaactc agatccagct cagcaagcgc 240 tggcgggaaa ttgagagcaa atttgcctcag ttctgaagac tcaactttgc acaa 294
L3 (20-мерный линкер)(SEQ ID NO:54)	attcacactg tccgtgaaga aacgatgatg gtgatgactg aagacatgcc ttggaaatt 60
Повтор спектрина 16 (SEQ ID NO:55)	ttctatgtgc ctctactta ttgactgaa atcactcatg tctcacaagc cctattagaa 60 gtggaacaac ttctaatgc tctgacctc tgtgctaagg actttgaaga tctctttaag 120 caagaggagt ctctgaagaa tataaaagat agtctacaac aaagctcagg tcggattgac 180 attattcata gcaagaagac agcagcattg caaagtgcaa cgctgtgga aagggtgaag 240 ctacaggaag ctctctccca gcttgatttc caatgggaaa aagttaacaa aatgtacaag 300 gaccgacaag ggcgatttga cagatct 327
Повтор спектрина 17 (SEQ ID NO:56)	gttgagaaat ggcggcgttt tcattatgat ataaagatat ttaatcagtg gctaacagaa 60 gctgaacagt ttctcagaaa gacacaaatt cctgagaatt gggaacatgc taaatacaaa 120 tggtatctta aggaactcca ggatggcatt gggcagcggc aaactgttgt cagaacattg 180 aatgcaactg gggaagaaat aattcagcaa tctcaaaaa cagatgccag tattctacag 240 gaaaaattgg gaagcctgaa tctgcggtgg caggaggtct gcaaacagct

		gtcagacaga 300 aaaaagaggc tagaagaaca a 321
Повтор спектрина (SEQ ID NO:57)	18	aagaatatct tgcagaatt tcaaagagat ttaatgaat ttgtttatg gttggaggaa 60 gcagataaca ttgctagtat cccacttgaa cctggaaaag agcagcaact aaaagaaaag 120 cttgagcaag tcaagttact ggtggaagag ttgccctgc gccagggaat tctcaaaaa 180 ttaatgaaa ctggaggacc cgtgcttgta agtgctccca taagcccaga agagcaagat 240 aaactgaaa ataagctcaa gcagacaaat ctccagtgga taaaggtttc cagagcttta 300 cctgagaaac aaggagaaat tgaagctcaa ataaaagacc ttgggcagct t 351
Повтор спектрина (SEQ ID NO:58)	19	gaaaaaaagc ttgaagacct tgaagagcag ttaatcatc tgctgctgtg gttatctct 60 attaggaatc agttggaaat ttataacaa ccaaaccaag aaggaccatt tgacgttcag 120 gaaactgaaa tagcagttca agctaaacaa ccggatgtgg aagagatttt gtctaaaggg 180 cagcatttgt acaaggaaaa accagccact cagccagtga agaggaagtt agaagatctg 240 agctctgagt ggaaggcggg aaaccgttta cttcaagagc tgagggcaaa gcagcctgac 300 cta 303
Шарнир 3 (SEQ ID NO:59)		gctcctggac tgaccactat tggagcctct cctactcaga ctgttactct ggtgacacaa 60 cctgtgggta ctaaggaaac tgccatctcc aaactagaaa tgccatcttc ctgatgttg 120 gag 123
Повтор спектрина (SEQ ID NO:60)	20	gtacctgctc tggcagattt caaccgggct tggacagaac ttaccgactg gctttctctg 60 cttgatcaag ttataaaatc acagagggtg atggtgggtg acctgagga tatcaacgag 120 atgatcatca agcagaaggc aacaatgcag gatttggaaac agaggcgtcc ccagttggaa 180 gaactcatta ccgctgcccc aaatttgaaa aacaagacca gcaatcaaga ggctagaaca 240 atcattacgg atcgaattga aagaattcag aatcagtggg atgaagtaca agaacacctt 300 cagaaccgga ggcaacagtt gaatgaaatg 330

Повтор спектрина 21 (SEQ ID NO:61)	ttaaaggatt caacacaatg gctggaagct aaggaagaag ctgagcaggt ctaggacag 60 gccagagcca agcttgagtc atggaaggag ggtccctata cagtagatgc aatccaaaag 120 aaaatcacag aaaccaagca gttggccaaa gacctccgcc agtggcagac aatgtagat 180 gtggcaaatg acttggccct gaaacttctc cgggattatt ctgcagatga taccagaaaa 240 gtccacatga taacagagaa tatcaatgcc tcttgagaaa gcattcataa aagggtgagt 300 gagegagagg ctgctttgga agaaaact 327
Повтор спектрина 22 (SEQ ID NO:62)	catagattac tgcaacagtt cccctggac ctggaaaagt ttctgcctg gttacagaa 60 gctgaaacaa ctgccaatgt cctacaggat gctacccgta aggaaaggct ctagaagac 120 tccaaggagg taaaagagct gatgaaacaa tggcaagacc tccaaggtga aattgaagct 180 cacacagatg ttatcacaa cctggatgaa aacagccaaa aaatcctgag atccctggaa 240 ggttccgatg atgcagtcct gttacaaga cgtttggata acatgaactt caagtggagt 300 gaacttcgga aaaagtctct caacattagg tcccatttgg aagccagt 348
Повтор спектрина 23 (SEQ ID NO:63)	tctgaccagt ggaagcgtct gcaccttct ctgcaggaac ttctggtgtg gctacagctg 60 aaagatgatg aattaagccg gcaggcacct attggaggcg actttccagc agttcagaag 120 cagaacgatg tacatagggc ctcaagagg gaattgaaaa ctaaagaacc tgtaatcatg 180 agtactcttg agactgtacg aatatttctg acagagcagc ctttgggaagg actagagaaa 240 ctctaccagg agcccagaga gctgcctcct gaggagagag ccagaatgt cactcggctt 300 ctacgaaagc aggctgagga ggtcaatact gagtgggaaa aattgaacct gcactccgct 360 gactggcaga gaaaaataga tgagacc 387
Повтор спектрина 24 (SEQ ID NO:64)	ctgaaagac tccaggaact tcaagaggcc acggatgagc tggacctcaa gctgcgcca 60

	gctgaggtga tcaagggatc ctggcagccc gtgggcgatc tcctcattga ctctctccaa 120 gatcacctcg agaaagtcaa ggcacttcga ggagaaattg cgcctctgaa agagaacgtg 180 agccacgtca atgaccttgc tcgccagctt accactttgg gcattcagct ctcaccgtat 240 aacctcagca ctctggaaga cctgaacacc agatggaagc ttctgcaggt ggccgtcgag 300 gaccgagtca ggcagctgca tgaa 324
Шарнир 4 (SEQ ID NO:65)	gcccacaggg actttgggcc agcatctcag cactttcttt ccacgtctgt ccagggtccc 60 tgggagagag ccatctcgcc aaacaaagtg ccctactata tcaaccacga gactcaaaca 120 acttgctggg accatcccaa aatgacagag ctctaccagt ctttagctga cctgaataat 180 gtcagattct cagcttatag gactgccatg aaactc 216
CR (SEQ ID NO:66)	cgaagactgc agaaggccct ttgcttggat ctcttgagcc tgtcagctgc atgtgatgcc 60 ttggaccagc acaacctcaa gcaaatgac cagcccatgg atatcctgca gattattaat 120 tgtttgacca ctatttatga ccgcctggag caagagcaca acaatttggc caacgtccct 180 ctctgcgtgg atatgtgtct gaactggctg ctgaatgttt atgatacggg acgaacaggg 240 aggatccgtg tcctgtcttt taaaactggc atcatttccc tgtgtaaagc acatttggaa 300 gacaagtaca gatacctttt caagcaagtg gcaagtcaa caggattttg tgaccagegc 360 aggctggggc tccttctgca tgattctatc caaattccaa gacagtggg tgaagttgca 420 tcctttgggg gcagtaacat tgagccaagt gtccggagct gcttccaatt tgctaataat 480 aagccagaga tcgaageggc cctcttcta gactggatga gactggaacc ccagtccatg 540 gtgtggctgc ccgtcctgca cagagtggct gctgcagaaa ctgccaagca tcaggccaaa 600 tgtaacatct gcaaagagtg tccaatcatt ggattcaggt acaggagtct aaagcacttt

	660 aattatgaca tctgccaaag ctgcttttt tctggtcgag ttgcaaaagg ccataaaatg 720 cactatccca tgggtggaata ttgcactccg actacatcag gagaagatgt tcgagacttt 780 gccaaggtac taaaaaaca atttcgaacc aaaaggtatt ttgcgaagca tccccgaatg 840 ggctacctgc cagtgcagac tgtcttagag ggggacaaca tggaaact
С-конец (SEQ ID NO:67)	cccgttactc tgatcaactt ctggccagta gattctgcgc ctgcctcgtc ccctcagctt 60 tcacacgatg atactcattc acgcattgaa cattatgcta gcaggctagc agaaatggaa 120 aacagcaatg gatcttatct aaatgatagc atctctccta atgagagcat agatgatgaa 180 catttgtaa tccagcatta ctgccaaagt ttgaaccagg actccccct gagccagcct 240 cgtagtctcg ccagatctt gatttccta gagagtgagg aaagagggga gctagagaga 300 atcctagcag atcttgagga agaaaacagg aatctgcaag cagaatatga ccgtctaaag 360 cagcagcacg aacataaagg cctgtcccca ctgccgtccc ctctgaaat gatgccacc 420 tctcccaga gtccccggga tgctgagctc attgctgagg ccaagctact gcgtcaacac 480 aaaggccgcc tggaagccag gatgcaaatc ctggaagacc acaataaaca gctggagtca 540 cagttacaca ggctaaggca gctgctggag caaccccagg cagaggccaa agtgaatggc 600 acaacggtgt cctctccttc tacctcteta cagagggtccg acagcagtca gcctatgctg 660 ctccgagtgg ttggcagtca aacttcggac tccatgggtg aggaagatct tctcagtct 720 ccccaggaca caagcacagg gttagaggag gtgatggagc aactcaaca ctccttcct 780 agttcaagag gaagaaatac ccctggaaag ccaatgagag aggacacaat gtag

Настоящее раскрытие относится к полипептиду миниатюризированного дистрофина, который меньше, чем полноразмерный белок дистрофина, т.е., изоформа

Dp427m, и который не идентичен природным изоформам белка дистрофина, или к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид миниатюризированного дистрофина. Когда в настоящем раскрытии раскрывают полипептид миниатюризированного дистрофина, настоящее раскрытие также раскрывает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующий раскрытый полипептид миниатюризированного дистрофина, и наоборот. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид миниатюризированного дистрофина, подходит для генотерапии. Таким образом, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид миниатюризированного дистрофина, конструируют не только для того, чтобы она подходила для генотерапевтического вектора, например, вектора AAV или подходила для рекомбинантной экспрессии, но и для снижения любого нежелательного иммунного ответа (например, гуморального иммунного ответа и/или клеточного иммунного ответа, например, CD4 и/или CD8) против полипептида миниатюризированного дистрофина при введении или экспрессии *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина по настоящему раскрытию содержит соединение на N-конце относительно немодифицированного или модифицированного домена спектриновых повторов 16 (R16), которое отличается от соединения дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина по настоящему раскрытию содержит модифицированный домен спектриновых повторов 16 (R16), где часть домена спектриновых повторов 16 (R16) замещена соответствующей частью другого домена спектриновых повторов. В некоторых вариантах осуществления другой домен спектриновых повторов представляет собой домен спектриновых повторов 2 (R2). В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен R16 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71 и 72. Термин «соединение J4 (или J4-соединение)», как применяют в настоящем документе, относится к пептидной последовательности, окружающей соединение между доменом повтора спектрина 1 (R1) и доменом повтора спектрина 16 (R16). Варианты соединения J4, описываемые в настоящем документе, т.е., J4V4, J4V11, J4V12 и J4V13, представляют

собой соединения J4, в которых в разной степени N-концевая часть домена спектриновых повторов 16 (R16) заменена определенными N-концевыми частями повтора спектрина 2 (R2).

Таблица 5. Частичная аминокислотная последовательность модифицированных доменов R16/вариантов соединения J4.

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
68	Модифицированный спектрин-16 (соединение J4V13)	MDLQNQKLTEITHVSQ
69	Модифицированный спектрин-16 (соединение J4V12)	LMDLQNQKTEITHVSQ
70	Модифицированный спектрин-16 (соединение J4V11)	LMDLQNQKEITHVSQA
71	Модифицированный спектрин-16 (соединение J4V4)	LHRVLMDLTYLTEITH
72	Модифицированный спектрин-16 (соединение J4)	MEKQSNLHSYVPSTYL

В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина содержит от N-конца к С-концу шарнирный домен 1 (H1), домен спектриновых повторов 1 (R1), модифицированный домен R16, домен спектриновых повторов 17 (R17), шарнирный домен 3 (H3), домен спектриновых повторов 23 (R23), домен спектриновых повторов 24 (R24) и шарнирный домен 4 (H4) дистрофина. В некоторых вариантах осуществления (i) домен H1 и домен R1 слиты напрямую, (ii) домен R1 и модифицированный домен R16 слиты напрямую, (iii) модифицированный домен R16 и домен R17 слиты напрямую, (iv) домен R17 и домен H3 слиты напрямую, (v) домен H3 и домен R23 слиты напрямую, (vi) домен R23 и домен R24 слиты напрямую, или (vii) домен R24 и домен H4 слиты напрямую, или (viii) любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина не содержит домен спектриновых повторов 2 (R2), домен спектриновых повторов 3 (R3), домен спектриновых повторов 4 (R4), домен спектриновых повторов 5 (R5), домен спектриновых повторов 6

(R6), домен спектриновых повторов 7 (R7), домен спектриновых повторов 8 (R8), домен спектриновых повторов 9 (R9), домен спектриновых повторов 10 (R10), домен спектриновых повторов 11 (R11), домен спектриновых повторов 12 (R12), домен спектриновых повторов 13 (R13), домен спектриновых повторов 14 (R14), домен спектриновых повторов 15 (R15), домен спектриновых повторов 18 (R18), домен спектриновых повторов 19 (R19), домен спектриновых повторов 20 (R20), домен спектриновых повторов 21 (R21) и/или домен спектриновых повторов 22 (R22). В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина дополнительно содержит домен ABD1 и/или домен CR. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина состоит по существу или состоит от N-конца к С-концу из домена ABD1, домена H1, домена R1, модифицированного домена R16, домена R17, домена H3, домена R23, домена R24, домена H4 и домена CR дистрофина.

Каждый домен в полипептидах миниатюризированного дистрофина может иметь одно или несколько отличий от соответствующего домена дикого типа.

Например, миниатюризированный дистрофин BXA-212372-J4V13 (BXA-220931) состоит по порядку из следующих белковых доменов:

Таблица 6. Аминокислотная последовательность и структура доменов полипептида миниатюризированного дистрофина BXA-212372-J4V13 (BXA-220931).

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
73	ABD1	MLWWEVEDCYEREDVQKKTFKWNNAQFSKFGKQHIE NLFSDLQDGRRLDLLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNV NKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILH WQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVN VINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQQSATQ RLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSL FQVLPQQVSIEAIQEVE
74	Шарнир 1	MLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQITVSLAQGYERTSS PKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQHLEAPEDKSFG SSLMES
75	Спектрин-1	EVNLDTRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVK DQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLS EETEVEQEQMNLNSRWECLRVASMEKQSNLH
76	Модифицир	RVLMDLQNQKLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFE

	ованный спектрин-16	DLFKQEESLKNIKDSLQSSGRIDIIHSKKTAALQSATPVE RVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRS
77	Спектрин-17	VEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKY KWYLLKELQDGIGQRQTVVRTL NATGEEIIQQSSKTDASIL QEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQ
78	Шарнир 3	APGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLE
79	Спектрин-23	SDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQ KQNDVHRAFKRELKTKEPVMSTLETVRIFLTEQPLEGLE KLYQEPRELPPPEERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNH SADWQRKIDET
80	Спектрин-24	LERLQELQEATDELDLKLRAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQ DHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPY NLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHE
81	Шарнир 4	AHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPKNKVPYYINHETQT TCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKL
82	CR	RRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMIDILQII NCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMLCNWLLNVYDTG RTGRIRVLSFKTGIIISLCKAHLEDKYRYLQKQVASSTGFCD QRRLLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFAN NKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKH QAKCNICKECPHIFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGH KMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAK HPRMGYLPVQTVLEGDNMET

В некоторых вариантах осуществления домен H1 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления домен R1 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID

[illegible]

приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина дополнительно содержит на N-конце аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина дополнительно содержит на C-конце аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 82.

Различные миниатюризированные полипептиды дистрофина по настоящему раскрытию показаны в таблице 7.

Таблица 7. Аминокислотные последовательности конструкций миниатюризированного дистрофина.

SEQ ID NO и описание	Последовательность
SEQ ID NO:83 BXA-212372- J4V13 (BXA- 220931)	MLWWEVEEDCYEREDVQKKFTKWNVAQFSKFGKQHIEENLFSDL QDGRRLDLLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVKNALRVLQNNN VDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQ TNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPD LFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPD KKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPKPPKVTKEEHFQLHHQ MHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPF PSQHLEAPEDKSFGSSLMSEVNLDYQTALAEVLSWLLSAEDTLQ AQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIG TGKLSEDEETEVEQEQMNLNLSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDL QNQKLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLC AKDFEDLFKQEE SLKNIK DSLQQSSGRIDIIH SKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKV NKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHDIKIFNQWLTEAEQFLRKQTQIP ENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTL NATGEEIIQQSSK TDA

	SILQEKLGSNLNRWQEVCKQLSDRKKRLEEQAPGLTTIGASPTQTV TLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLESDQWKRLHLSLQELLVWLQ LKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVMSTLET VRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPEERAQNVTRLLRKQAEENVTE WEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRLQAEVIKGS WQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTT LGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPAS QHFLSTSVQGPWERAI SPNKVPYYINHETQTTCDWHPKMTELYQS LADLNNVRFSAYRTAMKLRRQLKALCLDLLSLSAACDALDQHNL KQNDQPM DILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMLNWL NVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLQVASTGFC DQRRLLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIE AALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPII GFRYRSLKHFNIDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGE DVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
SEQ ID NO:84 BXA-212372- J4V12	MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFKWWNAQFSKFGKQHIEENLFSDL QDGRRLDLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNN VDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQ TNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPD LFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPD KKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQ MHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPF PSQHLEAPEDKSFGSSLMSEVNLDYQTALEEVLSWLLSAEDTLQ AQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIG TGKLSEDEETEVEQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLM DL QNQKTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEE SLKNIKD SLQQSSGRIDIHHSKKTAAALQSATPVERVKLQEALSQ LDFQWEKVN KMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPE NWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEHQQSSKTDAS ILQEKLGSNLNRWQEVCKQLSDRKKRLEEQAPGLTTIGASPTQTVT LVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLESDQWKRLHLSLQELLVWLQL KDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVMSTLET RIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPEERAQNVTRLLRKQAEENVTEW EKLNLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRLQAEVIKGSW QPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLG

	IQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQH FLSTSVQGPWERAI SPNKVPYYINHETQTT CWDHPKMT ELYQSLA DLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQ NDQPM DILQIINCLTTIYDRLEQEHN NLVNVPLCVD MCLNWLLNV YDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYL FKQVASSTGFCDQ RRLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAA LFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETA KHQAKCNICKECPIIGF RYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDV R DFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
SEQ ID NO:85 BXA-212372- J4V11	MLWWE EVEDCYEREDVQKKTF TKWVNAQFSKFGKQH IENLFS DL QDGRRLDLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVN KALRVLQNNN VDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWN IILHWQVKNVMKNIMAGLQQ TNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSRPD LFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPD KKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQ MHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTS DPTRSPF PSQHLEAPEDKSF GSSLMESVNLDRYQTAL EEVLSWLLSAEDTLQ AQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIG TGKLSEDEETE VQE QMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRV LMDL QNQKEITHVSQALLEVEQLLNAPDLC AKDFEDLFKQ EESLKNIKDS LQQSSGRIDIIH SKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKV NK MYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRK TQIPEN WEHAKYKWY LKELQDGIGQRQT VVRTLNATGEEIIQQSSKTDASIL QEKLGS LNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQAPGLTTIGASPTQT VTL VTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLESDQWKRLHLSLQELLVWLQLK DDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVR IFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWE KLNLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKL RQAEVIKGSWQ PVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGI QLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQH F LSTSVQGPWERAI SPNKVPYYINHETQTT CWDHPKMT ELYQSLAD LNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQN DQPM DILQIINCLTTIYDRLEQEHN NLVNVPLCVD MCLNWLLNVY DTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYL FKQVASSTGFCDQRR LGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALF

	LDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRY RSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRD FAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
SEQ ID NO:86 BXA-212372- J4V4	MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDL QDGRRLDLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNN VDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQ TNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPD LFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPD KKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPKPPKVTKEEHFQLHHQ MHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPF PSQHLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDYQTALEEVLSWLLSAEDTLQ AQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIG TGKLSEDEETEVEQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVMDL TYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLC AKDFEDLFKQEEESLKNIKDSL QQSSGRIDIIHSSKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKM YKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENW EHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTL NATGEEIIQQSSKTDASILQ EKLGSNLNRWQEVCKQLSDRKKRLEEQA PGLTTIGASPTQTVTLVT QPVVTKETAISKLEMPSSLMLESDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDD ELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVMSTLETVRIFL TEQPLEGLEKLYQEPRELPPERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKL NLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRAEVIKGSWQPV GDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQL SPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLS TSVQGPWERAI SPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLN NVRFSAYRTAMKLRRQLKALCLDLLSLSAACDALDQHNKQNDQ PMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNLLNVNPLCVDMLCNWLLNVYDT GRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLKFQVASSTGFCDQRRLG LLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLD WMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRS LKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFA KVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
SEQ ID NO:87 BXA-212372-J4	MLWWEVEEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDL QDGRRLDLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNN VDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQ

	TNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPD LFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPD KKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQ MHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPF PSQHLEAPEDKSFGSSLMSEVNLDYQTALEEVLSWLLSAEDTLQ AQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIG TGKLSSEDEETEVEQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHSYVPSTY LTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLKFQEESLKNIKDSLQ QSSGRIDIIHSKKTAAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMY KDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWE HAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASILQE KLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQAPGLTTIGASPTQTVTLVT QPVVTKETAISKLEMPSSLMLESDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDD ELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVMSTLETVRIFL TEQPLEGLEKLYQEPRELPEERAQNVTRLLRKQAEENVTEWEKL NLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRLQAEVIKGSWQPV GDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQL SPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLS TSVQGPWERAISPKNVPYYINHETQTTCDWHPKMTELYQSLADLN NVRFSAYRTAMKLRRQLKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQ PMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNLLVNVPLCVDMLCNWLLNVYDT GRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLKFQVASSTGFCDQRRLG LLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLD WMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAQHQAACNICKECPIIGFRYRS LKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFA KVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
SEQ ID NO:88 BXA-212372	MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDL QDGRRLDLLEGLTGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNN VDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQVKNVMKNIMAGLQQ TNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPD LFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPD KKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQ MHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPF PSQHLEAPEDKSFGSSLMSEVNLDYQTALEEVLSWLLSAEDTLQ AQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIG

	TGKLSEDEETEVEQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLHIHTVREE TMMVMTEDMPLAISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAK DFEDLFKQEEESLKNIKDSLQSSGRIDIIHKKTAALQSATPVERVK LQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFN QWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLLKELQDGIGQRQTVVRT LNATGEEIIQQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLE EQAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLESDQ WKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRA FKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQ NVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEAT DELDLKLKRAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLK ENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDR VRQLHEAHRDFGPASQHFLLSTSVQGPWERAISPKNVPYYINHETQT TCWDHPKMTLEYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRLQKALCLDLL SLSAACDALDQHNKQNDQPMIDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVN VPLCVDMLCNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIIISLCKAHLEDKYR YLFKQVASSTGFCDQRRLLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSV RSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETA KHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNFDICQSCFFSGRVAKGHKMH YPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPV QTVLEGDNMET
--	--

В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризованного дистрофина содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризованного дистрофина содержит аминокислотную последовательность идентичную SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризованного дистрофина содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или

приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность миниатюризированного дистрофина, описываемого в настоящем документе, при экспрессии обладает, по меньшей мере, одной активностью дистрофина.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей каждый домен, может быть следующей:

Таблица 8: Нуклеотидная последовательность (и структура доменов), кодирующая полипептид миниатюризированного дистрофина BXA-220931.

SEQ ID NO:	Описание	Нуклеотидная последовательность
89	5' UTR	CCGCCTTCGGCACCATTCTCACGACACCCAAATATGGCGAC GGGTGAGGAATGGTGGGGAGTTATTTTAGAGCGGTGAGGAA GGTGGGCAGGCAGCAGGTGTTGGCGCTCTAAAAATAACTCCC GGGAGTTATTTTAGAGCGGAGGAATGGTGGACACCCAAATA TGGCGACGGTTCCTACCCGTCGCCATATTTGGGTGTCCGCCC

		TCGGCCGGGGCCGCATTCTGGGGGCGGGCGGTGCTCCCGC CCGCCTCGATAAAAGGCTCCGGGGCCGGCGGCGGCCACGA GCTACCCGGAGGAGCGGGAGGCACGCGTCTCTAAGGTAAAT ATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCTAA TTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAAGTATCTAGA CCACC
90	ABD1	ATGCTTTGGTGGGAAGAAGTCGAGGACTGCTACGAGCGCGAG GACGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCAACGCCCA GTTTCAGCAAGTTCGGCAAGCAGCACATCGAGAACCTGTTTCAG CGACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGG CCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGGCAGCACAA GAGTGCACGCCCTGAACAACGTGAACAAGGCCCTGAGAGTG CTGCAGAACAAACGTGGACCTGGTCAACATCGGCAGCACC GACATCGTGGACGGCAATCACAACTGACCCTGGGCCTGATC TGGAACATCATCCTGCACTGGCAAGTGAAGAACGTGATGAAG AACATCATGGCCGGCCTGCAGCAGACCAACAGCGAGAAGAT TCTGCTGAGCTGGGTCCGACAGAGCACCCGGAACCTACCCTCA AGTGAACGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGCGACGGACT GGCCCTGAATGCCCTGATTCACAGCCACAGACCTGACCTGTT CGACTGGAATAGCGTCGTGTGTCAGCAGAGCGCCACACAGAG ACTGGAACACGCCTTCAATATCGCCAGATACCAGCTGGGCAT CGAGAACTGCTGGACCCCGAGGATGTGGACACCACCTATCC TGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCAGCCTGTTCCA GGTGCTGCCCCAGCAAGTGTCTATCGAGGCCATTCAAGAGGT CGAG
91	Шарнир 1	ATGCTGCCCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTTC CAGCTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCACCGTG TCTCTGGCCCAGGGCTACGAGAGAACAAGCAGCCCCAAGCCT CGGTTCAAGAGCTACGCCTATACACAGGCCGCCTACGTGACC ACCAGCGATCCCACAAGAAGCCCATTTCCAAGCCAGCATCTG GAAGCCCCTGAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGA AAGC
92	Спектрин-1	GAAGTGAACCTGGATAGATACCAGACAGCCCTGGAAGAGGT GCTGTCTTGGCTGCTGTCTGCCGAAGATACACTGCAGGCTCA GGGCGAGATCAGCAACGACGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGT

		TTCACACCCACGAGGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCATC AGGGCAGAGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAGCTGA TCGGCACAGGCAAGCTGAGCGAGGACGAAGAGACAGAGGTG CAAGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCAGATGGGAGTGTCT GAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGAGCAACCTGCAC
93	Модифици рованный спектрин- 16	CGGGTCCTGATGGATCTGCAGAATCAGAAGCTGACCGAGATC ACCCACGTGTACAGGCCCTGCTTGAAGTGGAACAGCTGCTG AACGCCCTGATCTGTGCGCCAAGGACTTCGAGGATCTGTTC AAGCAAGAGGAAAGCCTGAAGAATATCAAGGACTCTCTGCA GCAGTCCAGCGGCCGGATCGACATCATCCACAGCAAGAAAA CAGCTGCCCTGCAGTCCGCCACACCTGTGGAAAGAGTGAAAC TGCAAGAGGCCCTGTCTCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAG TGAACAAGATGTACAAGGACCGGCAGGGCAGATTTCGACCGC TCT
94	Спектрин- 17	GTGGAAAAATGGCGGAGATTCCACTACGACATCAAGATCTTC AACCAGTGGCTGACAGAGGCCGAGCAGTTCCTGAGAAAGAC ACAGATCCCCGAGAACTGGGAGCACGCCAAGTACAAGTGGT ATCTGAAAGAACTGCAGGACGGCATCGGCCAGAGGCAGACA GTCGTTAGAACACTGAATGCCACCGGCGAGGAAATCATCCAG CAGAGCAGCAAGACCGACGCCAGCATCCTGCAAGAGAAGCT GGGCAGCCTGAACCTGAGATGGCAAGAAGTGTGCAAGCAGC TGTCGACCGGAAGAAGAGGGCTGGAAGAACAG
95	Шарнир 3	GCCCCCTGGCCTGACAACAATCGGAGCCTCTCCTACACAGACC GTGACACTGGTCACACAGCCCGTGGTCACCAAAGAGACAGCC ATCAGCAAGCTGGAAATGCCCTCTAGCCTGATGCTCGAG
96	Спектрин- 23	AGCGACCAGTGGAAGAGACTGCACCTGTCTCTGCAAGAGCTG CTCGTGTGGCTGCAGCTGAAGGACGATGAACTGAGCAGACAG GCCCCAATCGGAGGCGATTTTCCTGCCGTGCAGAAACAGAAC GACGTGCACAGAGCCTTCAAGCGGGAAGTGAACAAAAGA ACCCGTGATCATGAGCACCTTGGAACCGTGCGGATCTTCCT GACAGAGCAGCCTCTCGAAGGCCTGGAAAAGCTGTACCAAG AGCCTAGAGAGCTGCCTCCTGAGGAACGGGCCCAGAATGTGA CCAGACTGCTGAGAAAGCAGGCCGAAGAGGTCAACACCGAA TGGGAGAAGCTGAACCTGCACAGCGCCGACTGGCAGAGAAA GATCGACGAGACA

97	Спектрин-24	CTGGAACGGCTGCAAGAACTCCAAGAAGCCACCGACGAGCT GGACCTGAAACTGAGGCAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCT GGCAGCCAGTGGGCGACCTGCTGATTGATAGTCTGCAGGACC ACCTGGAAAAAGTGAAGGCCCTGCGGGGAGAGATCGCCCCA CTGAAAGAAAACGTGTCCACGTGAACGACCTGGCCAGACA GCTGACAACCCTGGGAATCCAGCTGTCCCCTTACAACCTGTC CACACTGGAAGATCTGAACACCCGGTGGAAACTGCTCCAGGT GGCCGTGGAAGATAGAGTGCACAGCTGCACGAG
98	Шарнир 4	GCCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTCCTGTCT ACATCTGTGCAAGGCCCTTGGGAGAGAGCTATCAGCCCTAAC AAGGTGCCCTACTACATCAACCACGAGACACAGACCACCTGT TGGGATCACCCCAAGATGACCGAGCTGTATCAGAGCCTGGCC GACCTGAACAATGTGCGCTTTAGCGCCTACCGGACCGCCATG AAGCTG
99	CR	CGGAGACTGCAGAAAGCCCTGTGTCTGGACCTGCTGTCTCTG TCTGCAGCCTGTGATGCCCTGGACCAGCACAACTGAAGCAG AACGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTG ACCACCATCTACGACCGGCTGGAACAAGAGCACAAACACCTC GTGAATGTGCCCCTGTGCGTGGACATGTGTCTGAACTGGCTG CTGAATGTGTACGACACCGGCAGAACCGGCAGGATCAGAGT GCTGAGCTTCAAGACCGGCATCATCTCCCTGTGCAAAGCCCA CCTCGAGGACAAGTACAGATACCTGTTCAAACAGGTGGCCAG CTCCACCGGCTTTTTCGATCAAAGAAGGCTGGGCCTGCTGCT GCACGACAGCATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGCGAAGTGGC CTCCTTCGGCGGATCTAATATTGAGCCTAGCGTGCGGAGCTG CTTCCAGTTCGCCAACAACAAGCCTGAGATCGAGGCCGCTCT GTTCCCTGGATTGGATGCGCCTGGAACCTCAGAGCATGGTTTG GCTGCCTGTGCTGCATAGAGTGGCCGCTGCCGAAACAGCCAA GCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCAT CGGCTTCCGGTACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTACGATAT CTGCCAGAGCTGTTTCTTCTCTGGCCGCGTGGCCAAGGGCCA CAAAATGCACTACCCCATGGTGGAAATACTGCACCCCTACCAC ATCTGGCGAAGATGTGCGGGATTTCGCCAAGGTGCTGAAAAA CAAGTTCCGGACCAAGCGGTACTTCGCTAAGCACCCCAAGAAT GGGCTATCTGCCCCTGCAGACAGTGCTCGAGGGCGATAACAT

[illegible]

[illegible]

осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид CR/C-конец, представляет собой последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 60%, по меньшей мере, приблизительно на 70%, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, демонстрирует одно или несколько свойств, выбранных из группы, состоящей из (i) более низкой пролиферации CD4 по сравнению с BXA-212372 (SEQ ID NO: 88), (ii) более низкой пролиферации CD8 по сравнению с BXA-212372 (SEQ ID NO: 88), и (iv) любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, имеет формулу (I):

H1-R1-mR16-R17-H3-R23-R24-H4 (I)

где: H1 представляет собой шарнирный домен 1 дистрофина; R1 представляет собой домен спектриновых повторов 1 дистрофина; mR16 представляет собой модифицированный домен спектриновых повторов 16 дистрофина; R17 представляет собой домен спектриновых повторов 17 дистрофина; H3 представляет собой шарнирный домен 3 дистрофина; R23 представляет собой домен спектриновых повторов 23 дистрофина; R24 представляет собой домен спектриновых повторов 24 дистрофина; H4 представляет собой шарнирный домен 4 дистрофина; и (-)представляет собой пептидную связь.

В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 60%, по меньшей мере, приблизительно на 70%, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления полипептид миниатюризированного дистрофина демонстрирует более высокую экспрессию полипептида миниатюризированного дистрофина, чем BXA-212372 (SEQ ID NO: 88). В некоторых

других вариантах осуществления, экспрессия полипептида миниатюризированного дистрофина, по меньшей мере, приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,6 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,7 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,8 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,9 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,1 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,2 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,3 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,4 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,6 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,7 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,8 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,9 раза или, по меньшей мере, приблизительно в 3 раза выше, чем экспрессия полипептида BXA-212372 (SEQ ID NO: 88).

В некоторых вариантах осуществления полипептиды миниатюризированного дистрофина могут быть кодированы нуклеотидными последовательностями. Некоторые примеры нуклеотидных последовательностей показаны в таблице 9.

Таблица 9. Нуклеотидные последовательности конструкций дистрофина.

SEQ ID NO и описание	Последовательность
SEQ ID NO:100 BXA-220931	ATGCTTTGGTGGGAAGAAGTCGAGGACTGCTACGAGCGCGAGGA CGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCAACGCCAGTTCA GCAAGTTCGGCAAGCAGCACATCGAGAACCTGTTCAGCGACCTG CAGGATGGCAGAAGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGCCTGACAGG CCAGAAGCTGCCTAAAGAGAAGGGCAGCACAAGAGTGCACGCCC TGAACAACGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAAC GTGGACCTGGTCAACATCGGCAGCACCGACATCGTGGACGGCAA TCACAAACTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTG GCAAGTGAAGAACGTGATGAAGAACATCATGGCCGGCCTGCAGC AGACCAACAGCGAGAAGATTCTGCTGAGCTGGGTCCGACAGAGC ACCCGGAACCTCAAGTGAACGTGATCAACTTCACCACCTCT TGGAGCGACGGACTGGCCCTGAATGCCCTGATTCACAGCCACAG ACCTGACCTGTTCGACTGGAATAGCGTCGTGTGTCAGCAGAGCGC CACACAGAGACTGGAACACGCCTTCAATATCGCCAGATACCAGC TGGGCATCGAGAACTGCTGGACCCCGAGGATGTGGACACCACC TATCCTGACAAGAAATCCATCCTCATGTACATCACCAGCCTGTTC CAGGTGCTGCCCCAGCAAGTGTCTATCGAGGCCATTCAAGAGGTC GAGATGCTGCCCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTT

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	CCAGCTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCACCGTGTC TCTGGCCCAGGGCTACGAGAGAACAAGCAGCCCCAAGCCTCGGT TCAAGAGCTACGCCTATACACAGGCCGCCTACGTGACCACCAGC GATCCCACAAGAAGCCCATTTCOAAGCCAGCATCTGGAAGCCCCCT GAGGACAAGAGCTTTGGCAGCAGCCTGATGGAAAGCGAAGTGAA CCTGGATAGATACCAGACAGCCCTGGAAGAGGTGCTGTCTTGCT GCTGTCTGCCGAAGATACACTGCAGGCTCAGGGCGAGATCAGCA ACGACGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTCACACCCACGAGGGC TACATGATGGACCTGACAGCCCATCAGGGCAGAGTGGGCAATAT CCTGCAGCTGGGCTCTAAGCTGATCGGCACAGGCAAGCTGAGCG AGGACGAAGAGACAGAGGTGCAAGAGCAGATGAACCTGCTGAA CAGCAGATGGGAGTGTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGA GCAACCTGCACCGGGTCCTGATGGATCTGCAGAATCAGAAGCTG ACCGAGATCACCCACGTGTCACAGGCCCTGCTTGAAGTGGAAACA GCTGCTGAACGCCCTGATCTGTGCGCCAAGGACTTCGAGGATCT GTTCAAGCAAGAGGAAAGCCTGAAGAATATCAAGGACTCTCTGC AGCAGTCCAGCGGCCGGATCGACATCATCCACAGCAAGAAAACA GCTGCCCTGCAGTCCGCCACACCTGTGGAAAGAGTGAAACTGCA AGAGGCCCTGTCTCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGTGAACA AGATGTACAAGGACCGGCAGGGCAGATTTCGACCGCTCTGTGGAA AAATGGCGGAGATTCCACTACGACATCAAGATCTTCAACCAGTG GCTGACAGAGGCCGAGCAGTTCCTGAGAAAGACACAGATCCCCG AGAACTGGGAGCACGCCAAGTACAAGTGGTATCTGAAAGAACTG CAGGACGGCATCGGCCAGAGGCAGACAGTCGTTAGAACACTGAA TGCCACCGGCGAGGAAATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACCGACG CCAGCATCCTGCAAGAGAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGAGATGG CAAGAAGTGTGCAAGCAGCTGTCCGACCGGAAGAAGAGGCTGGA AGAACAGGCCCCCTGGCCTGACAACAATCGGAGCCTCTCCTACAC AGACCGTGACACTGGTCACACAGCCCGTGGTCACCAAAGAGACA GCCATCAGCAAGCTGGAAATGCCCTCTAGCCTGATGCTCGAGAG CGACCAGTGGAAGAGACTGCACCTGTCTCTGCAAGAGCTGCTCGT GTGGCTGCAGCTGAAGGACGATGAACTGAGCAGACAGGCCCCAA TCGGAGGCGATTTTCCTGCCGTGCAGAAACAGAACGACGTGCAC

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	AGAGCCTTCAAGCGGGAAGCTGAAAACAAAAGAACCCGTGATCAT GAGCACCTTGAAACCGTGCGGATCTTCCTGACAGAGCAGCCTCT CGAAGGCCTGGAAAAGCTGTACCAAGAGCCTAGAGAGCTGCCTC CTGAGGAACGGGCCCAGAATGTGACCAGACTGCTGAGAAAGCAG GCCGAAGAGGTCAACACCGAATGGGAGAAGCTGAACCTGCACAG CGCCGACTGGCAGAGAAAGATCGACGAGACACTGGAACGGCTGC AAGAACTCCAAGAAGCCACCGACGAGCTGGACCTGAAACTGAGG CAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAGCCAGTGGGCGACCT GCTGATTGATAGTCTGCAGGACCACCTGGAAAAAGTGAAGGCCC TGCGGGGAGAGATCGCCCCACTGAAAGAAAACGTGTCCACGTG AACGACCTGGCCAGACAGCTGACAACCCTGGGAATCCAGCTGTC CCCTTACAACCTGTCCACACTGGAAGATCTGAACACCCGGTGGAA ACTGCTCCAGGTGGCCGTGGAAGATAGAGTGCGACAGCTGCACG AGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAGCACTTCCTGTCTA CATCTGTGCAAGGCCCTTGGGAGAGAGCTATCAGCCCTAACAAG GTGCCCTACTACATCAACCACGAGACACAGACCACCTGTTGGGAT CACCCCAAGATGACCGAGCTGTATCAGAGCCTGGCCGACCTGAA CAATGTGCGCTTTAGCGCCTACCGGACCGCCATGAAGCTGCGGA GACTGCAGAAAGCCCTGTGTCTGGACCTGCTGTCTCTGTCTGCAG CCTGTGATGCCCTGGACCAGCACAACCTGAAGCAGAACGACCAG CCTATGGACATCCTCCAGATCATCAACTGCCTGACCACCATCTAC GACCGGCTGGAACAAGAGCACAACAACCTCGTGAATGTGCCCT GTGCGTGGACATGTGTCTGAACTGGCTGCTGAATGTGTACGACAC CGGCAGAACCGGCAGGATCAGAGTGCTGAGCTTCAAGACCGGCA TCATCTCCCTGTGCAAAGCCCACCTCGAGGACAAGTACAGATACC TGTTCAAACAGGTGGCCAGCTCCACCGGCTTTTGCGATCAAAGAA GGCTGGGCCTGCTGCTGCACGACAGCATCCAGATTCTAGACAGC TGGGCGAAGTGGCCTCCTTCGGCGGATCTAATATTGAGCCTAGCG TGCGGAGCTGCTTCCAGTTCGCCAACAACAAGCCTGAGATCGAG GCCGCTCTGTTCTTGATTGGATGCGCCTGGAACCTCAGAGCATG GTTTGGCTGCCTGTGCTGCATAGAGTGGCCGCTGCCGAAACAGCC AAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCAT CGGCTTCCGGTACAGATCCCTGAAGCACTTCAACTACGATATCTG

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	CCAGAGCTGTTTCTTCTCTGGCCGCGTGGCCAAGGGCCACAAAAT GCACTACCCCATGGTGGAAATACTGCACCCCTACCACATCTGGCGA AGATGTGCGGGATTTTCGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTCCGGA CCAAGCGGTACTTCGCTAAGCACCCCAGAATGGGCTATCTGCCCCG TGCAGACAGTGCTCGAGGGGCGATAACATGGAAACCTGA
SEQ ID NO:101 BXA-212372- J4V13	ATGCTGTGGTGGGAGGAAGTGGAAGATTGCTACGAGCGCGAGGA CGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTGAACGCCCAGTTCA GCAAGTTCGGCAAGCAGCACATCGAGAACCTGTTCAGCGACCTG CAGGACGGCAGACGGCTGCTGGACCTGCTGGAAGGCCTGACCGG CCAGAAGCTGCCCCAAGAGAAGGGCAGCACAGAGTGCACGCCC TGAACAACGTGAACAAGGCCCTGCGGGTGCTGCAGAACAACAAC GTGGACCTGGTGAACATCGGCAGCACCGACATCGTGGACGGCAA CCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTG GCAGGTCAAAAACGTGATGAAGAACATCATGGCCGGCCTGCAGC AGACCAACAGCGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGCGCCAGAGC ACCCGGAACCTACCCCCAGGTCAACGTGATCAACTTCACCACCTCT TGGAGCGACGGCCTGGCCCTGAACGCCCTGATCCACAGCCACCG GCCCCGACCTGTTGACTGGAACAGCGTGGTCTGCCAGCAGAGCG CCACCCAGCGGCTGGAACACGCCTTCAATATCGCCAGATACCAG CTGGGCATCGAGAAGCTGCTGGATCCCGAGGACGTGGACACCAC CTACCCCGACAAGAAATCCATCCTGATGTATATCACCAGCCTGTT CCAGGTGCTGCCCCAGCAGGTGTCCATCGAGGCCATCCAGGAAG TGGAATGCTGCCCAGACCCCCCAAAGTGACCAAAGAGGAACAC TTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACAGCCAGCAGATCACCGTG TCCCTGGCTCAGGGCTACGAGCGGACCAGCAGCCCCAAGCCCCG GTTCAAGAGCTACGCCTACACCCAGGCCGCCTACGTGACCACCA GCGACCCCAACCAGAAGCCCATTTCCCAGCCAGCATCTGGAAGCC CCCGAGGACAAGAGCTTCGGCAGCAGCCTGATGGAAAGCGAAGT GAACCTGGACAGATACCAGACCGCCCTGGAAGAGGTGCTGTCTT GGCTGCTGAGCGCCGAGGATACACTGCAGGCCAGGGCGAGATC AGCAACGACGTGGAAGTGGTGAAGACCAGTTCCACACCCACGA GGGCTACATGATGGACCTGACCGCCCACCAGGGCAGAGTGGGCA ACATCCTGCAGCTGGGCAGCAAGCTGATCGGCACCGGCAAGCTG

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	AGCGAGGACGAAGAGACAGAGGTGCAGGAACAGATGAACCTGC TGAACAGCAGATGGGAGTGCCTGCGGGTGGCCAGCATGGAAAAG CAGAGCAACCTGCACCGGGTCCTGATGGATCTGCAGAATCAGAA GCTGACCGAGATCACCCACGTGTCCCAGGCTCTGCTGGAAGTGG AACAGCTGCTGAACGCCCCCGACCTGTGCGCCAAGGACTTCGAG GATCTGTTCAAGCAGGAAGAGAGCCTGAAGAATATCAAGGACTC CCTGCAGCAGTCCAGCGGCCGGATCGACATCATCCACAGCAAGA AAACAGCCGCCCTGCAGTCCGCCACCCCCGTGGAAAGAGTGAAG CTGCAGGAAGCCCTGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGT GAACAAGATGTACAAGGACCGGCAGGGCAGATTTCGACCGCAGCG TGGAAAAGTGGCGGCGGTTCCACTACGACATCAAGATCTTCAAC CAGTGGCTGACCGAGGCCGAGCAGTTCCTGAGAAAGACCCAGAT CCCCGAGAACTGGGAGCACGCCAAGTACAAGTGGTATCTGAAAG AGCTGCAGGACGGCATCGGCCAGCGGCAGACAGTGGTCCGCACC CTGAATGCCACCGGCGAGGAAATCATCCAGCAGAGCAGCAAGAC CGACGCCAGCATCCTGCAGGAAAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGC GGTGGCAGGAAGTGTGCAAGCAGCTGAGCGACCGGAAGAAGCG GCTGGAAGAACAGGCCCTGGCCTGACCACAATCGGCGCCAGCC CTACCCAGACCGTGACCCTGGTGACACAGCCCGTGGTGACAAAA GAGACAGCCATCAGCAAGCTGGAAATGCCCAGCAGCCTGATGCT GGAAAGCGACCAGTGAAGCGGCTGCACCTGAGCCTGCAGGAAC TGCTGGTCTGGCTGCAGCTGAAGGACGACGAGCTGAGCAGACAG GCCCCCATCGGCGGCGATTTCCTCCCGCCGTGCAGAAACAGAACGA CGTGACCCGGGCCTTCAAGCGCGAGCTGAAAACAAAAGAACCCG TGATCATGAGCACCTGGAAACCGTGCGGATCTTCCTGACCGAGC AGCCCCTGGAAGGCCTGGAAAAGCTGTACCAGGAACCCAGAGAG CTGCCCCCGAGGAACGGGCCCAGAACGTGACCAGACTGCTGCG GAAGCAGGCCGAAGAGGTCAACACCGAGTGGGAGAAGCTGAAC CTGCACAGCGCCGACTGGCAGCGGAAGATCGACGAGACACTGGA ACGGCTGCAGGAACTGCAGGAGGCCACCGACGAGCTGGACCTGA AGCTGAGACAGGCCGAAGTGATCAAGGGCAGCTGGCAGCCCGTG GGCGACCTGCTGATCGACTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAAGT GAAGGCCCTGCGGGGCGAGATCGCCCCCTGAAAGAAAACGTGT

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	CCCACGTGAACGACCTGGCCCCGGCAGCTGACCACCCTGGGCATC CAGCTGAGCCCCCTACAACCTGTCCACCCTGGAAGATCTGAACACC CGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCCGTGGAAGATAGAGTGCGGCA GCTGCACGAGGCCACAGAGACTTTGGCCCTGCCAGCCAGCACTT CCTGAGCACCTCTGTGCAGGGACCCTGGGAGAGAGCCATCAGCC CCAACAAGGTGCCCTACTACATCAACCACGAGACACAGACCACC TGTTGGGACCACCCCAAGATGACCGAGCTGTACCAGAGCCTGGC CGACCTGAACAATGTGCGGTTTCAGCGCCTACCGGACCGCCATGA AGCTGAGGCGGCTGCAGAAAGCTCTGTGCCTGGATCTGCTGAGC CTGAGCGCCGCCTGCGACGCCCTGGACCAGCACAACTGAAGCA GAACGACCAGCCCATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGAC CACAATCTACGACAGGCTGGAACAGGAACACAACAATCTGGTCA ACGTGCCCCTGTGCGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATG TGTACGACACCGGCCGGACCGGCAGAATCCGGGTGCTGAGCTTC AAGACCGGCATCATCAGCCTGTGCAAGGCCACCTGGAAGATAA GTACCGCTACCTGTTCAAACAGGTGGCCAGCTCCACCGGCTTTTG CGACCAGCGGAGACTGGGCCTGCTGCTGCACGACAGCATCCAGA TCCCCAGACAGCTGGGCGAGGTGGCCTCCTTCGGCGGCAGCAAC ATTGAGCCCAGCGTGCGGAGCTGCTTCCAGTTCGCCAACAACAA GCCCGAGATCGAGGCCGCCCTGTTCTGGAAGTGGATGAGACTGG ACCCCAGAGCATGGTGTGGCTGCCCCTGCTGCATCGGGTGGCC GCTGCCGAGACAGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAA AGAGTGCCCCATCATCGGCTTCCGGTACAGAAGCCTGAAGCACTT CAACTACGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTCAGCGGCAGAGTGGC CAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGGAATACTGCACCC CCACCACCAGCGGCGAGGATGTGCGGGACTTCGCCAAGGTGCTG AAAAACAAGTTCCGGACCAAGCGGTACTTTGCCAAGCACCCCCG GATGGGCTACCTGCCCCTGCAGACAGTGCTGGAAGGCGACAACA TGGAACCTGA
SEQ ID NO:102 BXA-212372- J4V12	ATGCTGTGGTGGGAGGAAGTGGAAGATTGCTACGAGCGCGAGGA CGTGCGAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTGAACGCCAGTTCA GCAAGTTCGGCAAGCAGCACATCGAGAACCTGTTTCAGCGACCTG CAGGACGGCAGACGGCTGCTGGACCTGCTGGAAGGCCTGACCGG

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	CCAGAAGCTGCCCCAAGAGAAGGGCAGCACCAGAGTGCACGCCC TGAACAACGTGAACAAGGCCCTGCGGGTGCTGCAGAACAACAAC GTGGACCTGGTGAACATCGGCAGCACCAGACATCGTGGACGGCAA CCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTG GCAGGTCAAAAACGTGATGAAGAACATCATGGCCGGCCTGCAGC AGACCAACAGCGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGCGCCAGAGC ACCCGGAAC TACCCCCAGGTCAACGTGATCAACTTCACCACCTCT TGGAGCGACGGCCTGGCCCTGAACGCCCTGATCCACAGCCACCG GCCCAGCCTGTTGACTGGAACAGCGTGGTCTGCCAGCAGAGCG CCACCCAGCGGCTGGAACACGCCTTCAATATCGCCAGATACCAG CTGGGCATCGAGAAGCTGCTGGATCCCGAGGACGTGGACACCAC CTACCCCGACAAGAAATCCATCCTGATGTATATCACCAGCCTGTT CCAGGTGCTGCCCCAGCAGGTGTCCATCGAGGCCATCCAGGAAG TGGAATGCTGCCCAGACCCCCCAAAGTGACCAAAGAGGAACAC TTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACAGCCAGCAGATCACCGTG TCCCTGGCTCAGGGCTACGAGCGGACCAGCAGCCCCAAGCCCCG GTTCAAGAGCTACGCCTACACCCAGGCCGCCTACGTGACCACCA GCGACCCCAACAGAAAGCCATTCCCCAGCCAGCATCTGGAAGCC CCCGAGGACAAGAGCTTCGGCAGCAGCCTGATGGAAAGCGAAGT GAACCTGGACAGATACCAGACCGCCCTGGAAGAGGTGCTGTCTT GGCTGCTGAGCGCCGAGGATACACTGCAGGCCCAGGGCGAGATC AGCAACGACGTGGAAGTGGTGAAAGACCAGTTCCACACCCACGA GGGCTACATGATGGACCTGACCGCCCACCAGGGCAGAGTGGGCA ACATCCTGCAGCTGGGCAGCAAGCTGATCGGCACCGGCAAGCTG AGCGAGGACGAAGAGACAGAGGTGCAGGAACAGATGAACCTGC TGAACAGCAGATGGGAGTGCCTGCGGGTGGCCAGCATGGAAAAG CAGAGCAACCTGCACAGAGTTTTAATGGATCTCCAGAATCAGAA AACCGAGATCACCCACGTGTCCCAGGCTCTGCTGGAAGTGGAAC AGCTGCTGAACGCCCCCGACCTGTGCGCCAAGGACTTCGAGGAT CTGTTCAAGCAGGAAGAGAGCCTGAAGAATATCAAGGACTCCCT GCAGCAGTCCAGCGGCCGGATCGACATCATCCACAGCAAGAAAA CAGCCGCCCTGCAGTCCGCCACCCCCGTGGAAAGAGTGAAGCTG CAGGAAGCCCTGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGTGAA

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	CAAGATGTACAAGGACCGGCAGGGCAGATTCGACCGCAGCGTGG AAAAGTGGCGGCGGTTCCACTACGACATCAAGATCTTCAACCAG TGGCTGACCGAGGCCGAGCAGTTCCTGAGAAAGACCCAGATCCC CGAGAACTGGGAGCACGCCAAGTACAAGTGGTATCTGAAAGAGC TGCAGGACGGCATCGGCCAGCGGCAGACAGTGGTCCGCACCCTG AATGCCACCGGCGAGGAAATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACCGA CGCCAGCATCCTGCAGGAAAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGCGGT GGCAGGAAGTGTGCAAGCAGCTGAGCGACCGGAAGAAGCGGCT GGAAGAACAGGCCCTGGCCTGACCACAATCGGCGCCAGCCCTA CCCAGACCGTGACCCTGGTGACACAGCCCGTGGTGACAAAAGAG ACAGCCATCAGCAAGCTGGAAATGCCCAGCAGCCTGATGCTGGA AAGCGACCAGTGGAAGCGGCTGCACCTGAGCCTGCAGGAACTGC TGGTCTGGCTGCAGCTGAAGGACGACGAGCTGAGCAGACAGGCC CCCATCGGCGGCGATTTCCCCGCCGTGCAGAAACAGAACGACGT GCACCGGGCCTTCAAGCGCGAGCTGAAAACAAAAGAACCCGTGA TCATGAGCACCCCTGGAAACCGTGCGGATCTTCCTGACCGAGCAGC CCCTGGAAGGCCTGGAAAAGCTGTACCAGGAACCCAGAGAGCTG CCCCCGAGGAACGGGCCCAGAACGTGACCAGACTGCTGCGGAA GCAGGCCGAAGAGGTCAACACCGAGTGGGAGAAGCTGAACCTGC ACAGCGCCGACTGGCAGCGGAAGATCGACGAGACACTGGAACGG CTGCAGGAACTGCAGGAGGCCACCGACGAGCTGGACCTGAAGCT GAGACAGGCCGAAGTGATCAAGGGCAGCTGGCAGCCCGTGGGCG ACCTGCTGATCGACTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAAGTGAAG GCCCTGCGGGGCGAGATCGCCCCCTGAAAGAAAACGTGTCCCA CGTGAACGACCTGGCCCCGGCAGCTGACCACCCTGGGCATCCAGC TGAGCCCCTACAACCTGTCCACCCTGGAAGATCTGAACACCCGGT GGAAGCTGCTGCAGGTGGCCGTGGAAGATAGAGTGCGGCAGCTG CACGAGGCCACAGAGACTTTGGCCCTGCCAGCCAGCACTTCCTG AGCACCTCTGTGCAGGGACCCTGGGAGAGAGCCATCAGCCCCAA CAAGGTGCCCTACTACATCAACCACGAGACACAGACCACCTGTT GGGACCACCCCAAGATGACCGAGCTGTACCAGAGCCTGGCCGAC CTGAACAATGTGCGGTTTCAGCGCCTACCGGACCGCCATGAAGCT GAGGCGGCTGCAGAAAGCTCTGTGCCTGGATCTGCTGAGCCTGA

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	GCGCCGCCTGCGACGCCCTGGACCAGCACAACTGAAGCAGAAC GACCAGCCCATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACA ATCTACGACAGGCTGGAACAGGAACACAACAATCTGGTCAACGT GCCCCTGTGCGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTA CGACACCGGCCGGACCGGCAGAATCCGGGTGCTGAGCTTCAAGA CCGGCATCATCAGCCTGTGCAAGGCCACCTGGAAGATAAGTAC CGCTACCTGTTCAAACAGGTGGCCAGCTCCACCGGCTTTTTCGAC CAGCGGAGACTGGGCCTGCTGCTGCACGACAGCATCCAGATCCC CAGACAGCTGGGCGAGGTGGCCTCCTTCGGCGGCAGCAACATTG AGCCCAGCGTGCGGAGCTGCTTCCAGTTCGCCAACAACAAGCCC GAGATCGAGGCCGCCCTGTTCTGACTGGATGAGACTGGAACC CCAGAGCATGGTGTGGCTGCCCCGTGCTGCATCGGGTGGCCGCTGC CGAGACAGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGT GCCCCATCATCGGCTTCCGGTACAGAAGCCTGAAGCACTTCAACT ACGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTCAGCGGCAGAGTGGCCAAG GGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGAATACTGCACCCCCAC CACCAGCGGCGAGGATGTGCGGGACTTCGCCAAGGTGCTGAAAA ACAAGTTCCGGACCAAGCGGTACTTTGCCAAGCACCCCCGGATG GGCTACCTGCCCCGTGCAGACAGTGCTGGAAGGCGACAACATGGA AACCTGA
SEQ ID NO:103 BXA-212372- J4V11	ATGCTGTGGTGGGAGGAAGTGGAAGATTGCTACGAGCGCGAGGA CGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTGAACGCCAGTTCA GCAAGTTCGGCAAGCAGCACATCGAGAACCTGTTTCAGCGACCTG CAGGACGGCAGACGGCTGCTGGACCTGCTGGAAGGCCTGACCGG CCAGAAGCTGCCCCAAGAGAAGGGCAGCACCAGAGTGCACGCCC TGAACAACGTGAACAAGGCCCTGCGGGTGCTGCAGAACAACAAC GTGGACCTGGTGAACATCGGCAGCACCGACATCGTGGACGGCAA CCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTG GCAGGTCAAAAACGTGATGAAGAACATCATGGCCGGCCTGCAGC AGACCAACAGCGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGCGCCAGAGC ACCCGGAACCTACCCCAAGGTCAACGTGATCAACTTCACCACCTCT TGGAGCGACGGCCTGGCCCTGAACGCCCTGATCCACAGCCACCG GCCCCGACCTGTTTCGACTGGAACAGCGTGGTCTGCCAGCAGAGCG

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	CCACCCAGCGGCTGGAACACGCCTTCAATATCGCCAGATACCAG CTGGGCATCGAGAAGCTGCTGGATCCCGAGGACGTGGACACCAC CTACCCCGACAAGAAATCCATCCTGATGTATATCACCAGCCTGTT CCAGGTGCTGCCCCAGCAGGTGTCCATCGAGGCCATCCAGGAAG TGGAATGCTGCCCAGACCCCCCAAAGTGACCAAAGAGGAACAC TTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACAGCCAGCAGATCACCGTG TCCCTGGCTCAGGGCTACGAGCGGACCAGCAGCCCCAAGCCCCG GTTCAAGAGCTACGCCTACACCCAGGCCGCCTACGTGACCACCA GCGACCCCAACCAGAAGCCCATTCCCCAGCCAGCATCTGGAAGCC CCCGAGGACAAGAGCTTCGGCAGCAGCCTGATGGAAAGCGAAGT GAACCTGGACAGATACCAGACCGCCCTGGAAGAGGTGCTGTCCT GGCTGCTGAGCGCCGAGGATACACTGCAGGCCCAGGGCGAGATC AGCAACGACGTGGAAGTGGTGAAGAGACCAGTTCCACACCCACGA GGGCTACATGATGGACCTGACCGCCCACCAGGGCAGAGTGGGCA ACATCCTGCAGCTGGGCAGCAAGCTGATCGGCACCGGCAAGCTG AGCGAGGACGAAGAGACAGAGGTGCAGGAACAGATGAACCTGC TGAACAGCAGATGGGAGTGCCTGCGGGTGGCCAGCATGGAAAAG CAGAGCAACCTGCACAGAGTTTTAATGGATCTCCAGAATCAGAA AGAGATCACCCACGTGTCCCAGGCTCTGCTGGAAGTGGAACAGC TGCTGAACGCCCCCGACCTGTGCGCCAAGGACTTCGAGGATCTGT TCAAGCAGGAAGAGAGCCTGAAGAATATCAAGGACTCCCTGCAG CAGTCCAGCGGCCGGATCGACATCATCCACAGCAAGAAAACAGC CGCCCTGCAGTCCGCCACCCCCGTGGAAAGAGTGAAGCTGCAGG AAGCCCTGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGTGAACAAG ATGTACAAGGACCGGCAGGGCAGATTTCGACCGCAGCGTGGAAAA GTGGCGGCGGTTCCACTACGACATCAAGATCTTCAACCAGTGGCT GACCGAGGCCGAGCAGTTCCTGAGAAAGACCCAGATCCCCGAGA ACTGGGAGCACGCCAAGTACAAGTGGTATCTGAAAGAGCTGCAG GACGGCATCGGCCAGCGGCAGACAGTGGTCCGCACCCTGAATGC CACCGGCGAGGAAATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACCGACGCCA GCATCCTGCAGGAAAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGCGGTGGCAG GAAGTGTGCAAGCAGCTGAGCGACCGGAAGAAGCGGCTGGAAG AACAGGCCCTGGCCTGACCACAATCGGCGCCAGCCCTACCCAG

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	ACCGTGACCCTGGTGACACAGCCCGTGGTGACAAAAGAGACAGC CATCAGCAAGCTGGAAATGCCCAGCAGCCTGATGCTGGAAAGCG ACCAGTGGAAGCGGCTGCACCTGAGCCTGCAGGAACTGCTGGTC TGGCTGCAGCTGAAGGACGACGAGCTGAGCAGACAGGCCCCCAT CGGCGGCGATTTCCCCGCCGTGCAGAAACAGAACGACGTGCACC GGGCCTTCAAGCGCGAGCTGAAAACAAAAGAACCCGTGATCATG AGCACCTTGGAACCGTGCGGATCTTCCTGACCGAGCAGCCCCTG GAAGGCCTTGAAAAGCTGTACCAGGAACCCAGAGAGCTGCCCCC CGAGGAACGGGCCCAGAACGTGACCAGACTGCTGCGGAAGCAGG CCGAAGAGGTCAACACCGAGTGGGAGAAGCTGAACCTGCACAGC GCCGACTGGCAGCGGAAGATCGACGAGACACTGGAACGGCTGCA GGAAGTGCAGGAGGCCACCGACGAGCTGGACCTGAAGCTGAGAC AGGCCGAAGTGATCAAGGGCAGCTGGCAGCCCGTGGGCGACCTG CTGATCGACTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAAGTGAAGGCCCT GCGGGGCGAGATCGCCCCCTGAAAGAAAACGTGTCCACGTGA ACGACCTGGCCCGGCAGCTGACCACCCTGGGCATCCAGCTGAGC CCCTACAACCTGTCCACCCTGGAAGATCTGAACACCCGGTGGAA GCTGCTGCAGGTGGCCGTGGAAGATAGAGTGCGGCAGCTGCACG AGGCCACAGAGACTTTGGCCCTGCCAGCCAGCACTTCCTGAGCA CCTCTGTGCAGGGACCCTGGGAGAGAGCCATCAGCCCCAACAAG GTGCCCTACTACATCAACCACGAGACACAGACCACCTGTTGGGA CCACCCCAAGATGACCGAGCTGTACCAGAGCCTGGCCGACCTGA ACAATGTGCGGTTTCAGCGCCTACCGGACCGCCATGAAGCTGAGG CGGCTGCAGAAAGCTCTGTGCCTGGATCTGCTGAGCCTGAGCGCC GCCTGCGACGCCCTGGACCAGCACAACTGAAGCAGAACGACCA GCCCATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACAATCTA CGACAGGCTGGAACAGGAACACAACAATCTGGTCAACGTGCCCC TGTGCGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTACGACA CCGGCCGGACCGGCAGAATCCGGGTGCTGAGCTTCAAGACCGGC ATCATCAGCCTGTGCAAGGCCCACCTGGAAGATAAGTACCGCTA CCTGTTCAAACAGGTGGCCAGCTCCACCGGCTTTTGGCAGCAGCG GAGACTGGGCCTGCTGCTGCACGACAGCATCCAGATCCCCAGAC AGCTGGGCGAGGTGGCCTCCTTCGGCGGCAGCAACATTGAGCCC

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	AGCGTGCGGAGCTGCTTCCAGTTCGCCAACAACAAGCCCGAGAT CGAGGCCGCCCTGTTCTTGACTGGATGAGACTGGAACCCAGAG GCATGGTGTGGCTGCCCCGTGCTGCATCGGGTGGCCGCTGCCGAGA CAGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCC ATCATCGGCTTCCGGTACAGAAGCCTGAAGCACTTCAACTACGAT ATCTGCCAGAGCTGCTTCTTCAGCGGCAGAGTGGCCAAGGGCCA CAAAATGCACTACCCCATGGTGGAACTACTGCACCCCCACCACCA GCGGCGAGGATGTGCGGGACTTCGCCAAGGTGCTGAAAAACAAG TTCCGGACCAAGCGGTACTTTGCCAAGCACCCCCGGATGGGCTAC CTGCCCCGTGCAGACAGTGCTGGAAGGCGACAACATGGAAACCTG A
SEQ ID NO:104 BXA-212372- J4V4	ATGCTGTGGTGGGAGGAAGTGGAAGATTGCTACGAGCGCGAGGA CGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTGAACGCCAGTTCA GCAAGTTCGGCAAGCAGCACATCGAGAACCTGTTTCAGCGACCTG CAGGACGGCAGACGGCTGCTGGACCTGCTGGAAGGCCTGACCGG CCAGAAGCTGCCCCAAGAGAAGGGCAGCACCAGAGTGCACGCCC TGAACAACGTGAACAAGGCCCTGCGGGTGCTGCAGAACAACAAC GTGGACCTGGTGAACATCGGCAGCACCGACATCGTGGACGGCAA CCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTG GCAGGTCAAAAACGTGATGAAGAACATCATGGCCGGCCTGCAGC AGACCAACAGCGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGCGCCAGAGC ACCCGGAACCTACCCCCAGGTCAACGTGATCAACTTCACCACCTCT TGGAGCGACGGCCTGGCCCTGAACGCCCTGATCCACAGCCACCG GCCCCGACCTGTTGACTGGAACAGCGTGGTCTGCCAGCAGAGCG CCACCCAGCGGCTGGAACACGCCTTCAATATCGCCAGATACCAG CTGGGCATCGAGAAGCTGCTGGATCCCGAGGACGTGGACACCAC CTACCCCGACAAGAAATCCATCCTGATGTATATCACCAGCCTGTT CCAGGTGCTGCCCCAGCAGGTGTCCATCGAGGCCATCCAGGAAG TGGAATGCTGCCCAGACCCCCCAAAGTGACCAAAGAGGAACAC TTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACAGCCAGCAGATCACCGTG TCCCTGGCTCAGGGCTACGAGCGGACCAGCAGCCCCAAGCCCCG GTTCAAGAGCTACGCCTACACCCAGGCCGCCTACGTGACCACCA GCGACCCCACCAGAAGCCCATTCCCCAGCCAGCATCTGGAAGCC

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	CCCGAGGACAAGAGCTTCGGCAGCAGCCTGATGGAAAGCGAAGT GAACCTGGACAGATAACCAGACCGCCCTGGAAGAGGTGCTGTCT GGCTGCTGAGCGCCGAGGATACACTGCAGGCCAGGGCGAGATC AGCAACGACGTGGAAGTGGTGAAAGACCAGTTCCACACCCACGA GGGCTACATGATGGACCTGACCGCCACCAGGGCAGAGTGGGCA ACATCCTGCAGCTGGGCAGCAAGCTGATCGGCACCGGCAAGCTG AGCGAGGACGAAGAGACAGAGGTGCAGGAACAGATGAACCTGC TGAACAGCAGATGGGAGTGCCTGCGGGTGGCCAGCATGGAAAAG CAGAGCAACCTGCACAGAGTTTTAATGGATCTCACCTACCTGACC GAGATCACCCACGTGTCCCAGGCTCTGCTGGAAGTGGAACAGCT GCTGAACGCCCCCGACCTGTGCGCCAAGGACTTCGAGGATCTGTT CAAGCAGGAAGAGAGCCTGAAGAATATCAAGGACTCCCTGCAGC AGTCCAGCGGCCGGATCGACATCATCCACAGCAAGAAAACAGCC GCCCTGCAGTCCGCCACCCCCGTGGAAAGAGTGAAGCTGCAGGA AGCCCTGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGTGAACAAGA TGTACAAGGACCGGCAGGGCAGATTTCGACCGCAGCGTGGAAG TGGCGGCGGTTCCACTACGACATCAAGATCTTCAACCAGTGGCTG ACCGAGGCCGAGCAGTTCCTGAGAAAGACCCAGATCCCCGAGAA CTGGGAGCACGCCAAGTACAAGTGGTATCTGAAAGAGCTGCAGG ACGGCATCGGCCAGCGGCAGACAGTGGTCCGCACCCTGAATGCC ACCGGCGAGGAAATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACCGACGCCAG CATCCTGCAGGAAAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGCGGTGGCAGG AAGTGTGCAAGCAGCTGAGCGACCGGAAGAAGCGGCTGGAAGA ACAGGCCCCTGGCCTGACCACAATCGGCGCCAGCCCTACCCAGA CCGTGACCCTGGTGACACAGCCCGTGGTGACAAAAGAGACAGCC ATCAGCAAGCTGGAAATGCCCAGCAGCCTGATGCTGGAAAGCGA CCAGTGGAAGCGGCTGCACCTGAGCCTGCAGGAAGTGTGGTCT GGCTGCAGCTGAAGGACGACGAGCTGAGCAGACAGGCCCCCATC GGCGGCGATTTCCCGCCGTGCAGAAACAGAACGACGTGCACCG GGCCTTCAAGCGCGAGCTGAAAACAAAAGAACCCGTGATCATGA GCACCCTGGAAACCGTGCGGATCTTCCTGACCGAGCAGCCCCTGG AAGGCCTGGAAAAGCTGTACCAGGAACCCAGAGAGCTGCCCCC GAGGAACGGGCCCAGAACGTGACCAGACTGCTGCGGAAGCAGGC

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	CGAAGAGGTCAACACCGAGTGGGAGAAGCTGAACCTGCACAGCG CCGACTGGCAGCGGAAGATCGACGAGACACTGGAACGGCTGCAG GAACTGCAGGAGGCCACCGACGAGCTGGACCTGAAGCTGAGACA GGCCGAAGTGATCAAGGGCAGCTGGCAGCCCGTGGGCGACCTGC TGATCGACTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAAGTGAAGGCCCTG CGGGGCGAGATCGCCCCCTGAAAGAAAACGTGTCCACGTGAA CGACCTGGCCCGGCAGCTGACCACCCTGGGCATCCAGCTGAGCC CCTACAACCTGTCCACCCTGGAAGATCTGAACACCCGGTGGAAG CTGCTGCAGGTGGCCGTGGAAGATAGAGTGCGGCAGCTGCACGA GGCCACAGAGACTTTGGCCCTGCCAGCCAGCACTTCCTGAGCAC CTCTGTGCAGGGACCCTGGGAGAGAGCCATCAGCCCCAACAAGG TGCCCTACTACATCAACCACGAGACACAGACCACCTGTTGGGACC ACCCAAGATGACCGAGCTGTACCAGAGCCTGGCCGACCTGAAC AATGTGCGGTTTCAGCGCCTACCGGACCGCCATGAAGCTGAGGCG GCTGCAGAAAGCTCTGTGCCTGGATCTGCTGAGCCTGAGCGCCGC CTGCGACGCCCTGGACCAGCACAACTGAAGCAGAACGACCAGC CCATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACAATCTACG ACAGGCTGGAACAGGAACACAACAATCTGGTCAACGTGCCCCCTG TGCGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTACGACACC GGCCGGACCGGCAGAATCCGGGTGCTGAGCTTCAAGACCGGCAT CATCAGCCTGTGCAAGGCCCCACCTGGAAGATAAGTACCGCTACCT GTTCAAACAGGTGGCCAGCTCCACCGGCTTTTGGCACCAGCGGA GACTGGGCCTGCTGCTGCACGACAGCATCCAGATCCCCAGACAG CTGGGCGAGGTGGCCTCCTTCGGCGGCAGCAACATTGAGCCCAG CGTGCGGAGCTGCTTCCAGTTCGCCAACAACAAGCCCGAGATCG AGGCCGCCCTGTTCTTGGACTGGATGAGACTGGAACCCCAGAGC ATGGTGTGGCTGCCCGTGCTGCATCGGGTGGCCGCTGCCGAGACA GCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCAT CATCGGCTTCCGGTACAGAAGCCTGAAGCACTTCAACTACGATAT CTGCCAGAGCTGCTTCTTCAGCGGCAGAGTGGCCAAGGGCCACA AAATGCACTACCCCATGGTGAATACTGCACCCCCACCACCAGC GGCGAGGATGTGCGGGACTTCGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTT CCGGACCAAGCGGTACTTTGCCAAGCACCCCCGGATGGGCTACCT

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	GCCCCGTGCAGACAGTGCTGGAAGGCGACAACATGGAAACCTGA
SEQ ID NO:105 BXA-212372- J4	ATGCTGTGGTGGGAGGAAGTGGAAAGATTGCTACGAGCGCGAGGA CGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTGAACGCCCAGTTCA GCAAGTTCGGCAAGCAGCACATCGAGAACCTGTTCAGCGACCTG CAGGACGGCAGACGGCTGCTGGACCTGCTGGAAGGCCTGACCGG CCAGAAGCTGCCCCAAAGAGAAGGGCAGCACCAGAGTGCACGCCC TGAACAACGTGAACAAGGCCCTGCGGGTGCTGCAGAACAAACAAC GTGGACCTGGTGAACATCGGCAGCACCGACATCGTGGACGGCAA CCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTG GCAGGTCAAAAACGTGATGAAGAACATCATGGCCGGCCTGCAGC AGACCAACAGCGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGCGCCAGAGC ACCCGGAAC TACCCCCAGGTCAACGTGATCAACTTCACCACCTCT TGGAGCGACGGCCTGGCCCTGAACGCCCTGATCCACAGCCACCG GCCCCGACCTGTTCGACTGGAACAGCGTGGTCTGCCAGCAGAGCG CCACCCAGCGGCTGGAACACGCCTTCAATATCGCCAGATACCAG CTGGGGCATCGAGAAGCTGCTGGATCCCGAGGACGTGGACACCAC CTACCCCGACAAGAAATCCATCCTGATGTATATCACCAGCCTGTT CCAGGTGCTGCCCCAGCAGGTGTCCATCGAGGCCATCCAGGAAG TGGAATGCTGCCCAGACCCCCCAAAGTGACCAAAGAGGAACAC TTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACAGCCAGCAGATCACCGTG TCCCTGGCTCAGGGCTACGAGCGGACCAGCAGCCCCAAGCCCCG GTTCAAGAGCTACGCCTACACCCAGGCCGCCTACGTGACCACCA GCGACCCCACCAGAAGCCCATTCCCCAGCCAGCATCTGGAAGCC CCCGAGGACAAGAGCTTCGGCAGCAGCCTGATGGAAAGCGAAGT GAACCTGGACAGATACCAGACCGCCCTGGAAGAGGTGCTGTCCT GGCTGCTGAGCGCCGAGGATACTGCAGGCCCAGGGCGAGATC AGCAACGACGTGGAAGTGGTGAAAGACCAGTTCCACACCCACGA GGGCTACATGATGGACCTGACCGCCCACCAGGGCAGAGTGGGCA ACATCCTGCAGCTGGGCAGCAAGCTGATCGGCACCGGCAAGCTG AGCGAGGACGAAGAGACAGAGGTGCAGGAACAGATGAACCTGC TGAACAGCAGATGGGAGTGCCTGCGGGTGGCCAGCATGGAAAAG CAGAGCAACCTGCACAGCTACGTGCCCAGCACCTACCTGACCGA GATCACCCACGTGTCCCAGGCTCTGCTGGAAGTGGAACAGCTGCT

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	GAACGCCCCCGACCTGTGCGCCAAGGACTTCGAGGATCTGTTCAA GCAGGAAGAGAGCCTGAAGAATATCAAGGACTCCCTGCAGCAGT CCAGCGGCCGGATCGACATCATCCACAGCAAGAAAACAGCCGCC CTGCAGTCCGCCACCCCCGTGGAAAGAGTGAAGCTGCAGGAAGC CCTGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGTGAACAAGATGT ACAAGGACCGGCAGGGCAGATTTCGACCGCAGCGTGGAAAAGTGG CGGCGGTTCCTACTACGACATCAAGATCTTCAACCAGTGGCTGACC GAGGCCGAGCAGTTCCTGAGAAAGACCCAGATCCCCGAGAACTG GGAGCACGCCAAGTACAAGTGGTATCTGAAAGAGCTGCAGGACG GCATCGGCCAGCGGCAGACAGTGGTCCGCACCCTGAATGCCACC GGCGAGGAAATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACCGACGCCAGCAT CCTGCAGGAAAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGCGGTGGCAGGAAG TGTGCAAGCAGCTGAGCGACCGGAAGAAGCGGCTGGAAGAACA GGCCCCTGGCCTGACCACAATCGGCGCCAGCCCTACCCAGACCGT GACCCTGGTGACACAGCCCGTGGTGACAAAAGAGACAGCCATCA GCAAGCTGGAAATGCCCAGCAGCCTGATGCTGGAAAGCGACCAG TGGAAGCGGCTGCACCTGAGCCTGCAGGAACTGCTGGTCTGGCT GCAGCTGAAGGACGACGAGCTGAGCAGACAGGCCCCCATCGGCG GCGATTTCCCCGCCGTGCAGAAACAGAACGACGTGCACCGGGCC TTCAAGCGCGAGCTGAAAACAAAAGAACCCGTGATCATGAGCAC CCTGGAAACCGTGCGGATCTTCCTGACCGAGCAGCCCCTGGAAG GCCTGGAAAAGCTGTACCAGGAACCCAGAGAGCTGCCCCCGAG GAACGGGGCCAGAACGTGACCAGACTGCTGCGGAAGCAGGCCGA AGAGGTCAACACCGAGTGGGAGAAGCTGAACCTGCACAGCGCCG ACTGGCAGCGGAAGATCGACGAGACACTGGAACGGCTGCAGGAA CTGCAGGAGGCCACCGACGAGCTGGACCTGAAGCTGAGACAGGC CGAAGTGATCAAGGGCAGCTGGCAGCCCGTGGGCGACCTGCTGA TCGACTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAAGTGAAGGCCCTGCGG GGCGAGATCGCCCCCTGAAAGAAAACGTGTCCACGTGAACGA CCTGGCCCCGGCAGCTGACCACCCTGGGCATCCAGCTGAGCCCCTA CAACCTGTCCACCCTGGAAGATCTGAACACCCGGTGGAAAGCTGCT GCAGGTGGCCGTGGAAGATAGAGTGCGGCAGCTGCACGAGGCCC ACAGAGACTTTGGCCCTGCCAGCCAGCACTTCCTGAGCACCTCTG

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	TGCAGGGACCCTGGGAGAGAGCCATCAGCCCCAACAAGGTGCCC TACTACATCAACCACGAGACACAGACCACCTGTTGGGACCACCC CAAGATGACCGAGCTGTACCAGAGCCTGGCCGACCTGAACAATG TGCGGTTCAGCGCCTACCGGACCGCCATGAAGCTGAGGCGGCTG CAGAAAGCTCTGTGCCTGGATCTGCTGAGCCTGAGCGCCGCCTGC GACGCCCTGGACCAGCACAACCTGAAGCAGAACGACCAGCCCAT GGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACAATCTACGACAG GCTGGAACAGGAACACAACAATCTGGTCAACGTGCCCCTGTGCG TGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCTGAATGTGTACGACACCGGCC GGACCGGCAGAATCCGGGTGCTGAGCTTCAAGACCGGCATCATC AGCCTGTGCAAGGCCCACCTGGAAGATAAGTACCGCTACCTGTTC AAACAGGTGGCCAGCTCCACCGGCTTTTGCGACCAGCGGAGACT GGGCCTGCTGCTGCACGACAGCATCCAGATCCCCAGACAGCTGG GCGAGGTGGCCTCCTTCGGCGGCAGCAACATTGAGCCCAGCGTG CGGAGCTGCTTCCAGTTCGCCAACAACAAGCCCGAGATCGAGGC CGCCCTGTTCTTGACTGGATGAGACTGGAACCCCAGAGCATGGT GTGGCTGCCCCTGCTGCATCGGGTGGCCGCTGCCGAGACAGCCA AGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGCCCCATCATC GGCTTCCGGTACAGAAGCCTGAAGCACTTCAACTACGATATCTGC CAGAGCTGCTTCTTCAGCGGCAGAGTGGCCAAGGGCCACAAAAT GCACTACCCCATGGTGGAATACTGCACCCCCACCACCAGCGGCG AGGATGTGCGGGACTTCGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTCCGG ACCAAGCGGTACTTTGCCAAGCACCCCCGGATGGGCTACCTGCCC GTGCAGACAGTGCTGGAAGGCGACAACATGGAAACCTGA
SEQ ID NO:106 BXA-212372	ATGCTGTGGTGGGAGGAAGTGGAAGATTGCTACGAGCGCGAGGA CGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTGAACGCCCAGTTCA GCAAGTTCGGCAAGCAGCACATCGAGAACCTGTTTCAGCGACCTG CAGGACGGCAGACGGCTGCTGGACCTGCTGGAAGGCCTGACCGG CCAGAAGCTGCCCCAAAGAGAAGGGCAGCACCAGAGTGACGCCC TGAACAACGTGAACAAGGCCCTGCGGGTGCTGCAGAACAACAAC GTGGACCTGGTGAACATCGGCAGCACCGACATCGTGGACGGCAA CCACAAGCTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACATCATCCTGCACTG GCAGGTCAAAAACGTGATGAAGAACATCATGGCCGGCCTGCAGC

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	AGACCAACAGCGAGAAGATCCTGCTGAGCTGGGTGCGCCAGAGC ACCCGGAAC TACCCCAAGGTCAACGTGATCAACTTCACCACCTCT TGGAGCGACGGCCTGGCCCTGAACGCCCTGATCCACAGCCACCG GCCCCACCTGTTCTGACTGGAACAGCGTGGTCTGCCAGCAGAGCG CCACCCAGCGGCTGGAACACGCCTTCAATATCGCCAGATACCAG CTGGGCATCGAGAAGCTGCTGGATCCCGAGGACGTGGACACCAC CTACCCCGACAAGAAATCCATCCTGATGTATATCACCAGCCTGTT CCAGGTGCTGCCCCAGCAGGTGTCCATCGAGGCCATCCAGGAAG TGGAATGCTGCCCCAGACCCCCCAAAGTGACCAAAGAGGAACAC TTCCAGCTGCACCACCAGATGCACTACAGCCAGCAGATCACCGTG TCCCTGGCTCAGGGCTACGAGCGGACCAGCAGCCCCAAGCCCCG GTTCAAGAGCTACGCCTACACCCAGGCCGCCTACGTGACCACCA GCGACCCCAACCAGAAGCCCATTCCCCAGCCAGCATCTGGAAGCC CCCGAGGACAAGAGCTTCGGCAGCAGCCTGATGGAAAGCGAAGT GAACCTGGACAGATACCAGACCGCCCTGGAAGAGGTGCTGTCCT GGCTGCTGAGCGCCGAGGATACACTGCAGGCCCAGGGCGAGATC AGCAACGACGTGGAAGTGGTGAAAGACCAGTTCCACACCCACGA GGGCTACATGATGGACCTGACCGCCCACCAGGGCAGAGTGGGCA ACATCCTGCAGCTGGGCAGCAAGCTGATCGGCACCGGCAAGCTG AGCGAGGACGAAGAGACAGAGGTGCAGGAACAGATGAACCTGC TGAACAGCAGATGGGAGTGCCTGCGGGTGGCCAGCATGGAAAAG CAGAGCAACCTGCACATCCACACCGTGCGGGAAGAGACAATGAT GGTGATGACCGAGGACATGCCCCTGGAAATCAGCTACGTGCCCA GCACCTACCTGACCGAGATCACCCACGTGTCCCAGGCTCTGCTGG AAGTGGAACAGCTGCTGAACGCCCCCGACCTGTGCGCCAAGGAC TTCGAGGATCTGTTCAAGCAGGAAGAGAGCCTGAAGAATATCAA GGACTCCCTGCAGCAGTCCAGCGGCCGGATCGACATCATCCACA GCAAGAAAACAGCCGCCCTGCAGTCCGCCACCCCCGTGGAAAGA GTGAAGCTGCAGGAAGCCCTGAGCCAGCTGGACTTCCAGTGGGA GAAAGTGAACAAGATGTACAAGGACCGGCAGGGCAGATTTCGACC GCAGCGTGGAAGAGTGGCGGGCGGTTCCACTACGACATCAAGATC TTCAACCAGTGGCTGACCGAGGCCGAGCAGTTCCTGAGAAAGAC CCAGATCCCCGAGAAGTGGGAGCACGCCAAGTACAAGTGGTATC

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	TGAAAGAGCTGCAGGACGGCATCGGCCAGCGGCAGACAGTGGTC CGCACCCCTGAATGCCACCGGCGAGGAAATCATCCAGCAGAGCAG CAAGACCGACGCCAGCATCCTGCAGGAAAAGCTGGGCAGCCTGA ACCTGCGGTGGCAGGAAGTGTGCAAGCAGCTGAGCGACCGGAAG AAGCGGCTGGAAGAACAGGCCCCCTGGCCTGACCACAATCGGCGC CAGCCCTACCCAGACCGTGACCCTGGTGACACAGCCCGTGGTGA CAAAAGAGACAGCCATCAGCAAGCTGGAAATGCCCAGCAGCCTG ATGCTGGAAAGCGACCAGTGGAAGCGGCTGCACCTGAGCCTGCA GGAAGTGTGCTGGTCTGGCTGCAGCTGAAGGACGACGAGCTGAGCA GACAGGCCCCCATCGGCGGCGATTTCCTCCCGCCGTGCAGAAACAG AACGACGTGCACCGGGCCTTCAAGCGCGAGCTGAAAACAAAAGA ACCCGTGATCATGAGCACCTTGGAACCGTGCGGATCTTCCTGAC CGAGCAGCCCCTGGAAGGCCTGGAAAAGCTGTACCAGGAACCCA GAGAGCTGCCCCCGAGGAACGGGCCCAGAACGTGACCAGACTG CTGCGGAAGCAGGCCGAAGAGGTCAACACCGAGTGGGAGAAGCT GAACCTGCACAGCGCCGACTGGCAGCGGAAGATCGACGAGACAC TGGAACGGCTGCAGGAAGTGCAGGAGGCCACCGACGAGCTGGAC CTGAAGCTGAGACAGGCCGAAGTGATCAAGGGCAGCTGGCAGCC CGTGGGCGACCTGCTGATCGACTCCCTGCAGGACCACCTGGAAA AAGTGAAGGCCCTGCGGGGCGAGATCGCCCCCTGAAAGAAAAC GTGTCCACGTGAACGACCTGGCCCCGGCAGCTGACCACCCTGGG CATCCAGCTGAGCCCCTACAACCTGTCCACCCTGGAAGATCTGAA CACCCGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCCGTGGAAGATAGAGTGC GGCAGCTGCACGAGGCCACAGAGACTTTGGCCCTGCCAGCCAG CACTTCCTGAGCACCTCTGTGCAGGGACCCTGGGAGAGAGCCATC AGCCCCAACAAGGTGCCCTACTACATCAACCACGAGACACAGAC CACCTGTTGGGACCACCCCAAGATGACCGAGCTGTACCAGAGCC TGGCCGACCTGAACAATGTGCGGTTTCAGCGCCTACCGGACCGCC ATGAAGCTGAGGCGGCTGCAGAAAGCTCTGTGCCTGGATCTGCT GAGCCTGAGCGCCGCCTGCGACGCCCTGGACCAGCACAACCTGA AGCAGAACGACCAGCCCATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGC CTGACCACAATCTACGACAGGCTGGAACAGGAACACAACAATCT GGTCAACGTGCCCCTGTGCGTGGACATGTGCCTGAATTGGCTGCT

SEQ ID NO и описание	Последовательность
	GAATGTGTACGACACCGGCCGGACCGGCAGAATCCGGGTGCTGA GCTTCAAGACCGGCATCATCAGCCTGTGCAAGGCCACCTGGAA GATAAGTACCGCTACCTGTTCAAACAGGTGGCCAGCTCCACCGGC TTTTGCGACCAGCGGAGACTGGGCCTGCTGCTGCACGACAGCATC CAGATCCCCAGACAGCTGGGCGAGGTGGCCTCCTTCGGCGGCAG CAACATTGAGCCCAGCGTGCGGAGCTGCTTCCAGTTCGCCAACA CAAGCCCGAGATCGAGGCCGCCCTGTTCTTGGACTGGATGAGAC TGGAACCCAGAGCATGGTGTGGCTGCCCCGTGCTGCATCGGGTG GCCGCTGCCGAGACAGCCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTG CAAAGAGTGCCCCATCATCGGCTTCCGGTACAGAAGCCTGAAGC ACTTCAACTACGATATCTGCCAGAGCTGCTTCTTCAGCGGCAGAG TGGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGGAAATACTGC ACCCACCACCAGCGGCGAGGATGTGCGGGACTTCGCCAAGGT GCTGAAAAACAAGTTCCGGACCAAGCGGTACTTTGCCAAGCACC CCCGGATGGGCTACCTGCCCGTGCAGACAGTGCTGGAAGGCGAC AACATGGAAACCTGA

SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 101 кодируют один и тот же миниатюризированный дистрофин, за исключением того, что SEQ ID NO: 100 является кодон-оптимизированным по отношению к SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид миниатюризированного дистрофина, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, приблизительно на 60%, по меньшей мере, приблизительно на 70%, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 100, где полипептид миниатюризированного дистрофина при экспрессии из нуклеотидной последовательности обладает, по меньшей мере, одной активностью дистрофина. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид миниатюризированного дистрофина, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, приблизительно на 60%, по меньшей мере, приблизительно на 70%, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по

[illegible]

нуклеотидной последовательности обладает, по меньшей мере, одной активностью дистрофина. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид миниатюризированного дистрофина, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, приблизительно на 60%, по меньшей мере, приблизительно на 70%, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 105, где полипептид миниатюризированного дистрофина при экспрессии из нуклеотидной последовательности обладает, по меньшей мере, одной активностью дистрофина.

Некодирующие полинуклеотиды

В некоторых аспектах в настоящем документе предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты, например, ДНК или РНК, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид миниатюризированного дистрофина.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе, содержат некодирующие компоненты. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе, содержат промоторы. Определенные иллюстративные регуляторные последовательности для экспрессии в млекопитающей клетке-хозяине включают вирусные элементы, которые определяют высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, например, промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовируса (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и полиомы. Альтернативно, можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убиквитина или промотор β -глобина. Кроме того, можно использовать регуляторные элементы, состоящие из последовательностей из разных источников, такие как система промоторов SRa, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинного концевой повтора вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (Takebe, Y. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472 (1988)). В определенных вариантах осуществления регуляторная последовательность содержит тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор управляет экспрессией гена, представляющего интерес, в ткани, выбранной из группы, состоящей из сердца, печени, легких, глаз, нервной системы, лимфатической системы, центральной нервной системы,

нервных клеток, мышцы и стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления промоторы, описываемые в настоящем документе, являются тканеспецифическими промоторами. В некоторых вариантах осуществления промотор управляет экспрессией терапевтического белка в гепатоцитах, мышечных клетках, эндотелиальных клетках, синусоидальных клетках, нервных клетках или любом их сочетании. В некоторых вариантах осуществления промотор выбран из группы, состоящей из промотора C5-12(T), промотора MLC2v-cTNT455, промотора гена синапсина 1, промотора тиретина мышцы (mTTR), промотора эндогенного человеческого фактора VIII (F8), промотора человеческого альфа-1-антитрипсина (hAAT), минимального промотора альбумина человека, промотора мышинового альбумина, промотора тристетрапролина (TTP), промотора CASI, промотора CAG, промотора цитомегаловируса (CMV), промотора α 1-антитрипсина (AAT), промотора мышечной креатинкиназы (MCK), промотора тяжелой цепи альфа миозина (α MHC), промотора миоглобина (MB), промотора десмина (DES), промотора SPc5-12, промотора 2R5Sc5-12, промотора dMCK, промотора tMCK, промотора α -синуклеина и промотора фосфоглицераткиназы (PGK). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор C5-12(T).

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе, содержат интронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность расположена 5' по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид миниатюризированного дистрофина. В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность расположена 3' по отношению к промотору. В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность содержит синтетическую интронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления интронная последовательность представляет собой интронную последовательность SV40.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе, содержат посттранскрипционный регуляторный элемент. В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент расположен 3' по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид миниатюризированного дистрофина. В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит мутированный посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), участок связывания микроРНК или последовательность ДНК, нацеленную на ядро, или любое их сочетание.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты,

описываемые в настоящем документе, содержат 3'UTR последовательность поли(A) хвоста. В некоторых вариантах осуществления 3'UTR последовательность поли(A) хвоста выбрана из группы, состоящей из поли(A) bGH, поли(A) актина, поли(A) гемоглобина, поли(A) дистрофина и любого их сочетания. В некоторых вариантах осуществления 3'UTR последовательность поли(A) хвоста содержит нуклеотиды из N-концевой части 3'UTR эндогенного дистрофина. В некоторых вариантах осуществления 3'UTR последовательность поли(A) хвоста содержит 25 нуклеотидов из N-концевой части 3'UTR эндогенного дистрофина.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе, содержат энхансерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе, содержат первый инвертированный концевой повтор (ITR) и/или второй ITR. В некоторых вариантах осуществления первый ITR и второй ITR идентичны. В некоторых вариантах осуществления первый ITR и/или второй ITR получены из аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах осуществления первый ITR получен из аденоассоциированного вируса и второй ITR получен из аденоассоциированного вируса.

Кроме того, известно, что молекула нуклеиновой кислоты может содержать дополнительные элементы, которые помогают в трансляции полипептида. Такие последовательности включают, например, последовательности Козак, присоединенные к 5'-концу полинуклеотида, кодирующего полипептид. Консенсусная последовательность Козак представляет собой последовательность, которая расположена на эукариотической мРНК, которая играет роль в инициации процесса трансляции, и имеет консенсусную последовательность (gee)gccRccAUGG (SEQ ID NO:107); где (1) строчная буква обозначает наиболее часто встречающееся основание в положении, где основание, однако, может варьироваться; (2) заглавные буквы обозначают высококонсервативные основания, т.е. последовательность «AUGG» является постоянной или редко, если вообще когда-либо, меняется, за исключением кода неоднозначности IUPAC «R», который указывает, что обычно в этом положении находится пурин (аденин или гуанин); и (3) последовательность в скобках ((gee)) имеет неопределенное значение.

В одном неограничивающем варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит функциональный вариант последовательности Козак или его фрагмент. Функциональный вариант последовательности Козак или его фрагмент будет сохранять способность увеличивать трансляцию белка по сравнению с уровнем трансляции с последовательности без лидерной последовательности. Такой функциональный фрагмент

может содержать, по меньшей мере, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 непрерывных нуклеотидов из последовательности Козак или последовательности, указанной в SEQ ID NO:107 или SEQ ID NO:108 (gccaccATGG). Альтернативно, функциональный вариант может содержать, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью Козак или последовательностью, указанной в SEQ ID NO:107 или SEQ ID NO:108.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению, управляющая экспрессией полипептида миниатюризированного дистрофина, содержит последовательность, показанную в таблице 10.

Таблица 10: Нуклеотидная последовательность (и ее доменная структура), управляющая экспрессией и кодирующая полипептид миниатюризированного дистрофина BXA-220931.

SEQ ID NO:	Описание	Нуклеотидная последовательность
109	Промотор C5-12(T)	CCGCCTTCGGCACCATTCCTCACGACACCCAAATATGGC GACGGGTGAGGAATGGTGGGGAGTTATTTTATAGAGCGG TGAGGAAGGTGGGCAGGCAGCAGGTGTTGGCGCTCTAA AAATAACTCCCGGGAGTTATTTTATAGAGCGGAGGAATG GTGGACACCCAAATATGGCGACGGTTCCTACCCGTCGC CATATTTGGGTGTCCGCCCTCGGCCGGGGCCGCATTCCT GGGGGCCGGGCGGTGCTCCCGCCCGCCTCGATAAAAGG CTCCGGGGCCGGCGGCGGCCACGAGCTACCCGGAGGA GCGGGAGGCACGCGT
110	Инtron SV40	CTCTAAGGTAAATATAAAATTTTAAAGTGTATAATGTGT TAAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCA ACCTTTGGAAGTCTAGACCACC
111	Кодирующая последовательность для миниатюризированного дистрофина	ATGCTTTGGTGGGAAGAAGTCGAGGACTGCTACGAGCG CGAGGACGTGCAGAAGAAAACCTTCACCAAATGGGTCA ACGCCAGTTCAGCAAGTTCGGCAAGCAGCACATCGAG AACCTGTTTCAGCGACCTGCAGGATGGCAGAAGGCTGCT GGATCTGCTGGAAGGCCTGACAGGCCAGAAGCTGCCTA AAGAGAAGGGCAGCACAAGAGTGCACGCCCTGAACAA

BXA-220931	CGTGAACAAGGCCCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACG TGGACCTGGTCAACATCGGCAGCACCGACATCGTGGAC GGCAATCACAACTGACCCTGGGCCTGATCTGGAACAT CATCCTGCACTGGCAAGTGAAGAACGTGATGAAGAACA TCATGGCCGGCCTGCAGCAGACCAACAGCGAGAAGATT CTGCTGAGCTGGGTCCGACAGAGCACCCGGAACCTACCC TCAAGTGAACGTGATCAACTTCACCACCTCTTGGAGCGA CGGACTGGCCCTGAATGCCCTGATTACAGCCACAGAC CTGACCTGTTCGACTGGAATAGCGTCGTGTGTCAGCAGA GCGCCACACAGAGACTGGAACACGCCTTCAATATCGCC AGATACCAGCTGGGCATCGAGAACTGCTGGACCCCGA GGATGTGGACACCACCTATCCTGACAAGAAATCCATCCT CATGTACATCACCAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCCCAGCA AGTGTCTATCGAGGCCATTCAAGAGGTCGAGATGCTGC CCAGACCTCCTAAAGTGACCAAAGAGGAACACTTCCAG CTGCACCACCAGATGCACTACTCTCAGCAGATCACCGTG TCTCTGGCCCAGGGCTACGAGAGAACAAGCAGCCCCAA GCCTCGGTTCAAGAGCTACGCCTATACACAGGCCCGCCTA CGTGACCACCAGCGATCCCACAAGAAGCCCATTTCCAA GCCAGCATCTGGAAGCCCCTGAGGACAAGAGCTTTGGC AGCAGCCTGATGGAAAGCGAAGTGAACCTGGATAGATA CCAGACAGCCCTGGAAGAGGTGCTGTCTTGGCTGCTGTC TGCCGAAGATACACTGCAGGCTCAGGGCGAGATCAGCA ACGACGTGGAAGTGGTCAAGGACCAGTTTCACACCCAC GAGGGCTACATGATGGACCTGACAGCCCATCAGGGCAG AGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAGCTGATCG GCACAGGCAAGCTGAGCGAGGACGAAGAGACAGAGGT GCAAGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCAGATGGGAGT GTCTGAGAGTGGCCAGCATGGAAAAGCAGAGCAACCTG CACCGGGTCCTGATGGATCTGCAGAATCAGAAGCTGAC CGAGATCACCCACGTGTCACAGGCCCTGCTTGAAGTGG AACAGCTGCTGAACGCCCCTGATCTGTGCGCCAAGGAC TTCGAGGATCTGTTCAAGCAAGAGGAAAGCCTGAAGAA TATCAAGGACTCTCTGCAGCAGTCCAGCGGCCGGATCG ACATCATCCACAGCAAGAAAACAGCTGCCCTGCAGTCC
------------	--

	GCCACACCTGTGGAAAGAGTGAAACTGCAAGAGGCCCT GTCTCAGCTGGACTTCCAGTGGGAGAAAGTGAACAAGA TGTACAAGGACCGGCAGGGCAGATTGACCGCTCTGTG GAAAAATGGCGGAGATTCCACTACGACATCAAGATCTT CAACCAGTGGCTGACAGAGGCCGAGCAGTTCCTGAGAA AGACACAGATCCCCGAGAACTGGGAGCACGCCAAGTAC AAGTGGTATCTGAAAGAACTGCAGGACGGCATCGGCCA GAGGCAGACAGTCGTTAGAACACTGAATGCCACCGGCG AGGAAATCATCCAGCAGAGCAGCAAGACCGACGCCAGC ATCCTGCAAGAGAAGCTGGGCAGCCTGAACCTGAGATG GCAAGAAGTGTGCAAGCAGCTGTCCGACCGGAAGAAGA GGCTGGAAGAACAGGCCCTGGCCTGACAACAATCGGA GCCTCTCCTACACAGACCGTGACACTGGTCACACAGCCC GTGGTCACCAAAGAGACAGCCATCAGCAAGCTGGAAAT GCCCTCTAGCCTGATGCTCGAGAGCGACCAGTGGGAAGA GACTGCACCTGTCTCTGCAAGAGCTGCTCGTGTGGCTGC AGCTGAAGGACGATGAACTGAGCAGACAGGCCCAATC GGAGGCGATTTTCCTGCCGTGCAGAAACAGAACGACGT GCACAGAGCCTTCAAGCGGGAAGCTGAAAACAAAAGAAC CCGTGATCATGAGCACCTTGGAACCGTGCGGATCTTCC TGACAGAGCAGCCTCTCGAAGGCCTGGAAAAGCTGTAC CAAGAGCCTAGAGAGCTGCCTCCTGAGGAACGGGCCCA GAATGTGACCAGACTGCTGAGAAAGCAGGCCGAAGAGG TCAACACCGAATGGGAGAAGCTGAACCTGCACAGCGCC GACTGGCAGAGAAAGATCGACGAGACACTGGAACGGCT GCAAGAACTCCAAGAAGCCACCGACGAGCTGGACCTGA AACTGAGGCAGGCTGAAGTGATCAAAGGCAGCTGGCAG CCAGTGGGCGACCTGCTGATTGATAGTCTGCAGGACCA CCTGGAAAAAGTGAAGGCCCTGCGGGGAGAGATCGCCC CACTGAAAGAAAACGTGTCCACGTGAACGACCTGGCC AGACAGCTGACAACCCTGGGAATCCAGCTGTCCCCTTAC AACCTGTCCACACTGGAAGATCTGAACACCCGGTGGAA ACTGCTCCAGGTGGCCGTGGAAGATAGAGTGCGACAGC TGCACGAGGCCACAGAGATTTTGGACCAGCCAGCCAG CACTTCCTGTCTACATCTGTGCAAGGCCCTTGGGAGAGA
--	--

		GCTATCAGCCCTAACAAGGTGCCCTACTACATCAACCAC GAGACACAGACCACCTGTTGGGATCACCCCAAGATGAC CGAGCTGTATCAGAGCCTGGCCGACCTGAACAATGTGC GCTTTAGCGCCTACCGGACCGCCATGAAGCTGCGGAGA CTGCAGAAAGCCCTGTGTCTGGACCTGCTGTCTCTGTCT GCAGCCTGTGATGCCCTGGACCAGCACAACTGAAGCA GAACGACCAGCCTATGGACATCCTCCAGATCATCAACT GCCTGACCACCATCTACGACCGGCTGGAACAAGAGCAC AACAACTCGTGAATGTGCCCCCTGTGCGTGGACATGTGT CTGAACTGGCTGCTGAATGTGTACGACACCGGCAGAAC CGGCAGGATCAGAGTGCTGAGCTTCAAGACCGGCATCA TCTCCCTGTGCAAAGCCCACCTCGAGGACAAGTACAGA TACCTGTTCAAACAGGTGGCCAGCTCCACCGGCTTTTGC GATCAAAGAAGGCTGGGCCTGCTGCTGCACGACAGCAT CCAGATTCTAGACAGCTGGGCGAAGTGGCCTCCTTCGG CGGATCTAATATTGAGCCTAGCGTGCGGAGCTGCTTCCA GTTTCGCCAACAACAAGCCTGAGATCGAGGCCGCTCTGTT CCTGGATTGGATGCGCCTGGAACCTCAGAGCATGGTTTG GCTGCCTGTGCTGCATAGAGTGGCCGCTGCCGAAACAG CCAAGCACCAGGCCAAGTGCAACATCTGCAAAGAGTGC CCCATCATCGGCTTCCGGTACAGATCCCTGAAGCACTTC AACTACGATATCTGCCAGAGCTGTTTCTTCTCTGGCCGC GTGGCCAAGGGCCACAAAATGCACTACCCCATGGTGGA ATACTGCACCCCTACCACATCTGGCGAAGATGTGCGGG ATTTCGCCAAGGTGCTGAAAAACAAGTTCCGGACCAAG CGGTACTTCGCTAAGCACCCCAGAATGGGCTATCTGCCC GTGCAGACAGTGCTCGAGGGCGATAACATGGAAACCTG A
112	3' UTR	GAAGTCTTTTCCACATGGCAGATGA
113	ПолиА	AATAAAAGATCCTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTT TTTTGTGTG

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид миниатюризованного дистрофина содержит последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, приблизительно на 60%, по меньшей мере, приблизительно на 70%, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по

меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную комбинированной последовательности из SEQ ID NO: 109-113.

Гетерологичные компоненты

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему раскрытию могут дополнительно содержать дополнительный элемент, например, гетерологичный компонент. Такие элементы могут способствовать экспрессии полипептида, способствовать секреции полипептида, улучшать стабильность полипептида, обеспечивать более эффективную очистку полипептида и/или модулировать активность полипептида. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный компонент представляют собой полипептидную молекулу. В других вариантах осуществления гетерологичный компонент представляют собой неполипептидную молекулу.

В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит гетерологичный компонент, слитый с полипептидом.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, описываемый в настоящем документе, содержит один или несколько дополнительных гетерологичных компонентов. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные компоненты представляют собой молекулы, увеличивающие время полужизни. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный компонент содержит альбумин или его фрагмент, Fc-область иммуноглобулина, C-концевой пептид (СТР) β -субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин или его фрагмент, или альбумин-связывающую молекулу или ее производное, или любое их сочетание.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды, описываемые в настоящем документе, содержат одну или несколько дополнительных гетерологичных компонентов. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные компоненты представляют собой молекулы, увеличивающие время полужизни. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный компонент содержит альбумин, константную область иммуноглобулина или ее часть, иммуноглобулин-связывающий полипептид, иммуноглобулин G (IgG), альбумин-связывающий полипептид (ABP), компонент PASилирования, компонент HESилирования, XTEN, компонент пегилирования или Fc-область, или любое их сочетание.

Клетки

В определенных аспектах в настоящем документе предлагаются клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) белки, описываемые в настоящем документе, и экспрессирующие векторы, содержащие нуклеотиды, которые кодируют белки, описываемые в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит молекулы нуклеиновой кислоты, описываемые в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит векторы, описываемые в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки насекомого, дрожжевой клетки, трансгенной клетки млекопитающего и растительной клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления прокариотическая клетка представляет собой бактериальную клетку.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Такие клетки-хозяева млекопитающих в качестве неограничивающих примеров включают клетки CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK293, NIH3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линия клеток мышинной миеломы, которая не продуцирует эндогенно никаких цепей иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10, HBK, NSO, HT1080 и HsS78Bst.

Векторы

Аденоассоциированный вирус (AAV)

Обзор

В настоящем документе предлагаются векторы (например, экспрессирующие векторы), содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие миниатюризированный белок дистрофина для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах и клетках, предназначенных для терапевтического вмешательства. Термин «вектор», как применяют в настоящем документе, предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана; или сущности, содержащей такие молекулы нуклеиновой кислоты, способные транспортировать другую нуклеиновую кислоту. Одним из типов векторов является «плазмида», которая обозначает замкнутую кольцевую двухцепочечную ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где

дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в геном вируса. Определенные векторы или полинуклеотиды, которые являются частью векторов, способны к автономной репликации в клетках-хозяинах, в которые их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный участок начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, тем самым, могут реплицироваться вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем документе обозначают как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «экспрессирующие векторы»). В общем, экспрессирующие векторы, подходящие для технологий рекомбинантной ДНК часто находятся в форме плазмиды. В настоящем описании «плазида» и «вектор» иногда могут использоваться взаимозаменяемо, в зависимости от контекста, поскольку плазида является наиболее общепринятой формой вектора. Однако в настоящем документе также описаны другие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы с нарушенной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют аналогичные функции.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, описываемые в настоящем документе, экспрессируются с помощью аденоассоциированного вируса (AAV). AAV является безоболочечным одноцепочечным ДНК-вирусом семейства *Parvoviridae*. В отличие от большинства других представителей семейства *Parvoviridae*, AAV дефектен по репликации и способен эффективно реплицироваться только в присутствии вируса-помощника, такого как аденовирус или вирус герпеса.

AAV был впервые обнаружен в середине 1960-х годов как загрязнитель вирусных препаратов аденовируса. См. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM, *Science*. 149(3685), 754-756 (1965). С тех пор были разработаны более безопасные и эффективные способы использования AAV в качестве рекомбинантного ДНК-вектора. См., например, Hermonat P.L. and Muzyczka N., *Proc Natl Acad Sci USA*. 81(20):6466-6470 (1984); Laughlin C.A. *et al.*, *Gene*, 23(1): 65-73 (1983); Matsushita T. *et al.*, *Gene Ther.* 5(7):938-945 (1998); и Xiao X. *et al.*, *Journal of Virology* 72(3):2224-2232 (1998). Было показано, что небольшое количество геномов AAV интегрируется в хромосомы хозяина. См. Cheung A.K., Hoggan M.D., Hauswirth W.W. *et al.*, Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human detroit 6 cells, *J. Virol.* 33:739-748 (1980). AAV иммунологически отличается от любого известного антигена аденовируса. Капсид AAV содержит геном одноцепочечной ДНК (оцДНК). См. Rose J.A., Berns K.I., Hoggan M.D. *et al.*, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 64:863–869 (1969).

ААВ имеет одноцепочечный ДНК-геном размером 4,7 т.п.н., кодирующий ген репликации (*rep*) и ген капсида (*cap*), фланкированные двумя инвертированными концевыми повторами (ITR). Он преимущественно не интегрируется и образует стабильные эписомы в неделящейся ткани. Несмотря на его высокую распространенность среди взрослого населения, ААВ не был связан ни с одним заболеванием человека. См. Gonçalves M., *Virology* 2, 43 (2005). Стабильная экспрессия ААВ в тканях, отсутствие патогенности и легкость получения высоких титров сделали его очень привлекательным вектором и популярной платформой для переноса генов.

Рекомбинантный ААВ (rAAV) представляет собой генетически измененный ААВ, в котором, как правило, часть или все гены *rep* и *cap* заменены гетерологичными трансгенными последовательностями. Рекомбинантные ААВ также могут запускать длительную экспрессию трансгена в постмитотической клетке, скорее всего, потому, что рекомбинантный ген ААВ сохраняется в основном в виде кольцевых эписом внутри ядра. Единственным *cis*-элементом ДНК rAAV, необходимым для производства rAAV, являются инвертированные терминальные повторы (ITR) ААВ, тогда как *rep*, *cap* и аденовирусные вспомогательные гены могут быть представлены в *транс*-ориентации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, описываемых в настоящем документе, rAAV содержит только гетерологичную трансгенную ДНК, фланкированную ITR, и этот геном инкапсулирован в серотип-специфический капсид ААВ.

ААВ обладает уникальными свойствами, которые делают его привлекательным в качестве векторной системы для доставки чужеродной ДНК в клетки. Заражение клеток в культуре ААВ, как правило, бывает нецитопатическим, а естественное заражение людей и других животных протекает бессимптомно. Кроме того, ААВ поражает множество различных типов клеток млекопитающих, что позволяет воздействовать на множество различных тканей *in vivo*. ААВ также обладает дополнительными преимуществами, которые делают его особенно привлекательной вирусной системой для доставки генов, включая стимулирование иммунного ответа, который является относительно мягким по сравнению с другими формами доставки генов, и постоянную экспрессию как в делящихся, так и в покоящихся клетках на основе неинтегрирующей эписомальной векторной ДНК. Кроме того, ААВ выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56° до 65°С в течение нескольких часов), что делает хранение вакцин на основе rAAV менее критичным.

Репликация вирусной ДНК не требуется для интеграции в геном клетки-хозяина, и таким образом для этого процесса не требуется вирус-помощник. Провирусный геном

AAV является инфекционным, так как ДНК клонирована в плазмиды, что делает возможным конструирование рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией, инкапсуляцией генома и интеграцией AAV, содержатся внутри ITR генома AAV, внутренний геном приблизительно в 4,7 т.п.н. (кодирующий белки репликации и структурный белок капсида, гер-сар) может таким образом быть заменен чужеродной ДНК, такой как генетическая кассета, содержащая промотор, ДНК, представляющую интерес, и сигнал полиаденилирования.

Векторы AAV могут содержать дополнительные элементы, функционирующие в *цис*- или *транс*-положении. В различных вариантах осуществления вектор AAV, который содержит геном вектора, также имеет одну или несколько последовательностей инвертированных концевых повторов (ITR), которые фланкируют 5'- или 3'-конец донорной последовательности; элемент контроля экспрессии, который управляет транскрипцией (например, промотор или энхансер) донорной последовательности, такой как конститутивный или регулируемый элемент контроля, или тканеспецифический элемент контроля экспрессии; интронную последовательность, спейсерную или филлерную полинуклеотидные последовательности; и/или полиадениновую последовательность, расположенную 3' от донорной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления AAV реплицируется с помощью вируса-помощника. В данной области известно множество таких вирусов-помощников для AAV, в том числе аденовирусы, вирусы герпеса и поксвирусы, такие как вирус осповакцины. Аденовирусы охватывают ряд различных подгрупп, хотя аденовирус типа 5 из подгруппы С является наиболее широко используемым. Многочисленные аденовирусы человека, не относящихся к человеку млекопитающих и птиц известны и доступны в хранилищах, таких как ATCC. Вирусы семейства герпеса включают, например, вирус простого герпеса (HSV) и вирус Эпштейна-Барр (EBV), а также цитомегаловирусы (CMV) и вирусы псевдобешенства (PRV), которые также доступны в хранилищах, таких как ATCC.

Иллюстративные векторы AAV содержат последовательности капсида из любого из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 или AAV-2i8, или вариант капсида из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 или AAV-2i8. Рекомбинантные векторы AAV по изобретению включают AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 или AAV-2i8 и их варианты. Конкретные варианты капсида включают варианты капсида из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 или AAV-2i8, такие как последовательность капсида с заменой, делецией или вставкой/добавлением

аминокислоты. В одном из вариантов осуществления вектор AAV представляет собой AAV9. В одном из вариантов осуществления вектор AAV представляет собой AAV5. В одном из вариантов осуществления вектор AAV представляет собой AAV8.

В некоторых аспектах раскрытие относится к AAV, обладающими способностями нацеливания на различные ткани (например, тропизмы тканей). В некоторых вариантах осуществления варианты капсидные полипептиды AAV дополнительно проявляют повышенную трансдукцию или тропизм в клетках одного или нескольких типов стволовых клеток человека по сравнению с невариантными исходными капсидными полипептидами. В некоторых вариантах осуществления типы стволовых клеток человека в качестве неограничивающих примеров включают эмбриональные стволовые клетки, стволовые клетки взрослых тканей (т.е., соматические стволовые клетки), костномозговые стволовые клетки, клетки-предшественники, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и репрограммированные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления взрослые стволовые клетки могут включать органоидные стволовые клетки (т.е. стволовые клетки, полученные из любого интересующего органа или системы органов в организме). В некоторых вариантах осуществления тканью-мишенью AAV являются половые железы, диафрагма, сердце, желудок, печень, селезенка, поджелудочная железа, мышца или почка. В некоторых вариантах осуществления AAV нацелен на органы, которые в качестве неограничивающих примеров включают кожу, волосы, ногти, сенсорные рецепторы, потовую железу, слюнные железы, кости, мышцы, головной мозг, спинной мозг, нерв, гипофиз, шишковидную железу, гипоталамус, щитовидную железу, паращитовидную железу, тимус, надпочечники, поджелудочную железу (островковая ткань), сердце, сосуды, лимфоузлы, лимфатические сосуды, тимус, селезенку, миндалины, нос, глотку, гортань, трахею, бронхи, легкие, рот, пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстую кишку, прямую кишку, анальный канал, зубы, слюнную железу, язык, печень, желчный пузырь, поджелудочную железу, аппендикс, почки, мочеточники, мочевой пузырь, уретру, семенники, семявыносящие протоки, уретру, предстательную железу, половой член, мошонку, яичники, матку, маточные (фаллопиевы) трубы, влагалище, вульву и молочную железу (грудь). Органные системы организма в качестве неограничивающих примеров включают покровную систему, скелетную систему, мышечную систему, нервную систему, эндокринную систему, сердечно-сосудистую систему, респираторную систему, дыхательную систему, пищеварительную систему, мочевыделительную систему и репродуктивную систему. В некоторых вариантах осуществления трансдукция и/или тропизм AAV с вариантными капсидными полипептидами увеличивается приблизительно на 5%, приблизительно на

10%, приблизительно на 15%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, 65%, приблизительно на 70%%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% по сравнению с AAV, имеющими невариантные капсидные полипептиды. В некоторых вариантах осуществления трансдукция и/или тропизм увеличивается приблизительно от 5% до приблизительно 80%, приблизительно от 10% до приблизительно 70%, приблизительно от 20% до приблизительно 60% или приблизительно от 30% до приблизительно 60%.

Гены AAV для репликации, капсида и сборки

Одноцепочечный геном AAV содержит три гена, *rep* (репликация), *cap* (капсид) и *aap* (сборка). Эти три гена дают, по меньшей мере, девять продуктов генов за счет использования трех промоторов, альтернативных сайтов начала трансляции и дифференциального сплайсинга.

Ген *rep* кодирует четыре белка (Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40), которые необходимы для репликации и упаковки генома вируса.

Экспрессия гена *cap* дает капсидные белки вируса (VP1; VP2; VP3), которые образуют внешнюю капсидную оболочку, защищающую вирусный геном, а также активно участвуют в связывании с клетками и в интернализации. Подсчитано, что оболочка вируса состоит из 60 белков, образующих икосаэдрическую структуру.

Ген *aap* кодирует белок, активирующий сборку (AAP), в альтернативной рамке считывания, перекрывающей ген *cap*. Считают, что этот ядерный белок обеспечивает функцию каркаса для сборки капсида и играет роль в ядрышковой локализации белков VP у некоторых серотипов AAV.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько генов *rep*, *cap* или *aap* являются природными, например, гены *rep*, *cap* или *aap* содержат все или часть генов *rep*, *cap* или *aap* парвовируса. В некоторых вариантах осуществления один или несколько генов *rep*, *cap* или *aap* содержат синтетическую последовательность.

В одном из вариантов осуществления ген *rep* содержит синтетическую последовательность. В одном из вариантов осуществления ген *cap* содержит синтетическую последовательность. В одном из вариантов осуществления ген *aap* содержит синтетическую последовательность. В одном из вариантов осуществления гены *rep* и *cap* содержат синтетическую последовательность. В одном из вариантов

AAV6. В конкретном варианте осуществления *aap* получен из генома AAV7. В конкретном варианте осуществления *aap* получен из генома AAV8. В конкретном варианте осуществления *aap* получен из генома AAV9. В конкретном варианте осуществления *aap* получен из генома AAV10. В конкретном варианте осуществления *aap* получен из генома AAV11.

Следует понимать, что конкретный геном AAV, описываемый в настоящем документе, может иметь гены, полученные из разных геномов AAV (например, геномы из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 и AAV11). Таким образом, в настоящем документе описаны AAV, которые содержат любую возможную перестановку/комбинацию *rep*, *cap* или *aap*.

В некоторых вариантах осуществления, описываемых в настоящем документе, AAV представляет собой рекомбинантный AAV (гAAV). В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствуют один или несколько из гена *rep*, гена *cap* и гена *aap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *rep*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *cap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *aap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *rep* и отсутствует ген *cap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *rep* и отсутствует ген *aap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствует ген *cap* и отсутствует ген *aap*. В некоторых вариантах осуществления в гAAV отсутствуют ген *rep*, ген *cap* и ген *aap*.

В некоторых вариантах осуществления, описываемых в настоящем документе, гAAV модифицируют таким образом, что один или несколько из гена *rep*, гена *cap* и гена *aap* мутированы таким образом, что экспрессия одного или нескольких генов AAV модифицирована. В некоторых вариантах осуществления ген *rep* мутирован. В некоторых вариантах осуществления ген *cap* мутирован. В некоторых вариантах осуществления ген *aap* мутирован. В некоторых вариантах осуществления ген *rep* и ген *cap* мутированы. В некоторых вариантах осуществления ген *rep* и ген *aap* мутированы. В некоторых вариантах осуществления ген *cap* и ген *aap* мутированы. В некоторых вариантах осуществления ген *cap*, ген *rep* и ген *aap* мутированы.

Инвертированные концевые повторы

В определенных вариантах осуществления AAV содержит первый ITR, например, 5'-ITR, и второй ITR, например, 3'-ITR. Как правило, ITR участвуют в репликации ДНК парвовируса (например, AAV) и извлечении или вырезании из прокариотической плазмиды (Samulski R.J. *et al.*, *Cell* 33(1):135-143 (1983), *Journal of Virology* 61:3096-3101 (1987); Senapathy P. *et al.*, *Journal of Molecular Biology* 179(1):1-20 (1984); Gottlieb J. and

Muzyczka N., *Molecular and Cellular Biology* 6(8): 2513-2522 (1988)). Кроме того, сообщалось, что ITR являются минимальными последовательностями, необходимыми для провирусной интеграции AAV и для упаковки ДНК AAV в вирионы (McLaughlin et al., 1988; Samulski et al., 1989). Эти элементы необходимы для эффективного размножения генома парвовируса.

В некоторых вариантах осуществления ITR содержит природные ITR, например, ITR содержит все или части ITR парвовируса. В некоторых вариантах осуществления ITR содержит синтетическую последовательность. В одном из вариантов осуществления первый ITR или второй ITR содержит синтетическую последовательность. В другом варианте осуществления каждый из первого ITR и второго ITR содержит синтетическую последовательность. В некоторых вариантах осуществления первый ITR или второй ITR содержит природную последовательность. В другом варианте осуществления каждый из первого ITR и второго ITR содержит природную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления ITR содержит ITR из генома AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой ITR из генома AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и любого их сочетания. В конкретном варианте осуществления ITR представляет собой ITR генома AAV2. В другом варианте осуществления ITR представляет собой синтетическую последовательность, генетически сконструированную таким образом, чтобы содержать на своих 5'- и 3'-концах ITR, полученные из одного или нескольких геномов AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR получены из одного и того же генома, например, из генома одного и того же вируса, или из разных геномов, например, из геномов двух или более геномов разных AAV. В определенных вариантах осуществления ITR получены из одного и того же генома AAV. В варианте осуществления два ITR, присутствующие в молекуле нуклеиновой кислоты по изобретению, являются одинаковыми и, в частности, могут представлять собой ITR AAV2. В одном конкретном варианте осуществления первый ITR и второй ITR идентичны.

В некоторых вариантах осуществления ITR образуют петлевидные структуры шпильки. В одном из вариантов осуществления первый ITR образует структуру шпильки. В другом варианте осуществления второй ITR образует структуру шпильки. В другом варианте осуществления как первый ITR, так и второй ITR образуют структуры шпильки.

В некоторых вариантах осуществления ITR в молекуле нуклеиновой кислоты в настоящем документе описан транскрипционно активированный ITR. Транскрипционно активированный ITR может включать все или часть ITR дикого типа, который был

транскрипционно активирован путем включения, по меньшей мере, одного транскрипционно активного элемента. Различные типы транскрипционно активных элементов подходят для использования в этом контексте. В некоторых вариантах осуществления транскрипционно активный элемент представляет собой конститутивный транскрипционно активный элемент. Конститутивные транскрипционно активные элементы обеспечивают постоянный уровень транскрипции гена, и их можно использовать, когда желательно, чтобы трансген экспрессировался на постоянной основе. В других вариантах осуществления транскрипционно активный элемент представляет собой индуцибельный транскрипционно активный элемент. Индуцибельные транскрипционно активные элементы обычно проявляют низкую активность в отсутствие индуктора (или индуцирующего состояния) и активируются в присутствии индуктора (или переключения в индуцирующее состояние). Индуцибельные транскрипционно активные элементы можно использовать, когда экспрессия желательна только в определенное время или в определенных местах, или когда желательно титровать уровень экспрессии с помощью индуцирующего средства. Транскрипционно активные элементы также могут быть тканеспецифическими, то есть они проявляют активность только в определенных тканях или типах клеток.

Транскрипционно активные элементы можно включать в ITR различными способами. В некоторых вариантах осуществления транскрипционно активный элемент включен 5' по отношению к любой части ITR или 3' по отношению к любой части ITR. В других вариантах осуществления транскрипционно активный элемент транскрипционно активированного ITR находится между двумя последовательностями ITR. Если транскрипционно активный элемент содержит два или более элементов, которые должны быть отделены друг от друга, эти элементы могут чередоваться с частями ITR. В некоторых вариантах осуществления шпилька в структуре ITR удалена и заменена инвертированными повторами транскрипционного элемента. Это последнее расположение создаст шпильку, имитирующую удаленную часть в структуре. Множественные tandemные транскрипционно активные элементы также могут присутствовать в транскрипционно активированных ITR, и они могут располагаться рядом или на расстоянии друг от друга. Кроме того, в транскрипционно активные элементы транскрипционно активированных ITR могут быть введены участки связывания белков (например, участки связывания Rep). Транскрипционно активный элемент может содержать любую последовательность, обеспечивающую контролируемую транскрипцию ДНК с помощью РНК-полимеразы с образованием РНК, и может содержать, например, транскрипционно активный элемент, как определено ниже.

Транскрипционно активированные ITR обеспечивают как транскрипционную активацию, так и функции ITR для молекулы нуклеиновой кислоты в относительно ограниченной по длине нуклеотидной последовательности, которая эффективно максимизирует длину трангена, который может переносить и экспрессировать молекула нуклеиновой кислоты. Включение транскрипционно активного элемента в ITR можно проводить различными способами. Сравнение последовательности ITR и требований к последовательности транскрипционно активного элемента может дать представление о способах кодирования элемента в ITR. Например, транскрипционная активность может быть добавлена к ITR путем внесения специфических изменений в последовательность ITR, которая реплицирует функциональные элементы транскрипционно активного элемента. В данной области существует множество способов для эффективного добавления, удаления и/или изменения определенных нуклеотидных последовательностей в конкретных сайтах (см., например, Deng W.P. и Nickoloff J.A., Anal. Biochem. 200:81-88 (1992)). Другой способ создания транскрипционно активированных ITR предусматривает введение участка рестрикции в нужном месте ITR. Кроме того, несколько транскрипционно активированных элементов могут быть включены в транскрипционно активированные ITR известными в данной области способами.

В качестве иллюстрации, транскрипционно активированные ITR можно получать путем включения одного или нескольких транскрипционно активных элементов, таких как TATA-бокс, блок GC, блок CCAAT, сайт Sp1, область Inr, сайт CRE (цАМФ-регуляторный элемент), сайт ATF-1/CRE, блок APB β , блок APB α , блок CArG, блок CCAC или любой другой элемент, участвующий в транскрипции, как известно в данной области.

Ген, представляющий интерес, и другие последовательности

Определенные аспекты по настоящему раскрытию относятся к способам введения индивидууму терапии AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит ген, представляющий интерес (ГПИ). В некоторых вариантах осуществления ГПИ представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, как описано в настоящем документе, которая кодирует полипептид миниатюризированного дистрофина, как описано в настоящем документе.

Экспрессируемый ГПИ может быть либо сегментом ДНК, кодирующим белок, с любыми необходимыми элементами управления (например, промоторы, операторы), желаемыми пользователем, либо не кодирующим сегментом ДНК, транскрипция которого производит всю или часть некоторой РНК-содержащей молекулы, такой как рибозим или антисмысловая молекула.

В некоторых вариантах осуществления AAV содержит более чем один ГПИ. В

AAV с более чем одним ГПИ некоторые варианты осуществления содержат элементы, такие как IRES или 2A, для их совместной экспрессии с одного промотора. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два гена, представляющих интерес, разделенных элементом IRES. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит два гена, представляющих интерес, разделенных элементом 2A. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три гена, представляющих интерес, разделенных элементом IRES между генами, представляющими интерес (например, ГПИ-IRES-ГПИ-IRES-ГПИ). В некоторых вариантах осуществления AAV содержит три гена, представляющих интерес, разделенных элементом 2A между генами, представляющими интерес.

В некоторых вариантах осуществления AAV содержит регуляторную последовательность. В некоторых вариантах осуществления AAV содержит не кодирующую регуляторную ДНК. В некоторых вариантах осуществления геном AAV содержит регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антител в клетке-хозяине. Термин «регуляторная последовательность» предназначен для включения промоторов, энхансеров и других элементов контроля экспрессии (например, сигналов полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в данной области понятно, что разработка AAV, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка и т.д. В некоторых вариантах осуществления геном AAV содержит сайты донора сплайсинга/акцептора сплайсинга мРНК. Определенные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего содержат элементы вируса, которые определяют высокий уровень экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовируса (например, основного позднего промотора аденовируса (AdMLP)) и полиомы. Альтернативно, можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убиквитина или промотор β -глобина. Кроме того, регуляторные элементы состоят из последовательностей из разных источников, такие как промоторная система SRa, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинного концевой повтора вируса лейкоза Т-клеток человека типа 1 (Takebe, Y. et al., Mol. Cell. Biol. 8:466-472 (1988)). В определенных вариантах осуществления регуляторная последовательность содержит

тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор управляет экспрессией гена, представляющего интерес, в ткани, выбранной из группы, состоящей из сердца, печени, легких, глаз, нервной системы, лимфатической системы, мышц и стволовых клеток.

Составы AAV

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV формулируют со средством для доставки. В некоторых вариантах осуществления средство для доставки содержит липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления средство для доставки выбрано из группы, состоящей из липосомы, нелипидной полимерной молекул, эндосом и любого их сочетания.

Не-AAV векторы

Также в настоящем документе предлагается вектор, который содержит вышеописанные полинуклеотиды, функционально связанные с промотором. Нуклеотидная последовательность является «функционально связанной» с последовательностью для контроля экспрессии (например, промотором), когда последовательность для контроля экспрессии контролирует и регулирует транскрипцию и трансляцию этой последовательности. Термин «функционально связанная» применительно к нуклеотидной последовательности включает в себя наличие соответствующего стартового сигнала (например, ATG) перед нуклеотидной последовательностью для экспрессии и поддержания правильной рамки считывания, чтобы разрешить экспрессию последовательностей под контролем последовательности для контроля экспрессии и получения желаемого продукта, кодируемого последовательностью. Если ген, который желательно вставить в рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, не содержит соответствующего стартового сигнала, такой стартовый сигнал можно вставить перед геном. «Вектор» представляет собой репликон, такой как плазида, фаг или космида, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы получить репликацию прикрепленного сегмента. Промотором может быть бактериальный, дрожжевой промотор, промотором насекомых или промотором млекопитающих или идентичен указанным.

В некоторых вариантах осуществления вектор может быть плазмидой, космидой, искусственной дрожжевой хромосомой (YAC), бактериофагом или эукариотической вирусной ДНК. Можно использовать другие многочисленные векторные основы, известные в данной области, подходящие для экспрессии белка. Такие векторы в качестве неограничивающих примеров включают:

аденовирусный вектор, ретровирусный вектор, поксвирусный вектор, бакуловирусный вектор, герпесвирусный вектор, обезьяний вирус 40 (SV40), цитомегаловирус (ЦМВ), вирус опухоли молочной железы (MMTV) и вирус лейкоза мышей Молони. Кроме того, один класс векторов содержит ДНК-элементы, полученные из вирусов, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, бакуловирус, ретровирусы или лесной вирус Семлики. Такие векторы можно получать на коммерческой основе или собрать из последовательностей, описанных способами, хорошо известными в данной области.

В некоторых вариантах осуществления вектор, описываемый в настоящем документе, формулируют со средством доставки. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления средство доставки выбрано из группы, состоящей из липосом, нелипидных полимерных молекул, эндосом и любого их сочетания.

Фармацевтические композиции

Различные полипептиды и полинуклеотиды, описываемые в настоящем документе (также называемые в настоящем документе «активными соединениями»), могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, содержат полипептиды, или полинуклеотиды, и фармацевтически приемлемый носитель. Как применяют в настоящем документе, формулировка «фармацевтически приемлемый носитель» предназначена для включения любых и всех растворителей, диспергирующих сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических средств и замедлителей всасывания и т.п., совместимых с введением фармацевтических препаратов. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных соединений хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любой общепринятый носитель или средство несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

В некоторых вариантах осуществления раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая (а) полипептид, как описано в настоящем документе, и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая (а) композицию, содержащую полипептид, как описано в настоящем документе, и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая (а) полинуклеотид, как описано в настоящем документе, и (b)

фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая (а) вектор (например, rAAV), как описано в настоящем документе, и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая (а) клетку-хозяина, как описано в настоящем документе, и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент.

Фармацевтическую композицию по раскрытию формулируют так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральный, например, внутривенный, интрадермальный, подкожный, пероральный, трансдермальный (местный) и трансмукозальный, и любое их сочетание. Другой путь введения включает легочное введение. Кроме того, может быть желательным вводить терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции местно в область, нуждающуюся в лечении. Это может быть достигнуто, например, местной или регионарной инфузией или перфузией во время операции, местным применением, инъекцией, катетером, суппозиторием или имплантатом (например, имплантаты, сформированные из пористых, непористых или желатиновых материалов, включая мембраны, такие как синаластовые мембраны или волокна), и т.п. В другом варианте осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции доставляют в везикулах, таких как липосомы (см., например, Langer, *Science* 249:1527-33, 1990 and Treat *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez Berestein and Fidler (eds.), Liss, N.Y., pp. 353-65, 1989).

В еще одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В качестве одного из примеров можно использовать помпу (см., например, Langer, *Science* 249:1527-33, 1990; Sefton, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-40, 1987; Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507-16, 1980; Saudek *et al.*, *N Engl. J Med.* 321:574-79, 1989). В другом примере можно использовать полимерные материалы (см., например, Levy *et al.*, *Science* 228:190-92, 1985; During *et al.*, *Ann. Neural.* 25:351-56, 1989; Howard *et al.*, *J Neurosurg.* 71:105-12, 1989). Также можно использовать другие системы с контролируемым высвобождением, такие как описанные у Langer (*Science* 249:1527-33, 1990).

Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, такие как на основе фосфатной, цитратной и других органических кислот; антиоксиданты, включая

аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензилхлорид аммония; гексаметоний хлорид; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; парабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахар, такой как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; сольобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы соединений с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные средства, такие как TWEEN™, ПЛЮРОНИКИ™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, противомикробные средства, средства придания изотоничности, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие средства, эмульгаторы, секвестрирующие или хелатирующие средства и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных носителей включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотоническую декстрозу для инъекций, стерильную воду для инъекций, раствор Рингера для инъекций с декстрозой и лактатом. К неводным парентеральным носителям относятся жирные масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Противомикробные средства в бактериостатической или фунгистатической концентрациях можно добавлять в парентеральные препараты, упакованные в многодозовые контейнеры, и они включают в себя фенолы или крезолы, ртутные соединения, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловые и пропиловые сложные эфиры п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. К средствам придания изотоничности относятся хлорид натрия и декстроза. Буферы включают фосфаты и цитраты. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаина гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие средства включают натрийкарбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают Полисорбат 80 (TWEEN® 80). Секвеструющее или хелатирующее средство ионов металлов включает ЭДТА. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой носителей; и

гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH.

Растворы или суспензии, используемые для парентерального, интрадермального или подкожного применения, могут содержать следующие компоненты: растворитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирное масло, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы, многодозовые флаконы из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELS (BASF; Parsippany, NJ), или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой в тех случаях, когда существует возможность легкого введения шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или диспергирующая среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, а также за счет использования поверхностно-активных веществ. Защита от действия микроорганизмов может быть достигнута различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию средства придания изотоничности, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Длительное всасывание композиций для инъекций может быть обеспечено, например, включением в композицию средства, замедляющего всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций можно получать путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную диспергирующую среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций, способы получения могут быть вакуумной сушкой и сублимационной сушкой, что дает порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желаемого ингредиента из их предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Для введения путем ингаляции соединения доставляют в форме аэрозольного спрея из герметичного контейнера или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или распылителя. Системное введение также можно производить трансмукозальными или трансдермальными способами.

Для трансмукозального или трансдермального введения в составе используют пенетранты, подходящие для барьера, который нужно пересечь. Такие пенетранты обычно известны в данной области и включают, например, для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидиевой кислоты. Трансмукзальное введение можно проводить с помощью назальных спреев или суппозитория. Для трансдермального введения активные соединения формулируют в мази, бальзамы, гели или кремы, как в общем известно в данной области. Соединения также можно получать в форме суппозитория (например, с общепринятыми основами для суппозитория, такими как масло какао и другие глицериды) или ретенционной клизмы для ректальной доставки.

В одном из вариантов осуществления получают активные соединения с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, такие как состав с длительным высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов очевидны специалистам в данной области. Материалы также могут быть получены на коммерческой основе от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также можно использовать липосомальные суспензии. Их можно получать способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

Особенно предпочтительно формулировать пероральные или парентеральные

композиции в стандартной лекарственной форме для простоты введения и единообразия дозировки. Стандартная лекарственная форма, как применяют в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных доз для индивидуумов, подлежащих лечению, при этом каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Описания для стандартных лекарственных форм по раскрытию диктуются и напрямую зависят от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, а также от ограничений, присущих данной области, для составления такого функционального соединения для лечения индивидуумов. Фармацевтическая композиция может быть помещена в контейнер, упаковку, дозатор вместе с инструкциями для введения.

Применение и способы

Способы получения миниатюризированных дистрофинов

В настоящем документе также описаны способы получения полипептида миниатюризированного дистрофина, предусматривающие культивирование клетки-хозяина, описываемой в настоящем документе, в подходящих условиях и выделение полипептида миниатюризированного дистрофина.

Как применяют в настоящем документе, «выделенный» полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты представляет собой тот, который отделен от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике (например, в мыши или человеке) молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, «выделенные» молекулы нуклеиновой кислоты, такие как молекулы кДНК, могут быть по существу свободны от другого клеточного материала, или среды для культивирования при получении рекомбинантным способом, или по существу свободны от химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Например, выражение «по существу свободный от» включает препараты полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие менее чем приблизительно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее чем приблизительно 10%) другого материала, например, клеточного материала, среды для культивирования, других молекул нуклеиновой кислоты, химических предшественников и/или других химических веществ. В конкретном варианте осуществления молекула/молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, в настоящем документе описана как выделенная или очищенная.

Полинуклеотиды и нуклеотидную последовательность определенных

полинуклеотидов можно получать любым известным в данной области способом. Нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, описываемые в настоящем документе, например, полипептиды, описанные в таблицах 3 и 4, и модифицированные версии этих полипептидов, можно определять, используя способы, хорошо известные в данной области, т.е., нуклеотидные кодоны, которые, как известно, кодируют определенные аминокислоты. собранные таким образом, чтобы получилась нуклеиновая кислота, кодирующая полипептиды. Такой полинуклеотид, кодирующий полипептид, можно собирать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier G. et al., (1994), *BioTechniques* 17: 242-6), что, в кратком изложении, предусматривает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей полипептид, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификации лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

Альтернативно, полинуклеотид, кодирующий полипептид, описываемый в настоящем документе, можно получать из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием способов, хорошо известных в данной области (например, ПЦР и других способов молекулярного клонирования). Например, амплификацию ПЦР с использованием синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами известной последовательности, можно проводить с использованием геномной ДНК, полученной из гибридомной клетки, продуцирующей интересующий полипептид. Такие способы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую кодирования, например, IL2, линкерную последовательность или IL2-R α . Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения полипептидов.

Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретный полипептид, недоступен, но известна последовательность молекулы полипептида, нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, может быть химически синтезирована или получена из подходящего источника (например, библиотека кДНК или библиотека кДНК, полученная из нуклеиновой кислоты, предпочтительно полиА⁺ РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих интересующие белки, таких как гибридомные клетки, выбранные для экспрессии полипептида, описанного в настоящем документе) путем амплификации ПЦР с использованием синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами последовательности или путем клонирования с

использованием олигонуклеотидного зонда, специфичного для конкретной генетической последовательности для идентификации, например, клонирование кДНК из библиотеки кДНК, кодирующей полипептиды. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные путем ПЦР, затем можно клонировать в реплицируемые клонирующие векторы, используя любой способ, хорошо известный в данной области.

ДНК, кодирующие полипептиды, описываемые в настоящем документе, могут быть легко выделены и секвенированы с использованием общепринятых способов (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, которые специфически связываются с генами, кодирующими полипептиды, описываемые в настоящем документе). Источником такой ДНК может служить гибридомные клетки. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессирующие векторы, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомяка (CHO) (например, клетки CHO из CHO GS SYSTEM™ (Lonza)) или миеломные клетки, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, для получения синтеза полипептидов в рекомбинантных клетках-хозяевах.

Терапевтические применения и способы

Миниатюризированные полипептиды дистрофина, полинуклеотиды, кодирующие миниатюризированные полипептиды дистрофина, векторы (например, rAAV), содержащие полинуклеотиды, кодирующие миниатюризированные полипептиды дистрофина, и способы, описываемые в настоящем документе, имеют множество полезных свойств *in vitro* и *in vivo*. Например, нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид миниатюризированного дистрофина, например, вектор, например, вектор AAV, или полипептиды, описываемые в настоящем документе, можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или индивидуумам-людям, например, *in vivo*, для лечения заболеваний.

Таким образом, в настоящем документе описаны терапевтические способы с использованием любой из молекул нуклеиновой кислоты миниатюризированного дистрофина, как описано в настоящем документе, полипептидов, как описано в настоящем документе, клеток-хозяев, как описано в настоящем документе, векторов, как описано в настоящем документе, или фармацевтических композиций как описано в настоящем документе, или любого их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описан способ экспрессии полипептида миниатюризированного дистрофина у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающий введение индивидууму нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, вектора, как описано в настоящем документе, клетки-

хозяина, как описано в настоящем документе, или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описан способ лечения индивидуума с заболеванием или состоянием, предусматривающий введение индивидууму нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, вектора, как описано в настоящем документе, клетки-хозяина, как описано в настоящем документе, или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание обусловлено дефицитом дистрофина. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой миодистрофию Дюшенна (МДД), миодистрофию Беккера (МБД), X-сцепленную дилатационную кардиомиопатию (XLDC), плечелопаточно-лицевую миодистрофию, миотоническую миодистрофию, поясно-конечностную миодистрофию, окулофарингеальную миодистрофию, миодистрофию Эмери-Дрейфуса, дистальную миодистрофию и/или врожденную миодистрофию. В других вариантах осуществления заболевание для лечения представляет собой саркопению, заболевание сердца, кахексию.

В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, полипептид, как описано в настоящем документе, вектор (например, rAAV), как описано в настоящем документе, клетку-хозяина, как описано в настоящем документе, или фармацевтическую композицию, как описано в настоящем документе, вводят внутривенно, трансдермально, интрадермально, подкожно, перорально или легочно, или любым их сочетанием. В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, полипептид, как описано в настоящем документе, вектор (например, rAAV), как описано в настоящем документе, клетку-хозяина, как описано в настоящем документе, или фармацевтическую композицию, как описано в настоящем документе, вводят местным, эпидермальным, мукозальным, интраназальным, пероральным, вагинальным, ректальным, сублингвальным, местным, внутривенным, интраперитонеальным, внутримышечным, внутриартериальным, интратекальным, внутрилимфатическим, внутриочаговым, внутрикапсулярным, внутриглазным, внутрисердечным, интрадермальным, транстрахеальным, подкожным, субкутикулярным, внутрисуставным, субкапсулярным, субарахноидальным, интраспинальным, эпидуральным или интрастернальным путем. В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, вектор (например, rAAV), клетку-хозяина, как описано в настоящем документе, или полипептид вводят внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения дополнительно

предусматривает введение индивидууму второго средства.

Как применяют в настоящем документе, термин «индивидуум» включает любого человека или не являющегося человеком животное. Например, способы и композиции, описываемые в настоящем документе, можно использовать для индивидуума, страдающего раком. Термин «не являющееся человеком животное» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не-млекопитающих, таких как не являющиеся человеком приматы, овца, собака, корова, курицы, амфибии, пресмыкающиеся, и т.д. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

В некоторых вариантах осуществления введение индивидууму молекулы нуклеиновой кислоты, вектора (например, гAAV), полипептида, клетки-хозяина или фармацевтической композиции приводит к повышенной экспрессии белка дистрофина относительно экспрессии белка дистрофина у индивидуума до введения, где экспрессия белка дистрофина повышается, по меньшей мере, приблизительно в 2 раза, по меньшей мере, приблизительно в 3 раза, по меньшей мере, приблизительно в 4 раза, по меньшей мере, приблизительно в 5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 6 раз, по меньшей мере, приблизительно в 7 раз, по меньшей мере, приблизительно в 8 раз, по меньшей мере, приблизительно в 9 раз, по меньшей мере, приблизительно в 10 раз, по меньшей мере, приблизительно в 11 раз, по меньшей мере, приблизительно в 12 раз, по меньшей мере, приблизительно в 13 раз, по меньшей мере, приблизительно в 14 раз, по меньшей мере, приблизительно в 15 раз, по меньшей мере, приблизительно в 20 раз, по меньшей мере, приблизительно в 25 раз, по меньшей мере, приблизительно в 30 раз, по меньшей мере, приблизительно в 35 раз, по меньшей мере, приблизительно в 40 раз, по меньшей мере, приблизительно в 50 раз, по меньшей мере, приблизительно в 60 раз, по меньшей мере, приблизительно в 70 раз, по меньшей мере, приблизительно в 80 раз, по меньшей мере, приблизительно в 90 раз или, по меньшей мере, приблизительно в 100 раз.

В определенных аспектах раскрытия способ предусматривает или дополнительно предусматривает введение индивидууму терапии AAV. В некоторых вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение рекомбинантного AAV. Любой рекомбинантный AAV, известный в данной области и/или описываемый в настоящем документе можно использовать в способах по настоящему раскрытию. В некоторых вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV типа 1, AAV типа 2, AAV типа 3 (включая типы 3A и 3B), AAV типа 4, AAV типа 5, AAV типа 6, AAV типа 7, AAV типа 8, AAV типа 9, AAV типа 10, AAV типа 11, AAV типа 12, AAV типа 13, AAV змей, AAV птиц, AAV быков, AAV собак, AAV лошадей, AAV овец, AAV коз, AAV креветок, и любого их сочетания. В

определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 1. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 2. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 3. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 4. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 5. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 6. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 7. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 8. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 9. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 10. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 10. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 11. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 12. В определенных вариантах осуществления терапия AAV предусматривает введение AAV типа 13.

В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума с помощью молекул нуклеиновой кислоты миниатюризированного дистрофина, как описано в настоящем документе, полипептидов, как описано в настоящем документе, клеток-хозяев, как описано в настоящем документе, векторов, как описано в настоящем документе, или фармацевтических композиций, как описано в настоящем документе, или любого их сочетания, не вызывает выраженных воспалительных реакций, например, иммуноопосредованного пневмонита, иммуноопосредованного колита, иммуноопосредованного гепатита, иммуноопосредованного нефрита или почечной дисфункции, иммуноопосредованного гипопфизита, иммуноопосредованного гипотиреоза и гипертиреоза или других иммуноопосредованных побочных реакций. В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума с помощью молекул нуклеиновой кислоты миниатюризированного дистрофина, как описано в настоящем документе, полипептидов, как описано в настоящем документе, клеток-хозяев, как описано в настоящем документе, векторов, как описано в настоящем документе, или фармацевтических композиций, как описано в настоящем документе, или любого их сочетания не вызывает значительных сердечных нарушений, например, желудочковой аритмии; нарушений зрения, например, иридоциклита; инфузионных реакций; повышенной амилазы, повышенной липазы; нарушений нервной системы, например,

головокружения, периферической и сенсорной нейропатии; кожных нарушений и нарушений подкожных тканей, например, сыпи, зуда, эксфолиативного дерматита, полиморфной эритемы, витилиго или псориаза; дыхательных, торакальных и медиастинальных нарушений, например, кашля; усталости; тошноты; снижения аппетита; запора; артралгии; или диареи.

Наборы

Также в настоящем документе описаны наборы, содержащие одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, описываемых в настоящем документе, один или несколько векторов (например, гAAV), как описано в настоящем документе, один или несколько полипептидов, как описано в настоящем документе, или одну или несколько клеток-хозяев, как описано в настоящем документе, или любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления набор также содержит инструкции по введению любого из вышеперечисленных или их сочетания, нуждающемуся в этом индивидууму.

Термины «набор» и «система», как применяют в настоящем документе, обозначают, по меньшей мере, одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, описываемых в настоящем документе, один или несколько векторов (например, гAAV), как описано в настоящем документе, один или несколько полипептидов, как описано в настоящем документе, или одну или несколько клеток-хозяев, как описано в настоящем документе, или любое их сочетание, которые в конкретных вариантах осуществления находятся в комбинации с одним или несколькими другими типами элементов или компонентов (например, другими типами биохимических реагентов, контейнерами, пакетами, такими как упаковка, предназначенная для коммерческой продажи, инструкциями по применению и т.п.).

В некоторых вариантах осуществления раскрыт набор, содержащий (а) один или несколько миниатюризированных полипептидов дистрофина, как описано в настоящем документе, состав, содержащий полипептид миниатюризированного дистрофина, как описано в настоящем документе, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид миниатюризированного дистрофина, как описано в настоящем документе, вектор (например, гAAV) и/или клетку-хозяина; и (b) и инструкции для введения любого из вышеперечисленных нуждающемуся в этом индивидууму. В некоторых вариантах осуществления раскрыт набор, содержащий (а) полипептид миниатюризированного дистрофина, как описано в настоящем документе, и (b) и инструкции по введению полипептида миниатюризированного дистрофина нуждающемуся в этом индивидууму. В некоторых вариантах осуществления раскрыт набор, содержащий (а) композицию, содержащую полипептид миниатюризированного дистрофина, как описано в настоящем

документе, и (b) и инструкции для введения композиции нуждающемуся в этом индивидууму. В некоторых вариантах осуществления раскрыт набор, содержащий (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид миниатюризированного дистрофина, как описано в настоящем документе и (b) и инструкции для введения нуклеиновой кислоты нуждающемуся в этом индивидууму. В некоторых вариантах осуществления раскрыт набор, содержащий (a) вектор, как описано в настоящем документе, и (b) и инструкции для введения вектора нуждающемуся в этом индивидууму. В некоторых вариантах осуществления раскрыт набор, содержащий (a) вектор AAV, как описано в настоящем документе и (b) и инструкции для введения вектора нуждающемуся в этом индивидууму. В некоторых вариантах осуществления раскрыт набор, содержащий (a) клетку-хозяина, как описано в настоящем документе, и (b) и инструкции для введения клетки-хозяина нуждающемуся в этом индивидууму.

В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предлагается фармацевтическая упаковка или набор, содержащие один или несколько контейнеров, наполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций, описываемых в настоящем документе, такими как один или несколько миниатюризированных пептидов дистрофина, предлагаемых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат фармацевтическую композицию, описываемую в настоящем документе, и любое профилактическое или терапевтическое средство, такое как описываемые в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления наборы могут содержать митоген Т-клеток, например, фитогемагглютинин (ФГА) и/или форболмиристатацетат (ФМА), или антитело, стимулирующее комплекс TCR, такое как антитело к CD3 и антитело к CD28. Необязательно с таким контейнером/контейнерами может быть связано уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических или биологических продуктов, которое отражает одобрение органа по производству, использованию или продаже для введения человеку.

В настоящем документе также предлагаются наборы, которые можно использовать в вышеуказанных способах. В одном из вариантов осуществления набор содержит полипептид миниатюризированного дистрофина, описываемый в настоящем документе, предпочтительно, очищенный полипептид миниатюризированного дистрофина, в одном или нескольких контейнерах. В конкретном варианте осуществления наборы, описываемые в настоящем документе, содержат по существу выделенный полипептид миниатюризированного дистрофина в качестве контроля. В другом конкретном варианте осуществления наборы, описываемые в настоящем документе, дополнительно содержат

контрольный белок, который не реагирует с антигеном полипептида миниатюризированного дистрофина. В другом конкретном варианте осуществления наборы, описываемые в настоящем документе, содержат один или несколько элементов для обнаружения связывания полипептида миниатюризированного дистрофина с антигеном дистрофина (например, полипептид миниатюризированного дистрофина может быть конъюгирован с поддающимся обнаружению субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение или второе антитело, которое распознает первое антитело, которое может быть конъюгировано с поддающимся обнаружению субстратом). В конкретных вариантах осуществления набор, предлагаемый в настоящем документе, может содержать рекомбинантно полученный или химически синтезированный полипептид миниатюризированного дистрофина. Антиген для полипептида миниатюризированного дистрофина, описываемого в настоящем документе, как предлагается в наборе, также может быть присоединен к твердой подложке. В более конкретном варианте осуществления средства детекции в вышеописанном наборе включают твердую подложку, к которой присоединен антиген полипептида миниатюризированного дистрофина. Такой набор может также содержать неприкрепленное меченое репортерной молекулой антитело к белку человека или антитело к белку мыши/крысы. В этом варианте осуществления связывание полипептида миниатюризированного дистрофина с антигеном можно детектировать путем связывания указанного антитела, меченого репортером.

В практическом осуществлении по настоящему раскрытию будут применяться, если не указано иное, общепринятые способы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области. Такие способы полностью описаны в литературе. См., например, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* U.S. Pat. No. 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In*

Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooks, Antisense drug Technology: Principles, strategies and applications, 2nd Ed. CRC Press (2007) and in Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md).

Все приведенные выше ссылки, а также все цитируемые в настоящем документе ссылки и аминокислотные или нуклеотидные последовательности (например, номера GenBank и/или номера Uniprot), полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Следующие примеры предложены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Примеры

Пример 1: Разработка новых миниатюризированных дистрофинов

Мутации в гене дистрофина часто приводят к нарушению стабильности соответствующего белка дистрофина, что в свою очередь приводит к протеосомной деградации нестабильного белка дистрофина и дистрофической патофизиологии. Точно так же миниатюризация ДНК, кодирующей дистрофин, для приспособления к ограниченной упаковочной способности AAV может ухудшить стабильность соответствующего миниатюризированного белка дистрофина. Для дальнейших испытаний были разработаны новые миниатюризированные дистрофины с новыми соединениями, как показано на фиг. 2.

Пример 2: Оценка стабильности миниатюризированных белков дистрофина, экспрессированных в клетках тканевой культуры

Стабильность различных миниатюризированных белков дистрофинов, показанных, на фиг. 2 исследовали, сравнивая присутствие миниатюризированного белка дистрофина в клетках, трансфицированных с соответствующими экспрессирующими векторами с миниатюризированным дистрофином. Для этих исследований белковой стабильности использовали индуцированные кардиомиоциты (ИКМ), полученные из изогенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) мужчины, которые несут преждевременный стоп-кодон E2035X в гене дистрофина, предотвращающий экспрессию эндогенного дистрофина (Fujifilm Cellular Dynamics, Inc., Madison, WI). Эти клетки трансфицировали различными плазмидами, экспрессирующими миниатюризированные белки дистрофина, и присутствие миниатюризированного белка дистрофина исследовали после культивирования трансфицированных клеток *in vitro* в течение 24 суток с помощью анализа ИФА Meso Scale Discovery (MSD) (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD).

Тестируемые миниатюризированные дистрофины и результаты вышеуказанного анализа показаны на фиг. 2 и фиг. 3, соответственно. Данные показали, что миниатюризированный пептид дистрофина BXA-212372-J4V13 (SEQ ID NO: 83) обеспечивает наилучшую экспрессию белка среди протестированных экспрессирующих векторов и пептидов миниатюризированного дистрофина.

Пример 3: Оценка иммуногенности новых соединений в миниатюризированных белках дистрофина.

Иммуногенность каждого из пептидов, перечисленных в таблице 5 (SEQ ID NO: от 68 до 72), представляющих собой новые соединения J4, созданные при разработке миниатюризированных дистрофинов, тестируемых на стабильность белка (см. фиг. 3 и пример 2), исследовали с использованием инструмента прогнозирования иммуногенности *in silico*. Определили, что новые соединения конструкций BXA-212372-J4V11 и, в частности, BXA-212372-J4V12 и BXA-212372-J4V13 (SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 69, и SEQ ID NO: 68, соответственно) имеют минимальный иммуногенный риск на основании вышеупомянутого подхода *in silico* (см. фиг. 4А и 4В).

Иммуногенный потенциал пептидов с вышеупомянутым соединением (см. таблицу 5) затем тестировали с помощью анализа пролиферации Т-клеток *in vitro*, как описано ниже. В кратком изложении, образцы мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) выделяли у здоровых людей-добровольцев с помощью градиентного центрифугирования в Фиколл (GE Healthcare Chicago, IL) и характеризовали по экспрессии человеческого лимфоцитарного антигена (HLA) класса I и II с использованием комбинации амплификации путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации с олигонуклеотидными зондами (ProImmune, Sarasota, FL).

Для дальнейшего анализа использовали панель образцов МКПК, полученных от 40 доноров и имеющих профиль экспрессии HLA, близкий к частоте мировой популяции. Образцы МКПК строения были помечены CFSE (Invitrogen, Carlsbad, CA) для наблюдения за пролиферацией и высеваны в 96-луночные планшеты в шести повторах по 200000 клеток на лунку в RPMI (Lonza, Basel, Switzerland), содержащей 10% человеческую сыворотку АВ (Bioreclamation, Westbury, NY), заменимые аминокислоты и пенициллин/стрептомицин (оба Gibco/Fisher Scientific). Пептиды с соединением BXA-212372, перечисленные в таблице 5, и контрольные пептиды культивировали с панелью из 40 образцов МКПК в концентрации 1 мкМ в течение 7 суток, после чего отмывали от среды и клетки метили моноклональным антителом APC к CD4 и к CD8 (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ). После удаления несвязавшихся антител путем отмывания клетки фиксировали 3,7% формалином (Sigma, St. Louis, MO) в PBS и анализировали способом

проточной цитометрии для определения процентного содержания пролиферирующих CD4⁺-клеток или CD8⁺-клеток. На фиг. 5A (CD4⁺) и фиг. 5B (CD8⁺) показано процентное содержание образцов (среди 40 образцов доноров), которые показали положительный ответ через семь суток в культуре с различными пептидами с соединением BXA-212372, определяемый как значительное увеличение количества пролиферирующих CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток по сравнению с МКПК, инкубированными в носителе без пептидов с соединением или с контрольными пептидами. Используемые контрольные пептиды представляли собой: (1) каркасный пептид авастина; (2) пептид IL-21R; и (3) пул пептидов CEFX. Выявлено, что пептид с соединением конструкции BXA-212372-J4V13 (см. фиг. 2 и таблицу 5) оказался одним из лучших в отношении иммуногенного риска (см. фиг. 4 и фиг. 5).

Пример 4: Оптимизация кодонов

Нуклеотидную последовательность, кодирующую конструкцию миниатюризованного дистрофина BXA-212372-J4V13 (SEQ ID NO: 101) затем оптимизировали по кодонам для оптимизации экспрессии белка, в результате чего была получена конструкция BXA-220931 (SEQ ID NO: 100) (см. таблицу 9 и фиг. 6).

Пример 5: Скрининг промотора/интрона для экспрессии миниатюризованного дистрофина

Ряд промоторов и интронов оценивали на их пригодность для управления экспрессией миниатюризованного дистрофина. С этой целью промоторы и интроны клонировали в GFP-репортерную плазмиду, экспрессию которой затем оценивали путем трансфекции ИКМ человека (см. пример 2). Результаты показали, что промотор C5-12T (см. фиг. 7A) (US 2004/0175727) и интрон SV40 (см. фиг. 7B) превосходили другие протестированные конструкции в управлении экспрессией белка GFP. Таким образом, оба элемента были включены в использованные экспрессирующие конструкции для миниатюризованного дистрофина, как описано ниже.

Пример 6: Экспрессия конструкций миниатюризованного дистрофина *in vivo* и восстановление nNOS

Мышам mdx (дефицитным по дистрофину mdx^{scsn}) системно вводили 2×10¹⁴vg/kg вируса AAV9, содержащего экспрессирующую конструкцию для миниатюризованного дистрофина (BXA-212372-J4V4, BXA-212372-J4V11, BXA-212372-J4V12 и BXA-212372-J4V13) посредством ретроорбитальной инъекции в возрасте 2 недель и обследовали либо в возрасте 4 недель, либо в возрасте 12 недель. Экспрессией миниатюризованного дистрофина управлял промотор C5-12(T). Сердце и скелетные мышцы обработанных животных вырезали, замораживали в 2-метилбутане октаноате в жидком N₂. 10 мкм

замороженных срезов подвергали иммуноокрашиванию на дистрофин человека с моноклональным антителом Manex1011B, напрямую конъюгированным с Alex488 (DSHB, Iowa City, IA) (см. фиг. 8), или с поликлональным антителом против nNOS (ThermoFisher, Waltham, MA), выявляемым при помощи вторичного флуоресцентного антитела (см. фиг. 9). WGA, конъюгированный с Alexa-694 использовали в качестве контроля для мечения мышечных клеток. Срезы покрывали средой, содержащей DAPI, для маркировки ядер. Слайды визуализировали с использованием конфокального микроскопа Leica SP8 (Leica Microsystems; см. фиг. 8 и 9). Выявлено, что все протестированные конструкции AAV9 хорошо экспрессировались в исследуемой мышечной ткани, т.е., сердце, диафрагме (Dia), передней большеберцовой мышце (TA) и икроножной мышце (Gast) (фиг. 8A, BXA-212372-J4V4); фиг. 8B, BXA-212372-J4V11; фиг. 8C, BXA-212372-J4V12; и фиг. 8D, BXA-212372-J4V13 (BXA-220931)). Не было выявлено агрегатов белка дистрофина (фиг. 8A-D). На фиг. 9 представлено восстановление nNOS в сарколемме передней большеберцовой мышцы (TA) мышей mdx, обработанных указанными конструкциями AAV9. Необработанные мыши дикого типа служили положительным контролем, а мыши mdx, обработанные неродственной конструкцией миниатюризированного дистрофина, служили отрицательным контролем. Следует указать, что все варианты J4, кроме J4V12, восстанавливали nNOS в сарколемме.

Пример 7: Воздействие миниатюризированного дистрофина на физиологию человеческих ИКМ, полученных из иПСК, *in vitro*

Сообщалось, что ИКМ, полученные из иПСК человека, обладают электрофизиологическими свойствами, близкими к первичным кардиомиоцитам взрослых, и реагируют аналогично на ряд сердечных ингибиторов ионных каналов, а также агонисты и антагонисты адренергических и мускариновых рецепторов. По сравнению с изогенными ИКМ дикого типа, ИКМ DMD, несущие мутацию E2035X (см. выше), имеют меньшую амплитуду Na^+ канала, удлиненный cFPD (интервал QT) и большую вариабельность частоты сердечных сокращений, что определяют с помощью многоэлектродного чипа. Было изучено, может ли экспрессия миниатюризированного дистрофина (например, BXA-220931) в ИКМ DMD (E2035X) смягчать фенотип клеток DMD и улучшать их физиологические признаки. Для измерения влияния экспрессии миниатюризированного дистрофина можно использовать многоэлектродные чипы, анализ сопротивления сокращению и переходы Ca^{2+} . Человеческие ИКМ с DMD (E2035X), полученные из иПСК, приобретали у Fujifilm Cellular Dynamics, Inc. (Madison, WI). Наша собственная работа показала, что совместное культивирование ИКМ, полученных из человеческих иПСК, с фибробластами обеспечивает более стабильный препарат для

электрофизиологических исследований на многоэлектродных чипах (MEA). Желудочковые фибробласты человека приобретали у Lonza (Walkersville, MD).

Способ многоэлектродного чипа (МЭА) позволяет проводить пространственно-временной анализ с высоким содержанием возбудимых клеток или тканей на чипе со встроенными внеклеточными электродами, погруженными в субстрат, на котором можно культивировать клетки или размещать ткани. Внеклеточные потенциалы поля (ПП) регистрируются каждым электродом и соответствуют клеточным потенциалам действия. Оценка морфологии ПП, продолжительности и скорости проведения дает представление об активности ионных каналов при лечении, а также о влиянии на реполяризацию и проводимость.

ИКМ DMD (E2035X), полученные из иПСК человека культивировали с 7% CO₂ на обработанных 0,1% желатином 6-луночных культуральных планшетах в течение 7 дней, затем трипсинизировали и разбавляли сердечными фибробластами взрослого человека в соотношении приблизительно 5:1 (ИКМ:фибробласты). Затем ИКМ DMD (E2035X) и фибробласты совместно культивировали на покрытых ламинином 9-луночных планшетах с многоэлектродным чипом (MEA) (256-9wellMEA300/30iR-ITO-mq; Multichannel Systems GmbH, Reutlingen, Germany). Через 5 суток культивирования клетки образовывали спонтанный сокращающийся монослой над регистрирующими электродами, заложенными в каждую лунку. Спонтанные внеклеточные потенциалы поля (ПП) регистрировали с 28 электродов/лунку (диаметр 30 мкм, расстояние между центрами 300 мкм) при частоте дискретизации 10 кГц с использованием системы USB-MEA256 и программного обеспечения MC Rack (Multichannel Systems GmbH, Reutlingen, Germany). После 20-минутного периода уравнивания во влажной среде при 37°C с постоянной подачей 5% CO₂ и 95% O₂ лунки инфицировали либо AAV8-BXA-220931 (вирус AAV8, содержащий в качестве груза трансен, кодирующий последовательность для BXA-220931 и промотор C5-12(T), интрон SV40 Intron, 3'UTR и полиА, как указано в таблице 10 в настоящем документе) при MOI 1×10^6 в 300 мкл поддерживающей среды в течение 48 часов или оставляли необработанными в качестве отрицательного контроля.

Затем ИКМ DMD (E2035X) оценивали на влияние экспрессии миниатюризированного дистрофина BXA-220931 на электрофизиологические параметры через 5 суток, 7 суток и через 9 суток после заражения. Измеряемыми электрофизиологическими параметрами были продолжительность потенциала поля (ПП), заменитель реполяризации, скорость проводимости потенциала поля и межимпульсные интервалы (PI). Продолжительность потенциала поля была скорректирована с учетом изменений частоты сердечных сокращений (FPDc).

Скорость проведения определяется путем измерения времени активации потенциала поля для каждого электрода, встроенного в лунку МЭА, во время синхронизированного одиночного распространяющегося сокращения. Оцифрованные записи потенциалов поля от каждого электрода были сглажены с использованием полинома сглаживания методом наименьших квадратов с 21 точкой (Savitsky & Golay, Analytical Chemistry, 1964) с окном 2,1 мс. Время активации представляло собой значение для пика отрицательной производной каждой формы волны потенциала поля. Время между двумя самыми ранними и самыми поздними моментами активации являлось временем проводимости для распространения потенциала поля через монослой DMD (E2035X) ИКМ, а расстояние между этими двумя электродами являлось расстоянием проводимости. Время проводимости, деленное на расстояние проводимости каждого распространения, представляло собой скорость проводимости каждого сокращения монослоя DMD (E2035X) ИКМ в лунке МЭА. Данные проанализированы с помощью пользовательского программного обеспечения, написанного в MatLab (Mathworks, Natick, MA). Частоту сердечных сокращений (уд/минута), суррогат частоты сердечных сокращений, рассчитывали с помощью $BR=60000/IPI$, где IPI представляет собой усредненное значение IPI (мс) для 100 вторичных записей в устойчивом состоянии при каждом условии. Все обработки имели по меньшей мере, 7 повторов и исследование повторяли дважды.

Данные показали, что миниатюризированный дистрофин ВХА-220931 значительно улучшил скорость проводимости на ~49% по сравнению с необработанными DMD (E2035X) ИКМ (двухсторонний дисперсионный анализ *** $P<0,001$ с апостериорным тестом Сидака $n=6$) (см. фиг. 10В). Экспрессию миниатюризированного дистрофина в DMD (E2035X) ИКМ подтвердили с помощью ИФА (см. фиг. 10С).

Пример 8: Исследования *in vivo*: анализ экспрессии, биораспределения и способности предотвращать дистрофический фенотип у мышей *mdx^{scsn}* для миниатюризированных дистрофинов

В этих исследованиях использовали две вирусные конструкции миниатюризированного дистрофина. Одна конструкция содержала кодирующую последовательность для ВХА-220931 и промотор C5-12(T), интрон SV40, 3'UTR и полиА, как указано в таблице 10 в настоящем документе. Другая содержала те же некодирующие элементы, но экспрессировала миниатюризированный дистрофин ВХА-212374, который был описан в Banks et. al., (PLOS Genetics, volume 6(5), 2010) и имеет следующую доменную структуру: ABD1/H1/R1/R2/R3/H3/R24/H4/CR). Мышей *mdx^{scsn}*, дефицитных по дистрофину, в возрасте 2 недель лечили ретроорбитальной инъекцией приблизительно

2×10^{14} vg/кг вируса AAV9-BXA-220931 или вируса AAV9-BXA-212374. Леченных и нелеченных мышей умерщвляли через две недели после введения вируса ($n=3$) для изучения уровня экспрессии и биораспределения миниатюризированного дистрофина человека (см. фиг. 11 и 12). Дополнительных мышей ($n=10-12$) умерщвляли в возрасте 12 недель и исследовали экспрессию и биораспределение миниатюризированного дистрофина человека и профилактику дистрофии (см. фиг. с 13 до 20 и этот и последующие примеры 9-13). Контролем служили необработанные мыши дикого типа и мыши с эндогенной экспрессией дистрофина.

Мышечную ткань обработанных и необработанных мышей mdx^{scsn} анализировали на количество присутствующих вирусных геномов, а также экспрессию мРНК и белка дистрофина, как описано более подробно ниже. Полученные данные показали, что достаточное количество вируса вводили дефицитным по дистрофину мышам mdx^{scsn} для достижения уровней экспрессии (мРНК и белка) миниатюризированного дистрофина в поперечнополосатых мышцах у этих животных в возрасте 4 недель и 12 недель, которые были выше, чем соответствующий уровень экспрессии эндогенного дистрофина у животных дикого типа (см. фиг. 11 и фиг. 14, соответственно).

Скелетные мышцы мышей mdx^{scsn} с дефицитом дистрофина, как правило, подвергаются некрозу и регенерации примерно с 3-4 недельного возраста. Регенерированные мышечные волокна, как правило, более изменчивы по размеру и содержат центрально расположенные ядра на замороженных поперечных срезах. Кроме того, фиброз становится более распространенным в регенерированных мышцах. Размер мышечных волокон, долю центрально расположенных ядер и фиброз в нелеченных мышцах mdx и мышцах mdx , обработанных миниатюризированным дистрофином BXA-220931 или BXA-212374 (частично) измеряли гистологическим и иммунофлуоресцентным анализом тканевых срезов, как описано более подробно ниже. Доля мышечных волокон, экспрессирующих миниатюризированные дистрофины, также количественно определяли аналогичным образом, как это описано более подробно ниже. Данные показали, что миниатюризированные дистрофины BXA-220931 и BXA-212374 экспрессировались почти во всех проанализированных миофибриллах/миоцитах мышей mdx^{scsn} , обработанных вирусом, включая сердце, и предотвращали центральную нуклеацию в степени, аналогичной мышцам дикого типа в возрасте 4 недель и 12 недель (см. фиг. 12 и фиг. 15-16, соответственно). Важно отметить, что экспрессия и биораспределение миниатюризированного дистрофина сохранялись более двух месяцев после лечения AAV.

Миниатюризированный дистрофин BXA-220931 также предотвращал дистрофическую патологию, наблюдаемую у нелеченных мышей mdx^{scsn} , как показали

гистологический и иммунофлуоресцентный анализы мышечных тканевых срезов (фиг. 13 и фиг. 15).

Количественный анализ векторных геномов/выделение геномной ДНК и ПЦР - Для выделения геномной ДНК ткани поперечно-полосатой мышцы гомогенизировали с помощью Qiagen TissueLyser (Qiagen, Venlo, Netherlands) и выделяли из гомогенизированной ткани геномную ДНК с использованием набора Qiagen DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands, #69581). Ткань (~10 мг) помещали в 96-луночные планшеты (Costar® 96-Well Assay Block 1 ml, #3958), содержащие 200 мкл протеиназы К-буфера ATL и один стальной шарик размером 5 мм, гомогенизировали с использованием Qiagen TissueLyser при частоте 30 Гц. в течение 2 минут, которые повторяли до тех пор, пока ткань не гомогенизировали. Выделение геномной ДНК производили в соответствии с инструкциями производителя. Для геномной количественной ПЦР каждый образец ДНК анализировали в двух повторах с наборами праймеров/зондов (для дистрофина дикого типа F-5'AAGGCCTGACAGGGCAAAA3', R-5'CAGGGCATGAACCTCTTGTGGAT3', зонд 6FAM-CTGCCAAAAGAAAAAAA-MGBNFQ; для BXA-220931 F-5'CGCGAGGACGTGCAGAA3', R-5'TTGCTGAACTGGGCGTTGA3', зонд 6FAM-AAACCTTCACCAAATGG-MGBNFQ; для BXA-212374 F-5'TGGAAGATTGCTACGAGCGC3', R-5'CAGGTCGCTGAACAGGTTCT3', зонд 6FAM-GCAAGTTCGGCAAGCAGCACA-MGBNFQ) в 384-луночных прозрачных реакционных планшетах (Applied Biosystems, Waltham, MA, #4483285). На каждую реакцию кПЦР добавляли 2 мкл геномной ДНК (80 нг) и 8 мкл мастер-микса (5 мкл Applied Biosystems™ TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher), 0,5 мкл 20-кратной смеси зондов и праймеров FAM и 2,5 мкл воды) и планшеты центрифугировали в течение 1 минуты при 1000 об./мин. Образцы инкубировали при 95°C в течение 2 минут с последующими 40 циклами при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 минуты с использованием системы для ПЦР в реальном времени ViiA™7 и программного обеспечения QuantStudio для анализа данных и количественной оценки векторного генома (Applied Biosystems, Waltham, MA). Количество тотальной геномной ДНК определяли способом абсорбционной спектроскопии.

Выделение мРНК - Для выделения тотальной РНК ткань гомогенизировали с использованием Qiagen TissueLyser (Qiagen, Venlo, Netherlands) и выделяли РНК из гомогенизированной ткани с помощью Qiagen RNeasy 96 Universal Tissue Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands, #74881). Ткань (~15 мг) помещали в микропробирку для сбора из набора RNeasy, содержащую 750 мкл лизирующего реагента QIAzol (Qiagen, Venlo, Netherlands) и один стальной шарик размером 5 мм, гомогенизировали с помощью

Tissuelyzer при 30 Гц в течение 2 минут, которые повторяли до тех пор, пока ткань не гомогенизировали. За этим этапом последовало центрифугирование при 6000×g в течение 1 минуты при 4°C. В каждую пробирку добавляли по 150 мл хлороформа и интенсивно перемешивали на центрифуге «вортекс» в течение 15 с. После трехминутной стадии инкубации при комнатной температуре, образцы центрифугировали при 6000×g в течение 15 минут при 4°C. Водную фазу удаляли (~360 мкл) и переносили в новую пробирку, содержащую 1 объем 70% EtOH без РНКазы. Все образцы переносили на 96-луночные планшеты RNeasy 96, которые затем заклеивали лентой AirPore Qiagen, Venlo, Netherlands) и центрифугировали при 5600×g в течение 4 минут при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл буфера RW1 на лунку и планшеты повторно запечатывали и центрифугировали в течение 4 минут при 5600×g. Во время этой стадии получали исходный раствор ДНКазы путем добавления 550 мкл свободной от РНКазы воды на флакон ДНКазы (Qiagen, Venlo, Netherlands). 670 мкл исходного раствора ДНКазы I разбавляли в 7,3 мл буфера RDD, смешивали и хранили при 4°C. Когда центрифугирование было завершено, фильтрат удаляли и добавляли 80 мкл смеси ДНКазы прямо в центр каждой лунки, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. После инкубации в каждую лунку добавляли 400 мкл RW1, планшет герметизировали и центрифугировали в течение 4 минут при 5600×g. Фильтрат удаляли и добавляли в лунку 800 мкл буфера RPE, а планшет повторно запечатывали и центрифугировали в течение 4 минут при 5600×g. Этот процесс повторяли и планшет центрифугировали в течение 10 минут при 5600×g. Затем каждый образец элюировали в свежую пробирку, добавляя 60 мкл свободной от РНКазы воды в центр каждой лунки и центрифугируя пробирку в течение 4 минут при 5600×g. Для улучшения извлечения элюированные 60 мкл повторно наносили обратно на планшет и центрифугировали в течение 4 минут при 5600×g. Выход РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Количественное определение мРНК путем ddПЦР - Для синтеза кДНК и последующей количественной ПЦР 1 мкг РНК добавляли в одну лунку 96-луночного планшета в 10 мкл H₂O (96-луночные планшеты для ПЦР Axygen™, EMSCO Scientific Enterprises, Inc., Philadelphia, PA). В каждую лунку добавляли 10 мкл мастер-микса (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Waltham, MA) и планшет центрифугировали при 1000 об./мин. Синтез кДНК проводили при 25°C в течение 10 минут, 37°C в течение 120 минут и 85°C в течение 5 минут с последующим хранением при 4°C. Для ddПЦР каждый образец затем запускали в двух повторах со следующими

наборами праймеров/зондов: для дистрофина дикого типа F-5' AAGGCCTGACAGGGCAAAA3', R-5' CAGGGCATGAACTCTTGTGGAT3', зонд 6FAM-CTGCCAAAAGAAAAA-MGBNFQ; для BXA-220931 F-5' CGCGAGGACGTGCAGAA3', R-5' TTGCTGAACTGGGCGTTGA3', зонд 6FAM-AAACCTTCACCAAATGG-MGBNFQ; для BXA-212374 F-5' TGGAAGATTGCTACGAGCGC3', R-5' CAGGTCGCTGAACAGGTTCT3', зонд 6FAM-GCAAGTTCGGCAAGCAGCACA-MGBNFQ. В каждую реакцию добавляли 7,5 мкл кДНК и 17,5 мкл мастер-микса (12,5 мкл ddPCR Supermix (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA), 0,5 мкл 20-кратной смеси праймеров-зондов FAM и 4,5 мкл воды) в полуюбочные 96-луночные планшеты Eppendorf twin.tec® (Eppendorf, Germany, #951022055), которые затем запечатывали и центрифугировали в течение 1 минуты при 1000 об./мин. И обрабатывали для образования капель в картриджах для автоматического генератора капель DG32 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, #1864108). Проводили ПЦР-амплификацию образцов в термоциклере Bio-Rad C1000 Touch (95°C в течение 10 минут, затем 40 циклов при 94°C в течение 30 с/60°C 1 минута; 98°C 10 минут) и немедленно анализировали на флуоресценцию в BioRad Droplet Reader и определяли уровни мРНК в тканях целевых поперечно-полосатых мышц. мРНК дистрофина количественно определяли по количеству копий относительно к тотальной РНК (мкг, количественно определено с помощью абсорбционной спектроскопии).

Определение экспрессии белка с помощью MSD-ИФА - экспрессию белка миниатюризованного дистрофина в целевых поперечно-полосатых мышцах определяли с помощью анализа ИФА (Среднемасштабный производительный-Твердофазный иммуноферментный анализ, Model 1201 MESOTM Sector S 600, Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Мультианализ 384-луночных планшетов (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD) проводили с помощью моноклонального мышинового антитела к дистрофину человека Manex 1011b (DSBH, University of Iowa, Developmental Studies Hybridoma Bank) при концентрации 2 мкг/мл в бикарбонатном буфере (pH 9,4) в течение ночи. Планшеты затем отмывали 3 раза PBS, а затем блокировали блокирующим буфером (5% BSA в PBS) в течение 4 часов при встряхивании при комнатной температуре. Ткани (~20 мг) гомогенизировали в буфере RIPA при концентрации 1 мг ткани/10 мкл буфера для лизиса (Millipore Sigma, Germany, #R0278) с таблетками коктейля ингибиторов (Roche, #04693159 001) с использованием Qiagen Tissuelyzer при 30 Гц в течение 5 минут, которые повторяли до тех пор, пока ткань не гомогенизировали. Лизаты ткани/RIPA разбавляли 1:3 в связующем буфере (1% BSA, 0,05% Tween-20, 20 mM Tris pH 7,5 в PBS). Лизаты ткани и сульфоконъюгированное мышинное антитело к дистрофину человека Mandys 106 (DSBH,

0,2 мкг/мл) добавляли к предварительно покрытым 384-луночные планшеты и инкубировали при 4°C при встряхивании в течение ночи. Планшеты отмывали PBS с 0,05% Tween-20 и дополнительно 40 мкл MSD Read Буфер Т с поверхностно-активным веществом (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD, #R92TC-1). Затем планшеты считывали с помощью MSD Sector® 6000 Imager (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Эндогенный дистрофин анализировали с использованием того же протокола, но с использованием антител, связывающих мышечный дистрофин.

Определение экспрессии белка путем жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) - Ткани поперечно-полосатых мышц (сердце, скелетные) собирали и немедленно замораживали. Перед анализом ткани гомогенизировали буфером RIPA в соотношении 1:20. Гомогенаты расщепляли с помощью трипсина и после фракционирования для обогащения пептидами, образцы анализировали с помощью ЖХ-МС/МС путем мониторинга ранее идентифицированных уникальных пептидов, общих как для мышечного, так и для человеческого дистрофина (LLDLLEGLTGQK). Аналоги, меченые стабильными изотопами (SIL) для пептидов человека и мыши, добавляли в гомогенат и использовали для оценки измеренных уровней. Также получали общий белок и использовали с целью нормализации.

Получение иммуно-флуоресцентных предметных стекол – Мышей mdx^{scsn} обрабатывали AAV9-BXA-220931 или AAV9-BXA-212374 в возрасте 2 недель. Ткани сердца и скелетных мышц собирали у этих мышей в возрасте 4 недель или 12 недель. Мышечная ткань замораживали в октаноате в жидком N₂ и делали срезы по 5 мкм. Срезы наносили на стандартные предметные стекла и хранили при -80°C. Замороженные срезы доводили до комнатной температуры и блокировали 200 мкл блокирующего буфера (Фосфатно-солевой буфер Дюльбекко (DPBS) (ThermoFisher, Waltham, MA, #14190144), дополненный 0,05% TritonX-100 (Sigma-Aldrich, #T8787) и 1% BSA (Sigma-Aldrich #A9576)) в течение 30 минут. Антитело мыши, связывающие N-конец человеческого и мышечного дистрофина (не реагирующее перекрестно с атрофином) и крысиное антитело к ламинину-2 (Sigma-Aldrich #L0663) разбавляли блокирующим буфером. Затем блокирующий буфер удаляли вакуумным аспиратором и добавляли по 200 мкл раствора первичных антител на каждое предметное стекло. После одного часа инкубации при комнатной температуре стекла отмывали 3 раза в DPBS. Получали раствор вторичных антител для обнаружения первичных антител путем разведения козлиного антитела Alexafluor 546 к крысиному антителу (ThermoFisher, Waltham, MA, #A11077) и козлиного антитела Alexafluor 647 к мышечному IgG2b (ThermoFisher, Waltham, MA, #A21242) в блокировочном буфере (см. выше). DAPI был также включен в раствор вторичных

антител для контрастного окрашивания ядер в ткани. 200 мкл раствора вторичных антител добавляли к ткани и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Следуя протоколу окрашивания, предметные стекла 3 раза отмывали DPBS с последующей промывкой дистиллированной H₂O. По одной капле гистологической среды против выцветания ProLong diamond (ThermoFisher, Waltham, MA, #P36962) добавляли на каждое предметное стекло, после чего каждое предметное стекло закрывали покровным стеклом. Слайды хранили при 4°C для визуализации на следующие сутки.

Получение иммуофлуоресцентного изображения - Получение флуоресцентного изображения флуоресцентно меченых тканевых срезов проводили на конфокальном микроскопе Leica SP8 (Leica Microsystems; см. фиг. 12, 17, 19 и 20) или на устройстве визуализации Opera Phenix™ HCS (PerkinElmer, Waltham, MA; см. фиг. 15 и 16), оснащенном лазерной микролинзовой конфокальной и большой 4,7-мегапиксельной CMOS-камерой. Флуоресцентные красители, используемые для мечения тканей, были сопоставлены с соответствующими световыми источниками возбуждения лазера и комплементарными эмиссионными фильтрами (ядра (DAPI): возбуждение 375 нм, испускание 435-480 нм; миниатюризированный дистрофин (AF647): возбуждение 640 нм, испускание 650-760 нм; ламинин (AF546): возбуждение 561 нм, испускание 570-630 нм). Программный пакет Harmony 4.9 использовали для получения изображений. Программное обеспечение сначала выполнило сканирование с малым увеличением в 5 раз, чтобы определить область интереса (ROI). Вторую стадию получения многоцветных изображений в ROI проводили с использованием объектива с 20-кратным увеличением. Монтажное изображение области интереса было получено с перекрытием полей зрения на 20%. Изображения были импортированы в систему хранения и анализа данных изображений Columbus™ (PerkinElmer, Waltham, MA) для анализа и количественной оценки.

Анализ иммуофлуоресцентных изображений. В системе хранения и анализа данных изображений Columbus™ была создана процедура анализа структурных элементов для идентификации мышечных волокон как в сердце, так и в скелетно-мышечной ткани, а также для количественного определения количества окрашивания миниатюризированных дистрофинов. Было создано глобальное изображение всей ткани. Каждое поле зрения было инвертировано, чтобы программное обеспечение могло идентифицировать «клетки», которые были очерчены окрашиванием ламинином. Фильтры размера и интенсивности применялись для выявления только истинных мышечных волокон. Наружная мембрана, идентифицированная окрашиванием ламинина, была расширена, и рассчитывали интенсивность миниатюризированного дистрофина внутри этой области. Интенсивности

рассчитывали для всех тканей по всем группам животных. Пороговые значения интенсивности для «клеток» или мышечных волокон, положительных по миниатюризированному дистрофину, определяли в ткани мышц DMD с использованием средней интенсивности плюс 3 стандартных отклонения. Определяли долю ламинин-положительных мышечных волокон также положительных по белку минидистрофина и долю ламинин-положительных мышечных волокон с центральными ядрами.

Стандартная гистология - Предметные стекла с тканями, приготовленные, как описано выше, также использовали для стандартной гистологии.

Пример 9: Анализ дистрофин-гликопротеинового комплекса (DGC) в мышечных волокнах мышц *mdx^{scsn}*, нелеченных или леченных миниатюризированными дистрофинами

Чтобы проверить, восстанавливает ли миниатюризированный дистрофин компоненты дистрофин-гликопротеинового комплекса (DGC), мышцы диафрагмы мышц *mdx^{scsn}*, обработанных либо миниатюризированный дистрофином ВХА-220931, либо ВХА-212374, как описано в примере 8, анализировали иммунофлуоресцентной гистологией, в принципе, как описано в примере 8. В кратком изложении, замороженные в октаноате срезы инкубировали в блокирующем буфере (1× PBS, 1% BSA, 0,05% Triton) в течение 30 минут, затем инкубировали с первичными антителами к nNOS (1:200; ThermoFisher, Waltham, MA, #61-7000), β-саркогликану (1:20; Novus Biologicals, Centennial, CO, #NBP1-90300) или α-синтрофину (1:200; Novus Biologicals, Centennial, CO, NB600-1294) в течение 1 часа, отмывали три раза в 1× PBS, а затем инкубировали с вторичным антителом, конъюгированным с Alexa-488 (1:800 ThermoFisher, Waltham, MA) в течение 30 минут, трижды промывали в 1× PBS и заклеивали покровной пленкой с заливочной средой Prolong gold с DAPI. Данные показали, что ВХА-220931 восстанавливал компоненты дистрофин-гликопротеинового комплекса (DGC), включая nNOS, в сарколемме обработанных мышц, тогда как ВХА-212374 не восстанавливал nNOS в сарколемме (см. фиг. 17).

Пример 10: Анализ мышечной массы у мышей *mdx^{scsn}*, нелеченных или леченных миниатюризированными дистрофинами

Как правило, у мышей *mdx^{scsn}* тяжелее мышечная масса из-за значительной мышечной дегенерации и регенерации. Оценивали массу передней большеберцовой мышцы у нелеченных и леченных мышей (как описано в примере 8). Наш анализ показал, что мышцы *mdx^{scsn}*, обработанные как миниатюризированным дистрофином ВХА-220931, так и ВХА-212374, сохраняли нормальную мышечную массу (см. фиг. 18).

Пример 11: Анализ костамеров в мышцах мышей *mdx^{scsn}*, нелеченных или

леченных миниатюризированными дистрофинами

Для иммуноокрашивания косташеров в мышцах мышей *mdx^{scsn}*, нелеченных и леченных миниатюризированными дистрофинами, как показано в примере 8, использовали способ, аналогичный способу Williams M.W. and Bloch R.J., *Extensive but coordinated reorganization of the membrane skeleton in myofibers of dystrophic (mdx) mice*, *J. Cell. Biol.* 144(6):1259-70 (1999). В кратком изложении мышей *mdx^{scsn}* анестезировали и перфузию фиксировали 2% параформальдегидом в 1× PBS. Затем рассекали икроножные мышцы, помещали в 20% сахарозу в 1× PBS на 2 часа при 4°C, помещали в криопробирку и, наконец, быстро замораживали в жидком N₂. Из третьего пальца длинного разгибателя пальцев вырезали продольные срезы длиной 40 мкм, аналогично ранее описанному протоколу (Banks G.B. *et al.*, *Muscle structure influences utrophin expression in mdx mice*, *PLoS Genet.* 10(6):e1004431 (2010)) и ткань иммуноокрашивали с помощью антитела к N-концу дистрофина (связывающее дистрофин как человека, так и мыши) и антитела к анкирину G (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Образцы затем отмывали 3 раза в 1× PBS и наносили вторичные антитела, конъюгированные с Alexa 488 для мечения дистрофина и Alexa-594 для мечения анкирина G. Образцы затем снова отмывали 3 раза в 1× PBS, а затем, наконец, наносили на предметные стекла с антивыцветающей средой ProLong™ Gold, содержащей DAPI. Изображения получали с использованием конфокального микроскопа Leica SP8 (Leica Microsystems). Полученные данные показали, что миниатюризированные дистрофины локализованы как на Z-дисках, так и на M-дисках косташеров, подобно дистрофинам в мышцах дикого типа (см. фиг. 19).

Пример 12: Анализ нейромышечных соединений мышей *mdx^{scsn}*, нелеченных или леченных миниатюризированными дистрофинами

Нейромышечные соединения у мышей *mdx^{scsn}*, нелеченных или леченных миниатюризированными дистрофинами, как описано в примере 8, были помечены α-бунгаротоксином в третьем пальце длинного разгибателя пальцев в соответствии с Faber R.M. *et al.*, *Myofiber branching rather than myofiber hyperplasia contributes to muscle hypertrophy in mdx mice*, *Skelet. Muscle* 4:10 (2014). Анализ нейромышечных соединений у мышей *mdx^{scsn}* с помощью окрашивания α-бунгаротоксином показал, что постсинаптический аппарат фрагментирован при мышечной дегенерации в мышцах нелеченных мышей *mdx^{scsn}*, но оба миниатюризированных дистрофина, ВХА-220931 и ВХА-212374, предотвращали фрагментацию синапсов у мышей, леченных соответствующими AAV (см. фиг. 20).

Пример 13: Анализ уровней сывороточной креатинкиназы у мышей *mdx^{scsn}*, нелеченных или леченных миниатюризированными дистрофинами

Креатинкиназу как показатель повреждения мышц измеряли в сыворотке с использованием коммерчески доступных наборов. Креатинкиназу измеряли в возрасте 4 недель (через 2 недели после доставки вируса) и 12 недель. Данные показали, что у мышей *mdx^{scsn}*, получавших AAV9-BXA-220931 или AAV9-BXA-212374, как описано в примере 8, уровни сывороточной креатинкиназы и, таким образом, повреждение мышц были значительно снижены (не показано).

AAV, использованный в настоящем документе, представлял собой AAV9 или AAV8, где ITR были получены из AAV2.

Пример 14: Функциональные исследования *in vivo*

Скелетные мышцы с дефицитом дистрофина производят меньшую удельную силу (силу на единицу площади) и очень восприимчивы к повреждениям, вызванным сокращением. Восстановление экспрессии дистрофина может смягчить эти нарушения. Мышей *mdx* с дистрофией системно лечили приблизительно 2×10^{14} vg/kg AAV9-C5-12(T)-BXA-220931 (SEQ ID NO: 83) в возрасте 2 недель путем ретроорбитальной инъекции. Физиологию мышц конечностей исследовали в возрасте 8 недель. В кратком изложении, мышцы зажимают колено и помещают стопу в стремя, а стремя перемещают при максимальном сокращении мышц с помощью игольчатого электрода. Этот анализ измеряет пиковое подергивание и выработку тетанической мышечной силы, а также травму, вызванную сокращением.

Сократительные свойства передней большеберцовой (ПБ) мышцы тестировали на аппарате *in vivo* (платформа для ног) в соответствии с инструкциями производителя (Aurora Scientific). В кратком изложении, пиковое тетаническое сокращение достигается при 150 Гц на силовой частотной кривой (сила измеряется в крутящем моменте в ньютон-метрах). Пиковое тетаническое сокращение у мышей дикого типа, *mdx^{scsn}* и *mdx^{scsn}*, получавших BXA-220931, одинаков. Однако мышечная масса ПБ больше у мышей *mdx^{scsn}*, так что пиковая тетаническая сила, нормализованная к массе ПБ, снижается у мышей *mdx^{scsn}*, тогда как у леченных мышей *mdx^{scsn}* она находится на уровне дикого типа.

Правую переднюю большеберцовую мышцу исследовали на прочность и устойчивость к повреждению, вызванному сокращением, аналогично ранее описанным протоколам (Khairallah et. al., Science Signaling 5(236) (2012). Повреждение передней большеберцовой (ПБ) мышцы измеряли с помощью аппарата *in vivo* (платформа для ног) в соответствии с инструкциями производителя (Aurora Scientific). Во время пикового тетанического сокращения на частоте 150 Гц (максимальный изометрический крутящий момент) пластина для ног поворачивается на угол от 90° до 135° для напряжения мышц. Это сокращение повторяется каждую минуту. для 20 сокращений, как описано ранее

(Khairallah et. al., 2012). Максимальный изометрический крутящий момент непосредственно перед напряжением значительно снижается с каждым сокращением у мышей mdx^{scsn} . Напротив, ВХА-220931 предотвращает травму, вызванную сокращением, аналогично уровням дикого типа. Данные показывают, что дизайн миниатюризированного дистрофина защищает ПБ мышцы от повреждения, вызванного сокращением.

Экспрессия конструкций миниатюризированного дистрофина конструкций *in vitro* и *in vivo* находится под контролем промотора C5-12(T) (см., например, US 2004/0175727). Используемый AAV представляет собой AAV9 или AAV8, где ITR получены из AAV2.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид миниатюризированного дистрофина, содержащий модифицированный домен спектриновых повторов 16 (R16), в котором часть домена спектриновых повторов 16 (R16) замещена соответствующей частью отличающегося домена спектриновых повторов.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, в которой отличающийся домен спектриновых повторов представляет собой домен спектриновых повторов 2 (R2).

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 или 2, в которой модифицированный домен R16 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68, 69, 70 и 71.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, в которой полипептид миниатюризированного дистрофина содержит от N-конца до С-конца шарнирный домен 1 (H1), домен спектриновых повторов 1 (R1), модифицированный домен R16, домен спектриновых повторов 17 (R17), шарнирный домен 3 (H3), домен спектриновых повторов 23 (R23), домен спектриновых повторов 24 (R24) и шарнирный домен 4 (H4) дистрофина.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 4, в которой (i) домен H1 и домен R1 слиты напрямую, (ii) домен R1 и модифицированный домен R16 слиты напрямую, (iii) модифицированный домен R16 и домен R17 слиты напрямую, (iv) домен R17 и домен H3 слиты напрямую, (v) домен H3 и домен R23 слиты напрямую, (vi) домен R23 и домен R24 слиты напрямую, или (vii) домен R24 и домен H4 слиты напрямую, или (vii) любое их сочетание.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5, в которой полипептид миниатюризированного дистрофина не содержит домен спектриновых повторов 2 (R2), домен спектриновых повторов 3 (R3), домен спектриновых повторов 4 (R4), домен спектриновых повторов 5 (R5), домен спектриновых повторов 6 (R6), домен спектриновых повторов 7 (R7), домен спектриновых повторов 8 (R8), домен спектриновых повторов 9 (R9), домен спектриновых повторов 10 (R10), домен спектриновых повторов 11 (R11), домен спектриновых повторов 12 (R12), домен спектриновых повторов 13 (R13), домен

спектриновых повторов 14 (R14), домен спектриновых повторов 15 (R15), домен спектриновых повторов 18 (R18), домен спектриновых повторов 19 (R19), домен спектриновых повторов 20 (R20), домен спектриновых повторов 21 (R21) домен и/или домен спектриновых повторов 22 (R22).

7. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-6, в которой полипептид миниатюризированного дистрофина дополнительно содержит домен ABD1 и/или домен CR.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 7, в которой полипептид миниатюризированного дистрофина по существу состоит или состоит от N-конца к C-концу из домена ABD1, домена H1, домена R1, модифицированного домена R16, домена R17, домена H3, домена R23, домена R24, домена H4 и домена CR дистрофина.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-8, в которой домен H1 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 74.

10. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-9, в которой домен R1 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 75.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-10, в которой модифицированный домен R16 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 76.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-11, в которой домен R17 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере,

приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 77.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-12, в которой домен H3 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 78.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-13, в которой домен R23 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 79.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-14, в которой домен R24 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 80.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-15, в которой домен H4 представляет собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 81.

17. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-16, в которой полипептид миниатюризированного дистрофина дополнительно содержит на N-конце аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по

миниатюризованного дистрофина содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 86.

23. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-18, в которой полипептид миниатюризованного дистрофина содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95%, по меньшей мере, приблизительно на 96%, по меньшей мере, приблизительно на 97%, по меньшей мере, приблизительно на 98%, по меньшей мере, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентичную SEQ ID NO: 87.

24. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-23, в которой полипептид миниатюризованного дистрофина демонстрирует более высокую экспрессию полипептида миниатюризованного дистрофина, чем BXA-212372 (SEQ ID NO: 88).

25. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 24, в которой экспрессия полипептида миниатюризованного дистрофина, по меньшей мере, приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,6 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,7 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,8 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,9 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,1 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,2 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,3 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,4 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,6 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,7 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,8 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,9 раза или, по меньшей мере, приблизительно в 3 раза выше чем экспрессия полипептида BXA-212372 (SEQ ID NO: 88).

26. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-25, которая дополнительно содержит промотор.

27. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 26, в которой промотор представляет собой тканеспецифический промотор.

28. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 26 или 27, в которой промотор управляет экспрессией терапевтического белка в мышечных клетках, гепатоцитах, эндотелиальных клетках, нервных клетках, синусоидальных клетках или любом их сочетании.

29. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 26-28, в которой промотор

выбран из группы, состоящей из промотора C5-12(T), промотора MLC2v-cTNT455, промотора мышинового тиретина (mTTR), промотора эндогенного фактора VIII (F8) человека, промотора альфа-1-антитрипсина человека (hAAT), минимального промотора альбумина человека, промотора мышинового альбумина, промотора тристетрапролина (TTP), промотора CASH, промотора гена синапсина 1, промотора CAG, промотора цитомегаловируса (CMV), промотора α 1-антитрипсина (AAT), мышечной креатинкиназы (MCK), тяжелой цепи альфа миозина (α MHC), миоглобина (MB), десмина (DES), SPc5-12, 2R5Sc5-12, dMCK, tMCK и промотора фосфоглицератазы (PGK).

30. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-29, которая дополнительно содержит интронную последовательность.

31. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 30, в которой интронная последовательность расположена 5' по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид миниатюризированного дистрофина.

32. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 30, в которой интронная последовательность расположена 3' по отношению к промотору.

33. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 30-32, в которой интронная последовательность содержит синтетическую интронную последовательность.

34. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-33, которая дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент.

35. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 34, в которой посттранскрипционный регуляторный элемент расположен 3' по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид миниатюризированного дистрофина.

36. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 34 или 35, в которой посттранскрипционный регуляторный элемент содержит мутированный посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), участок связывания микроРНК или последовательность ДНК, нацеленную на ядро, или любое их сочетание.

37. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-36, которая дополнительно содержит последовательность 3'UTR поли(A) хвоста.

38. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 37, в которой последовательность 3'UTR поли(A) хвоста выбрана из группы, состоящей из поли(A) дистрофина, поли(A) bGH, поли(A) актина, поли(A) гемоглобина и любого их сочетания.

39. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 37 или 38, в которой последовательность 3'UTR поли(A) хвоста содержит поли(A) дистрофина.

40. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-39, которая дополнительно

содержит энхансерную последовательность.

41. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 40, которая дополнительно содержит первый ITR и/или второй ITR.

42. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 41, в которой первый ITR и второй ITR идентичны.

43. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 41 или 42, где первый ITR и/или второй ITR получены из аденоассоциированного вируса.

44. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-43, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный компонент.

45. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 44, в которой гетерологичный компонент выбран из группы, состоящей из альбумина или его фрагмента, Fc-области иммуноглобулина, С-концевого пептида (СТР) β -субъединицы человеческого хорионического гонадотропина, последовательности PAS, последовательности НАР, трансферрина или его фрагмента, альбумин-связывающей молекулы или ее производного, и любого их сочетания.

46. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45.

47. Вектор по п. 46, который выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, ретровирусного вектора, поксвирусного вектора, бакуловирусного вектора, герпесвирусного вектора.

48. Вектор по п. 46, который представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор.

49. Вектор по п. 48, в котором вектор AAV выбран из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 и AAV11.

50. Вектор по п. 48, в котором вектор AAV представляет собой AAV8 или AAV9.

51. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45 или вектор по любому из пп. 46-50, причем молекулу нуклеиновой кислоты или вектор формулируют со средством для доставки.

52. Молекула нуклеиновой кислоты или вектор по п. 51, в котором средство для доставки содержит липидную наночастицу.

53. Молекула нуклеиновой кислоты или вектор по п. 51, в котором средство для доставки выбрано из группы, состоящей из липосом, нелипидных полимерных молекул, эндосом и любого их сочетания.

54. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45, вектор по любому из пп. 46-50, или молекула нуклеиновой кислоты или вектор по любому из пп. 51-53, которые формулируют для внутривенной, трансдермальной, интрадермальной,

подкожной, легочной или пероральной доставки или любого их сочетания.

55. Молекула нуклеиновой кислоты или вектор по п. 54, которые формулируют для внутривенной доставки.

56. Полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45, вектором по любому из пп. 46-50 или молекулой нуклеиновой кислоты или вектором по любому из пп. 51-55.

57. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45 или вектор по любому из пп. 46-50.

58. Клетка-хозяин по п. 57, причем клетка представляет собой клетку CHO, клетку HEK293, клетку HBK, клетку COS, клетку NSO или клетку HT1080.

59. Фармацевтическая композиция, содержащая (а) нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-45, вектор по любому из пп. 46-50, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по любому из пп. 51-55, полипептид по п. 56 или клетку-хозяина по п. 57 или 58; и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент.

60. Набор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-45, вектор по любому из пп. 46-50, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по любому из пп. 51-55, полипептид по п. 56, клетку-хозяина по п. 57 или 58 или фармацевтическую композицию по п. 59, и инструкции для введения молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида, клетки-хозяина или фармацевтической композиции нуждающемуся в этом индивидууму.

61. Способ получения полипептида миниатюризированного дистрофина, предусматривающий культивирование клетки-хозяина по п. 57 или 58 в подходящих условиях и выделение полипептида миниатюризированного дистрофина.

62. Способ экспрессии полипептида миниатюризированного дистрофина у нуждающегося в этом индивидуума, предусматривающий введение индивидууму нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45, вектора по любому из пп. 46-50, молекулы нуклеиновой кислоты или вектора по любому из пп. 51-55, клетки-хозяина по п. 57 или 58 или фармацевтической композиции по п. 59.

63. Способ лечения индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, предусматривающий введение индивидууму нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45, вектора по любому из пп. 46-50, молекулы нуклеиновой кислоты или вектора по любому из пп. 51-55, полипептида по п. 56, клетки-хозяина по п. 57 или 58 или фармацевтической композиции по п. 59.

64. Способ по п. 63, в котором заболевание или состояние представляет собой заболевание, вызванной дефицитом дистрофина.

65. Способ по п. 64, в котором заболевание представляет собой саркопению, поражение сердца, кахексию, миодистрофию Дюшенна (МДД), миодистрофию Беккера (МБД), X-сцепленную дилатационную кардиомиопатию (XLDC), плечелопаточно-лицевую миодистрофию, миотоническую миодистрофию, поясно-конечностную миодистрофию, окулофарингеальную миодистрофию, миодистрофию Эмери-Дрейфуса, дистальную миодистрофию и/или врожденную миодистрофию.

66. Способ по любому из пп. 62-65, в котором молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, полипептид, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию вводят внутривенно, трансдермально, интрадермально, подкожно, перорально или легочно, или любым их сочетанием.

67. Способ по любому из пп. 63-66, дополнительно предусматривающий введение индивидууму второго средства.

68. Способ по любому из пп. 62-67, в котором индивидуум является человеком.

69. Способ по любому из пп. 62-68, в котором введение индивидууму молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, полипептида, клетки-хозяина или фармацевтической композиции приводит к экспрессии белка дистрофина, повышенной относительно экспрессии белка дистрофина у индивидуума до введения, причем экспрессия белка дистрофина повышена, по меньшей мере, приблизительно в 2 раза, по меньшей мере, приблизительно в 3 раза, по меньшей мере, приблизительно в 4 раза, по меньшей мере, приблизительно в 5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 6 раз, по меньшей мере, приблизительно в 7 раз, по меньшей мере, приблизительно в 8 раз, по меньшей мере, приблизительно в 9 раз, по меньшей мере, приблизительно в 10 раз, по меньшей мере, приблизительно в 11 раз, по меньшей мере, приблизительно в 12 раз, по меньшей мере, приблизительно в 13 раз, по меньшей мере, приблизительно в 14 раз, по меньшей мере, приблизительно в 15 раз, по меньшей мере, приблизительно в 20 раз, по меньшей мере, приблизительно в 25 раз, по меньшей мере, приблизительно в 30 раз, по меньшей мере, приблизительно в 35 раз, по меньшей мере, приблизительно в 40 раз, по меньшей мере, приблизительно в 50 раз, по меньшей мере, приблизительно в 60 раз, по меньшей мере, приблизительно в 70 раз, по меньшей мере, приблизительно в 80 раз, по меньшей мере, приблизительно в 90 раз или по меньшей мере, приблизительно в 100 раз.

70. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид миниатюризованного дистрофина, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 83.

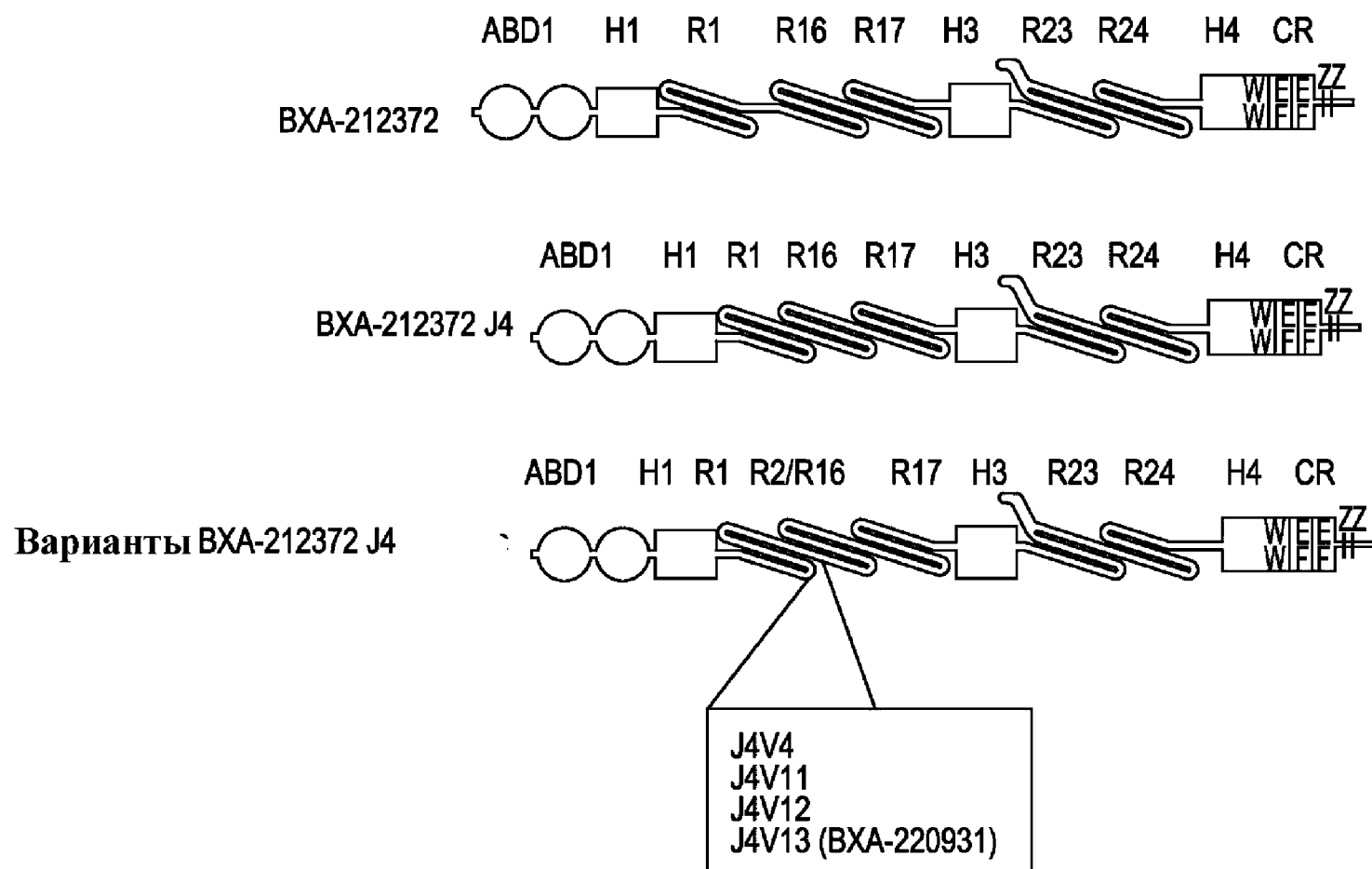
71. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45, вектор по любому из пп. 46-50, молекула нуклеиновой кислоты или вектор по любому из пп. 51-55, полипептид

по п. 56, клетка-хозяин по п. 57 или 58, фармацевтическая композиция по п. 59, набор по п. 60, или способ по любому из пп. 61-69, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид миниатюризированного дистрофина, содержащий аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 83.

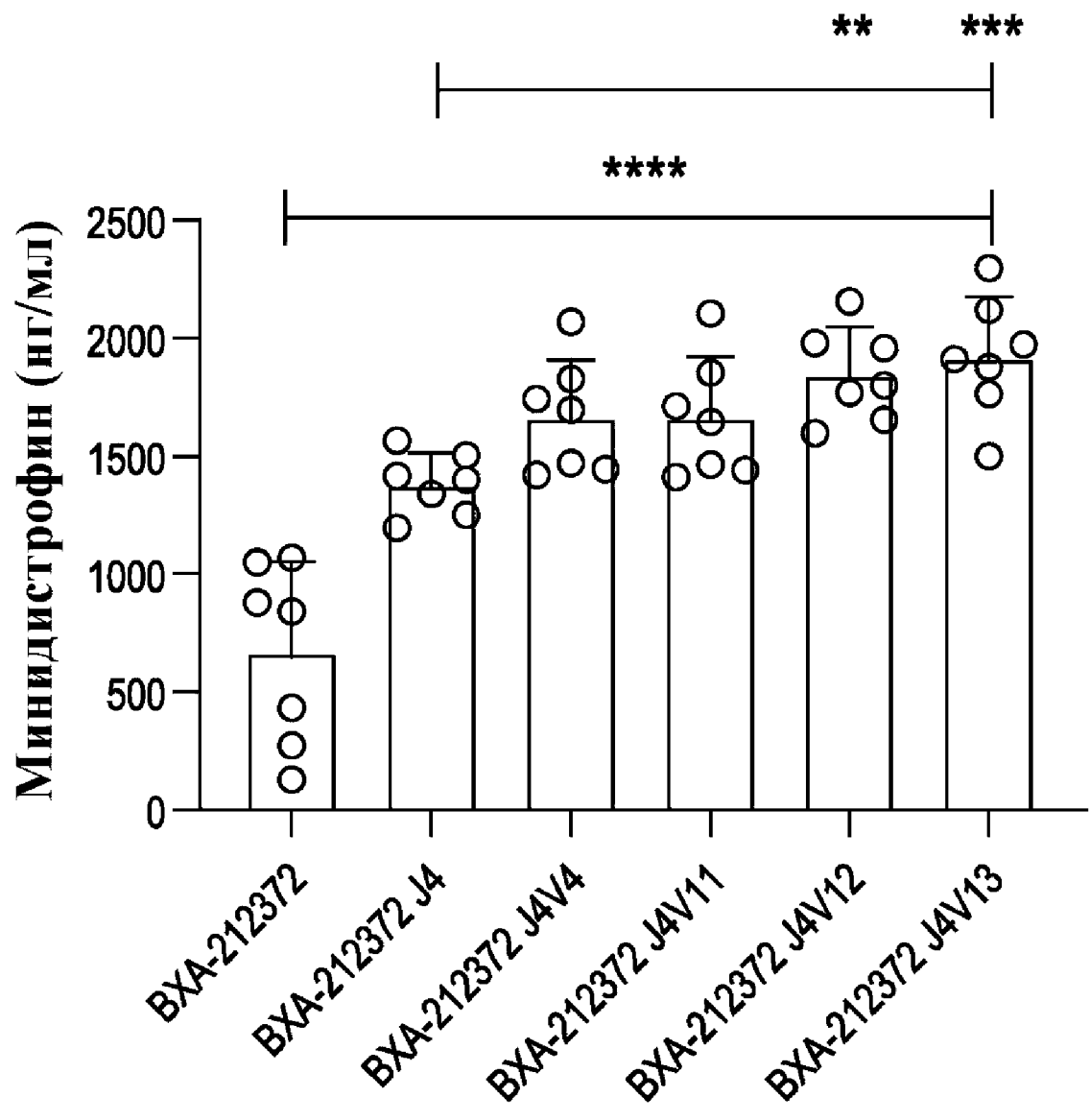
72. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, содержащую по порядку промотор C5-12(T) из SEQ ID NO: 109, интрон SV40 из SEQ ID NO: 110, кодирующую последовательность для миниатюризированного дистрофина BXA-220931 из SEQ ID NO: 111, 3'UTR из SEQ ID NO: 112 и последовательность полиА из SEQ ID NO: 113.

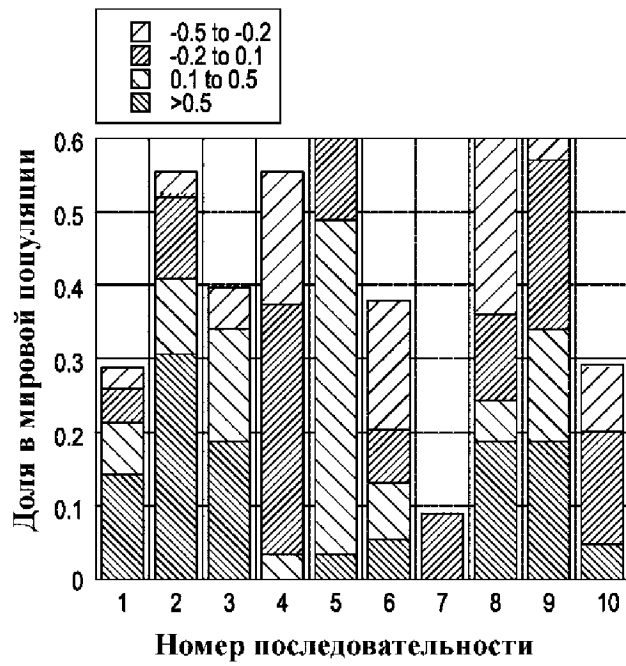
73. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45, вектор по любому из пп. 46-50, молекула нуклеиновой кислоты или вектор по любому из пп. 51-55, полипептид по п. 56, клетка-хозяин по п. 57 или 58, фармацевтическая композиция по п. 59, набор по п. 60 или способ по любому из пп. 61-69, содержащие нуклеотидную последовательность, содержащую по порядку промотор C5-12(T) из SEQ ID NO: 109, интрон SV40 из SEQ ID NO: 110, кодирующую последовательность для миниатюризированного дистрофина BXA-220931 из SEQ ID NO: 111, 3'UTR из SEQ ID NO: 112 и последовательность полиА из SEQ ID NO: 113.



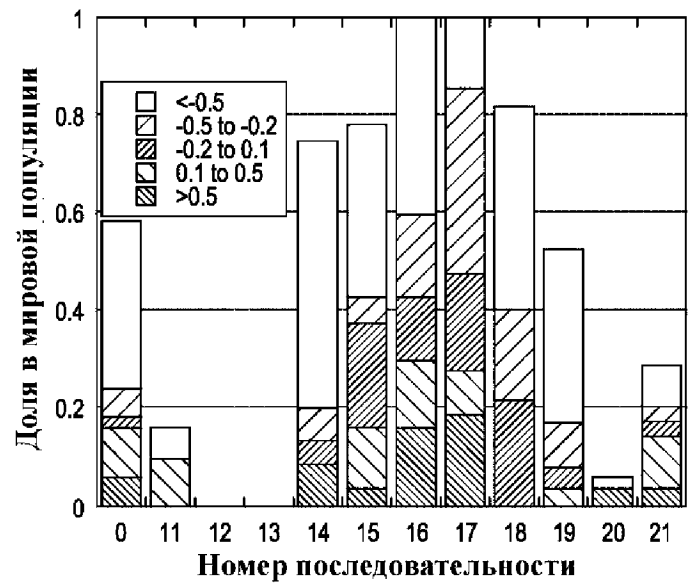


Фиг.3



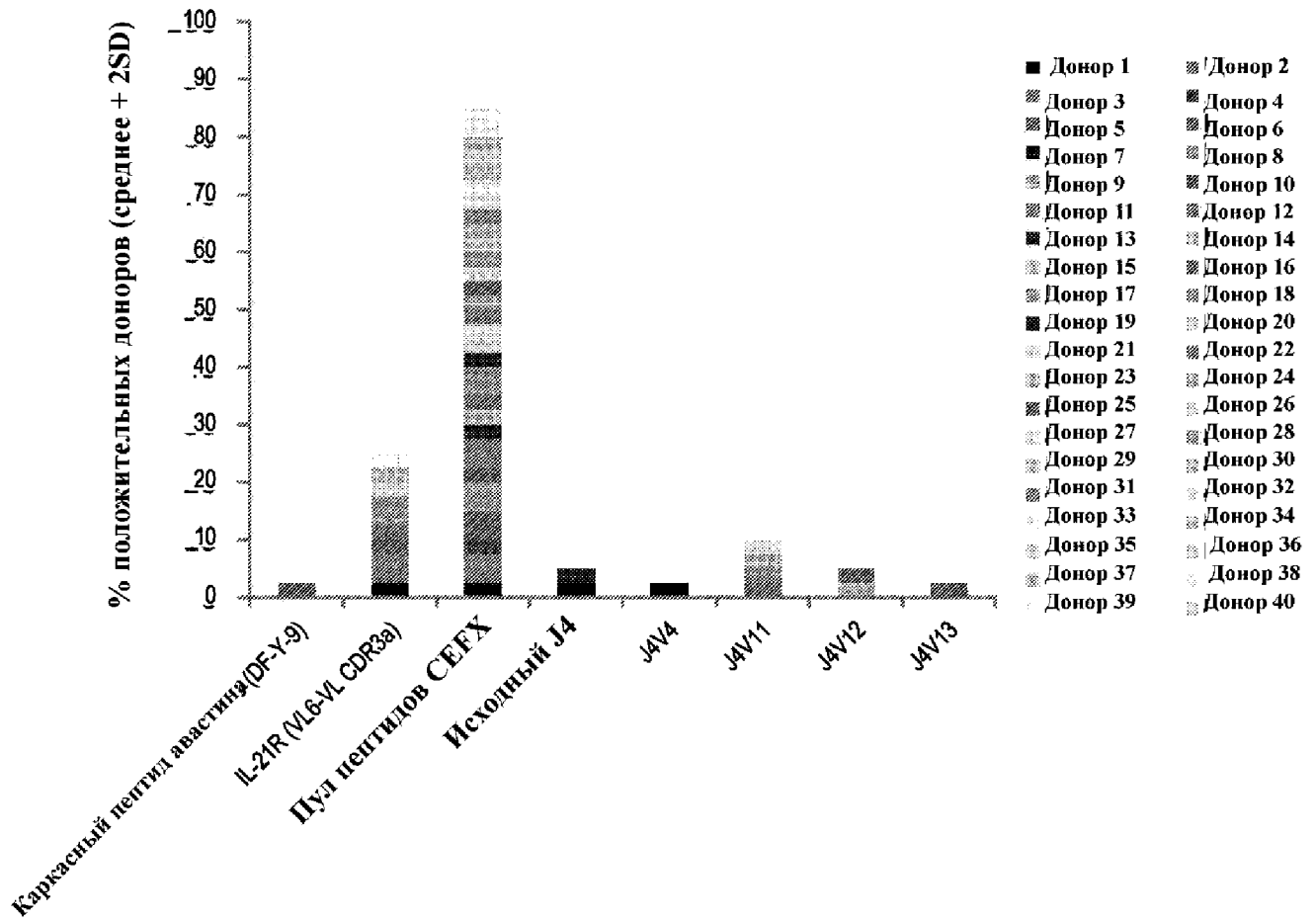


Фиг. 4А

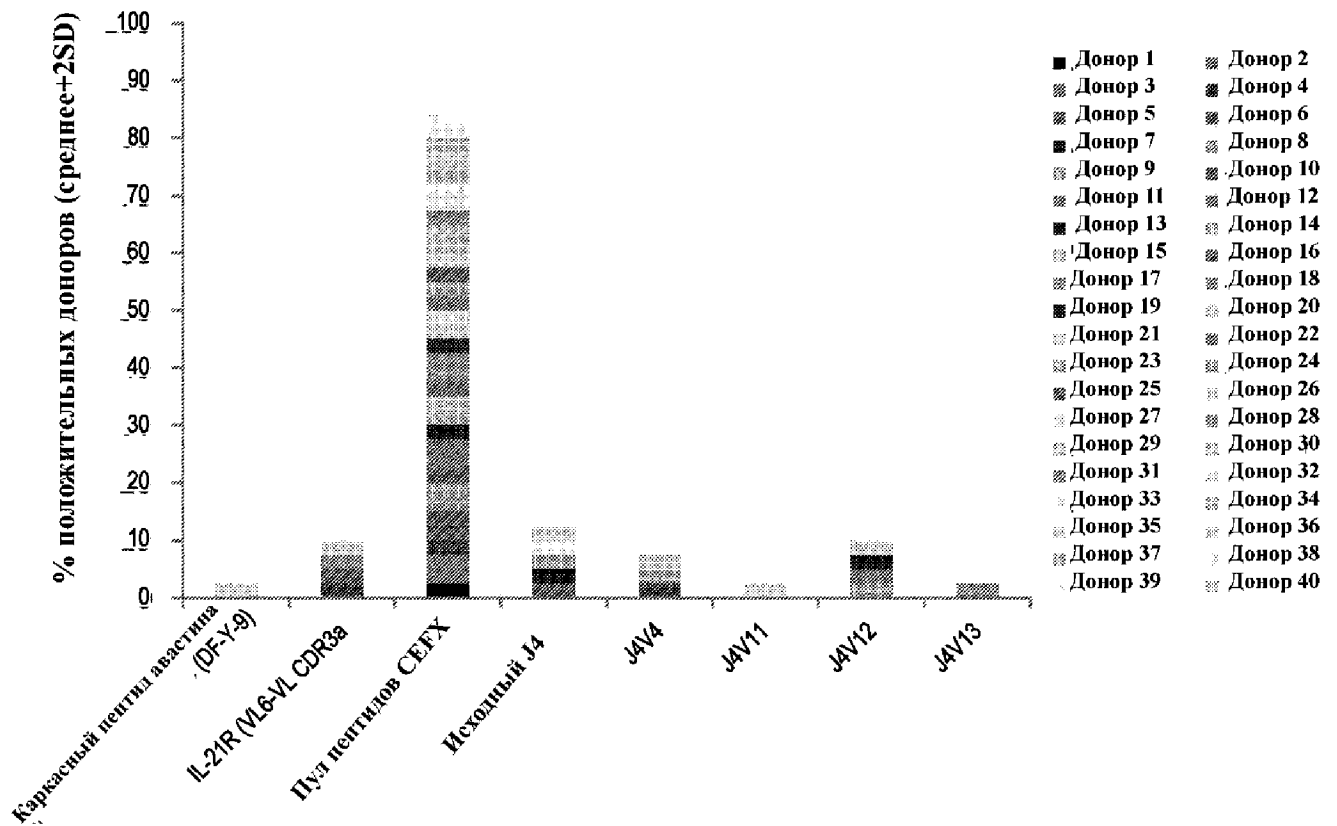


Фиг. 4В

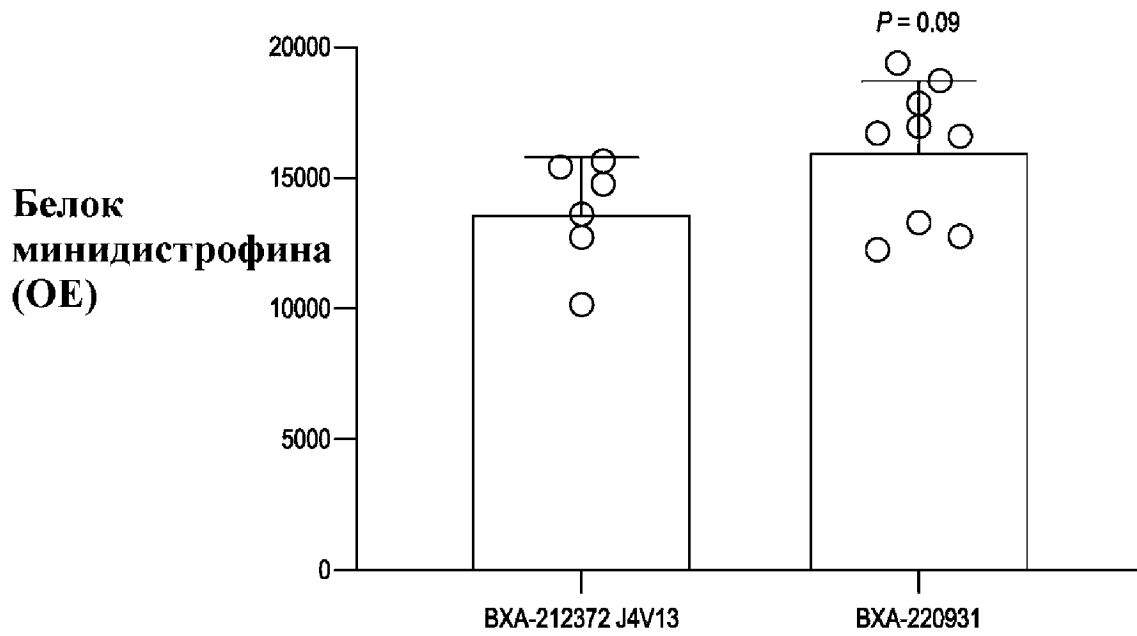
Фиг. 5А

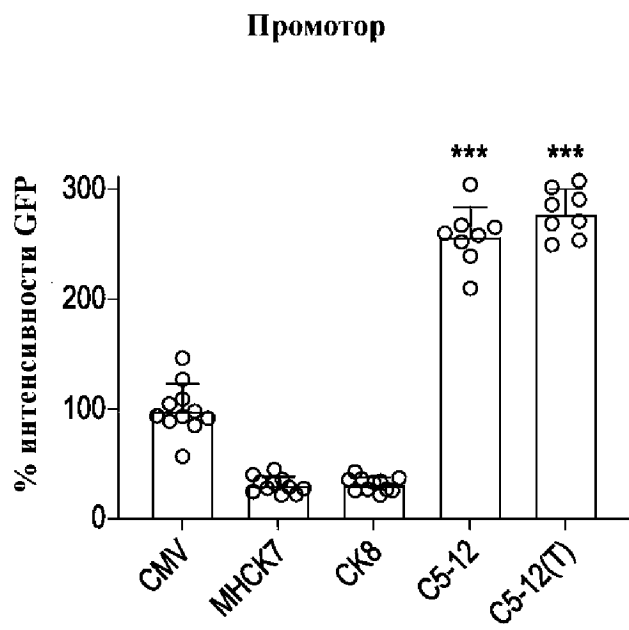


Фиг. 5В

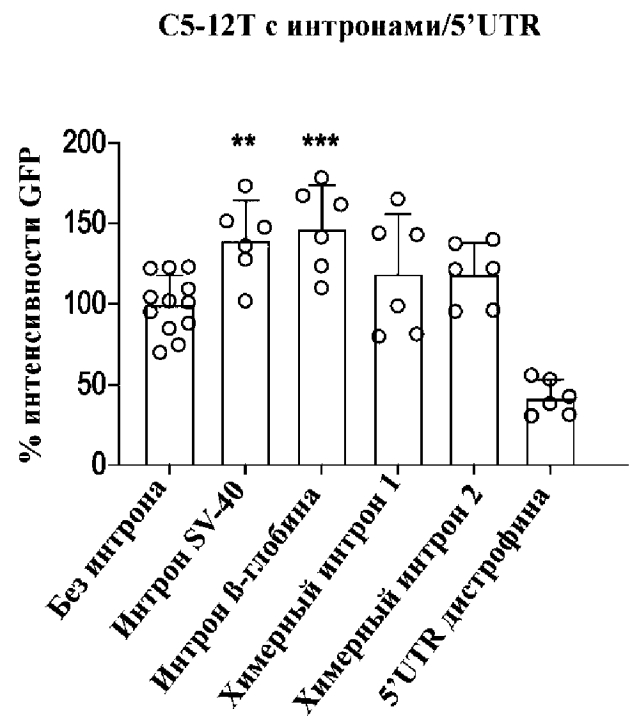


Фиг. 6



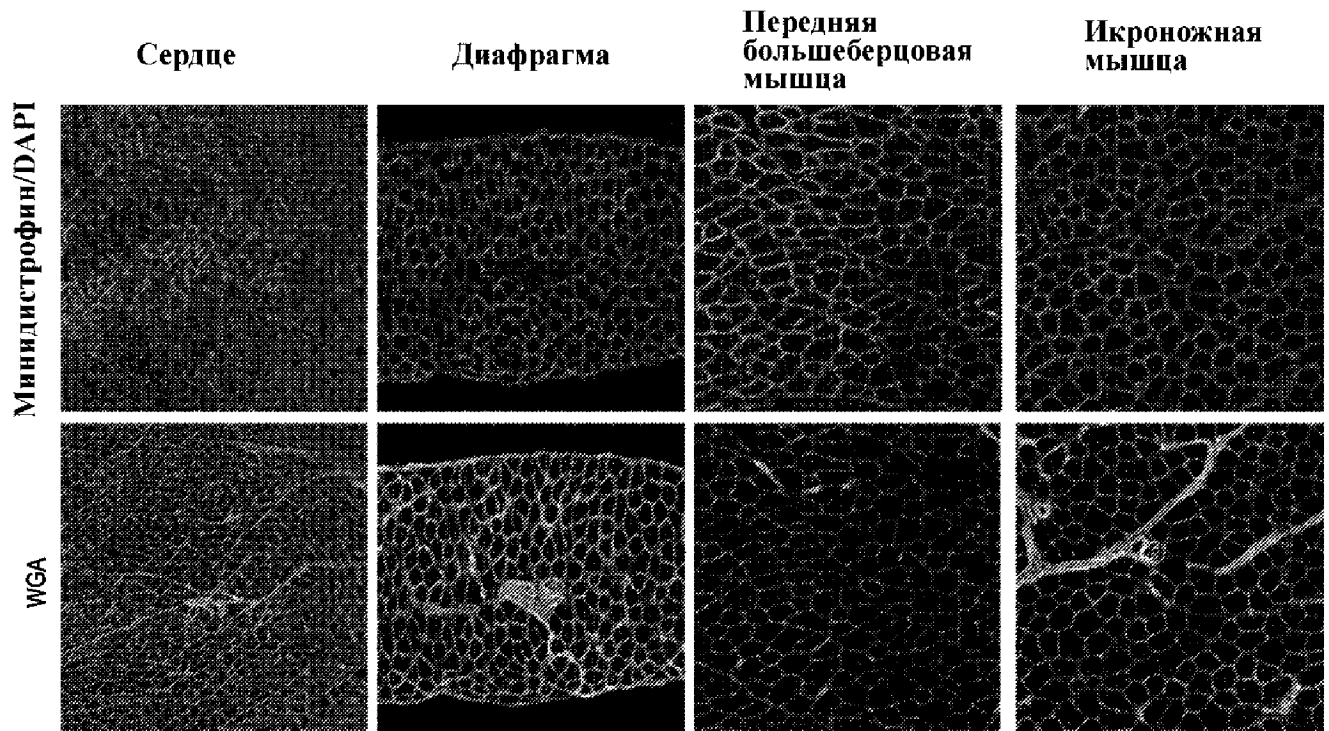


Фиг. 7А

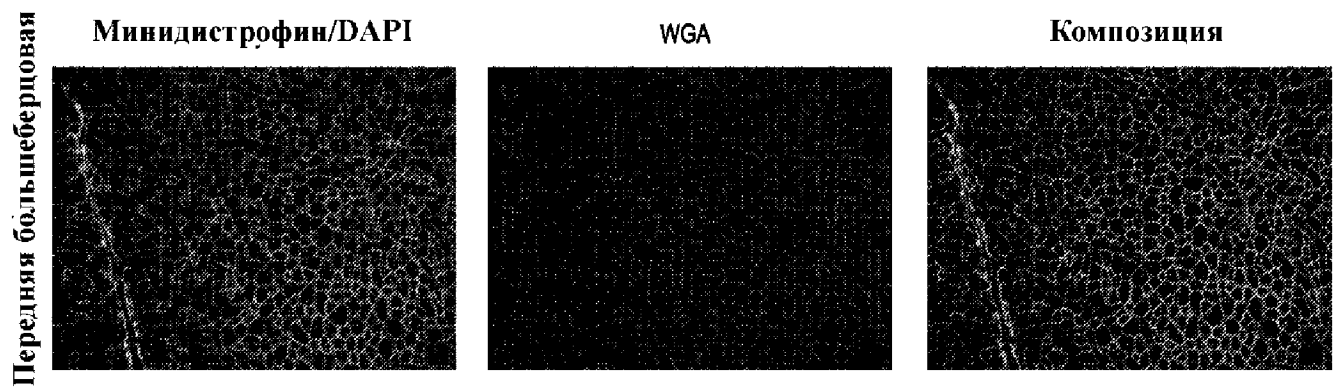


Фиг. 7В

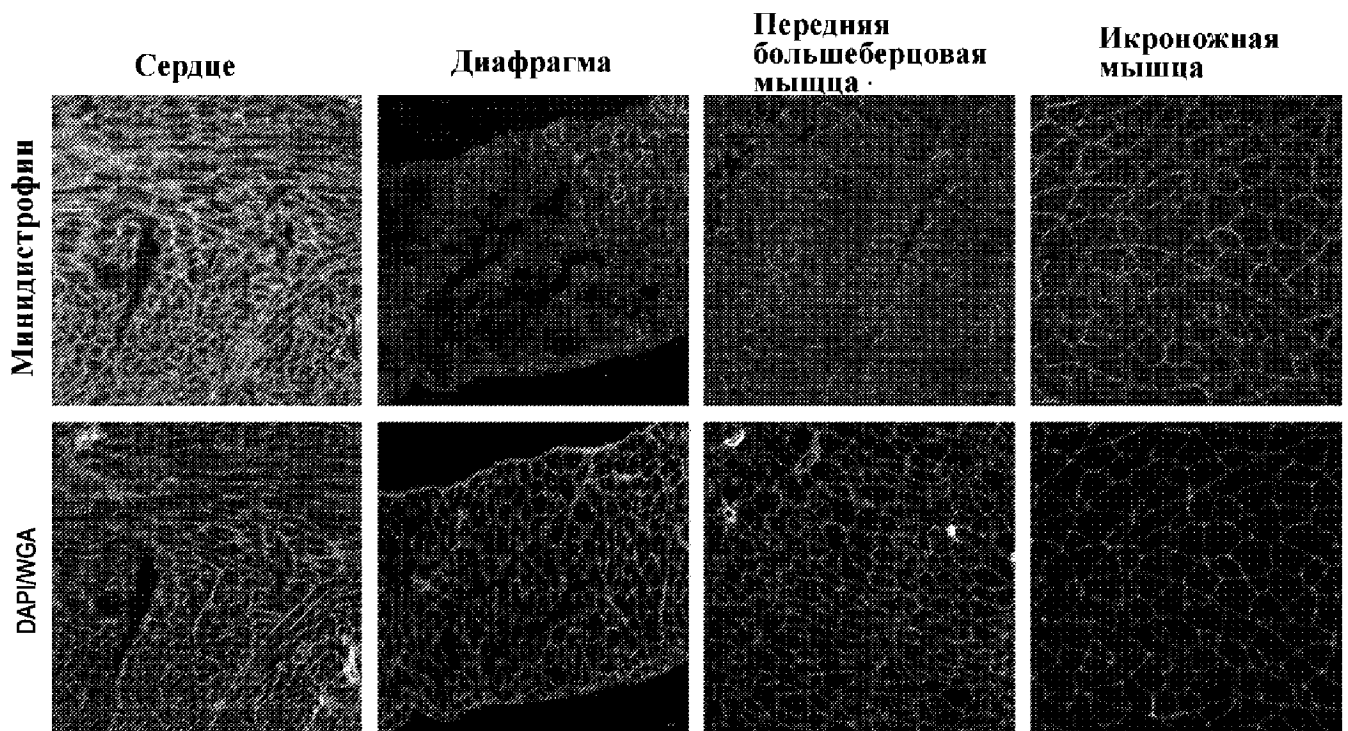
Фиг. 8А



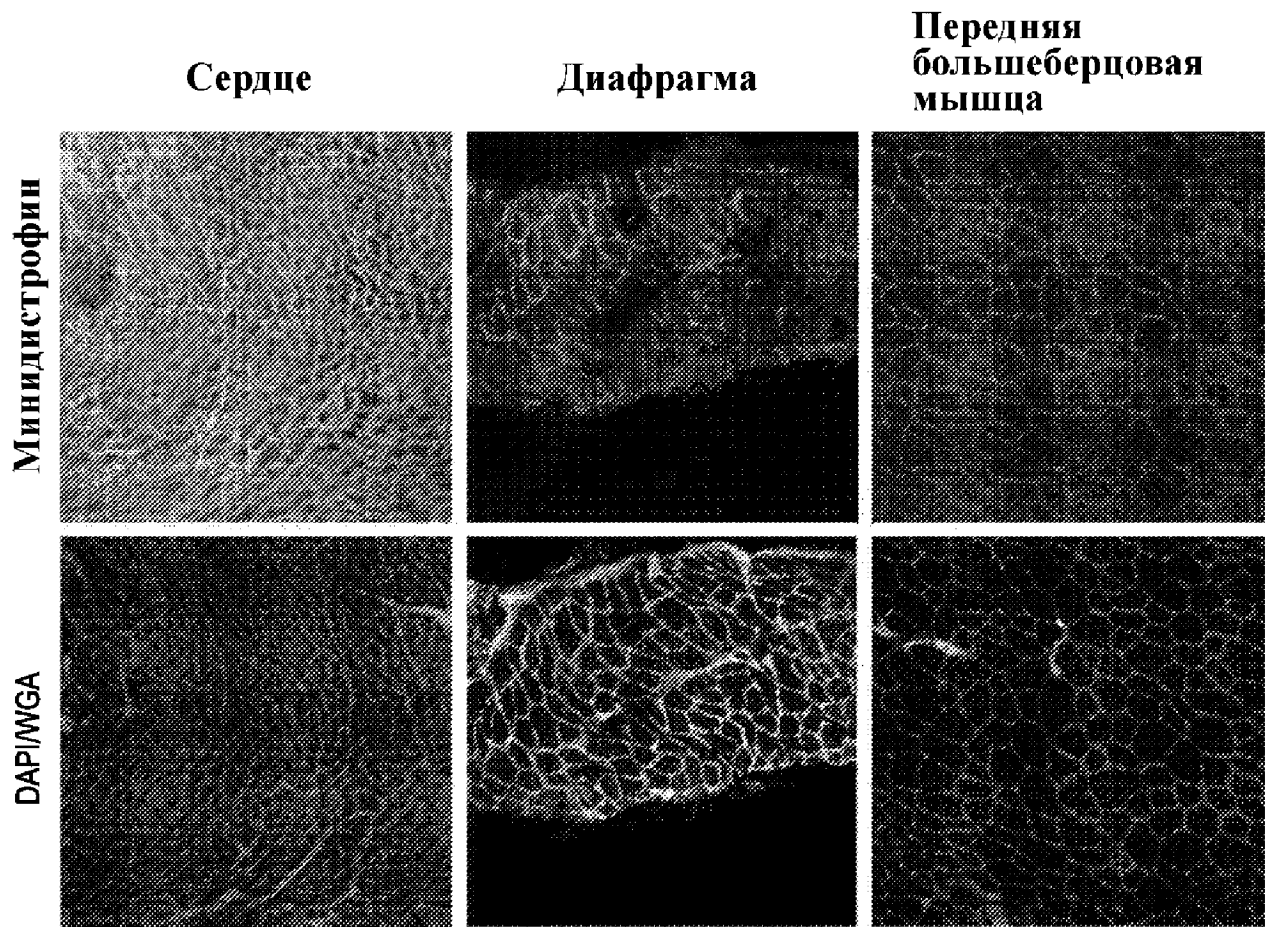
Фиг. 8В



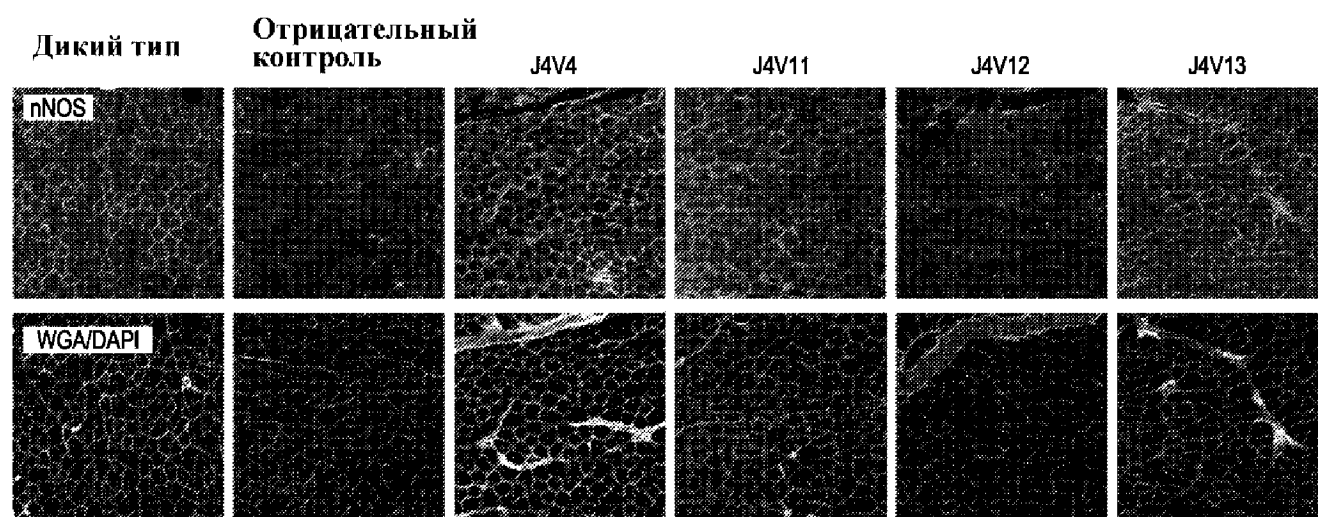
Фиг. 8С

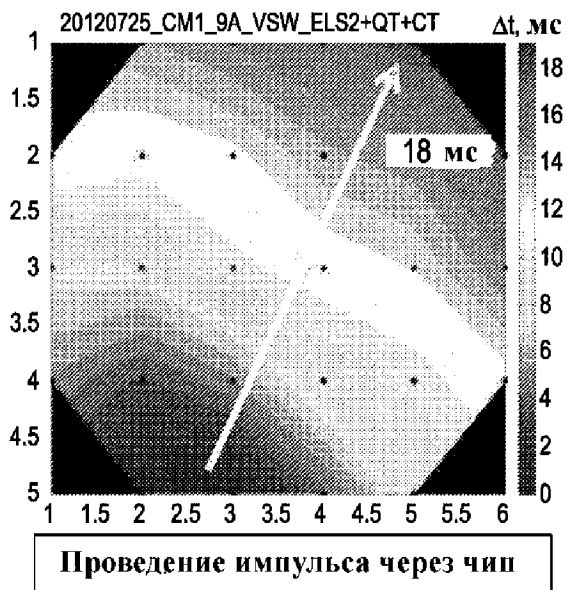


Фиг. 8D



Фиг. 9



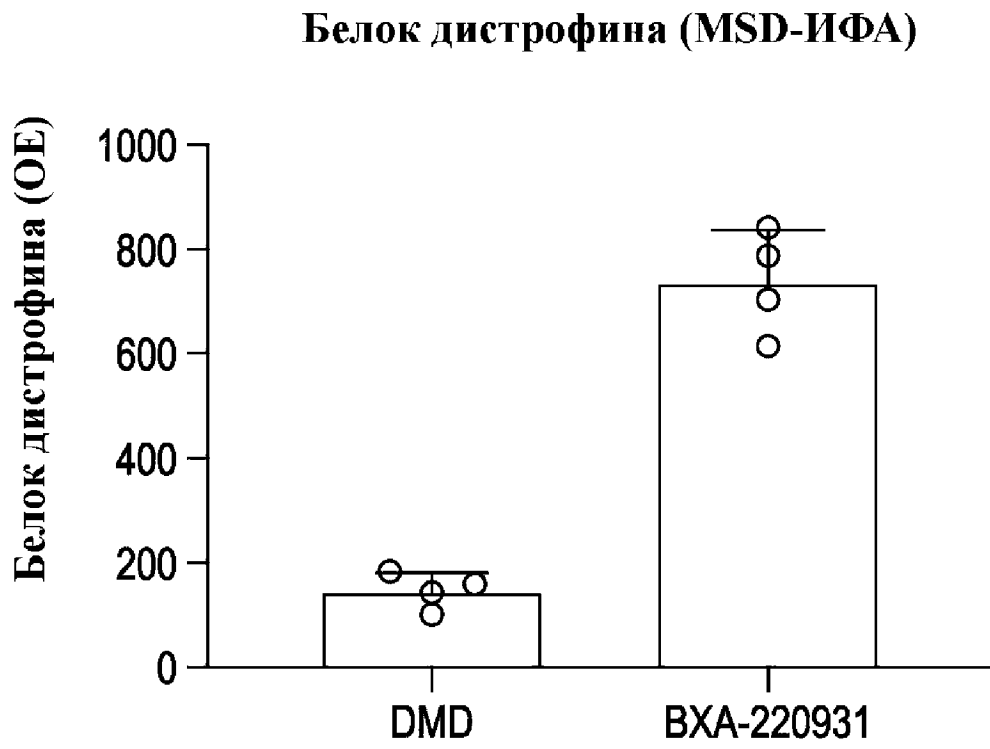


Фиг. 10А



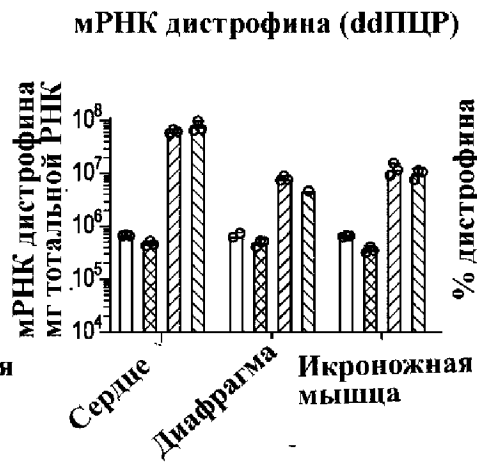
Фиг. 10В

Фиг. 10С

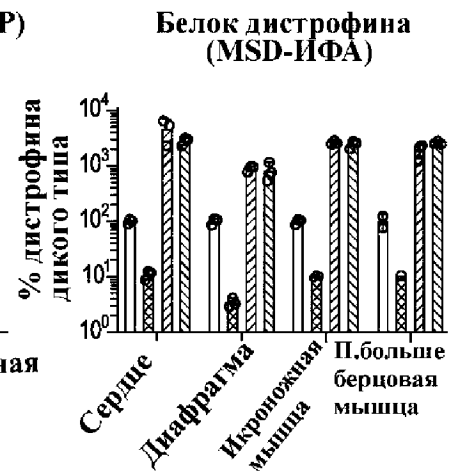




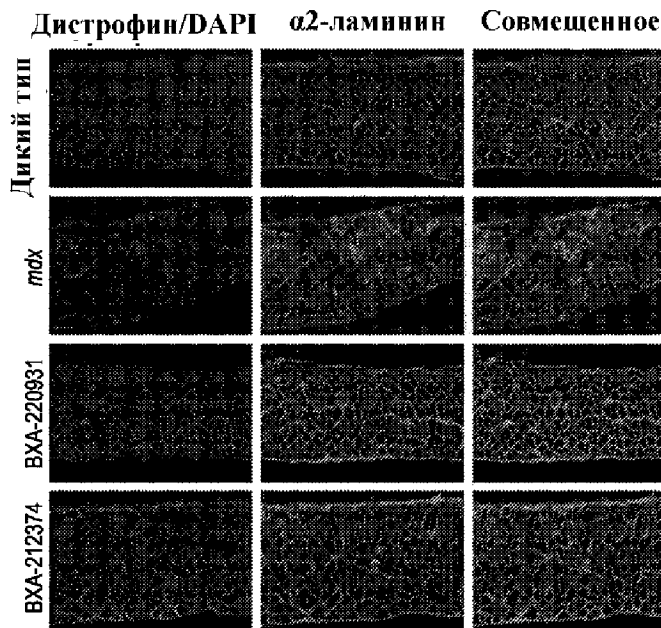
Фиг. 11А



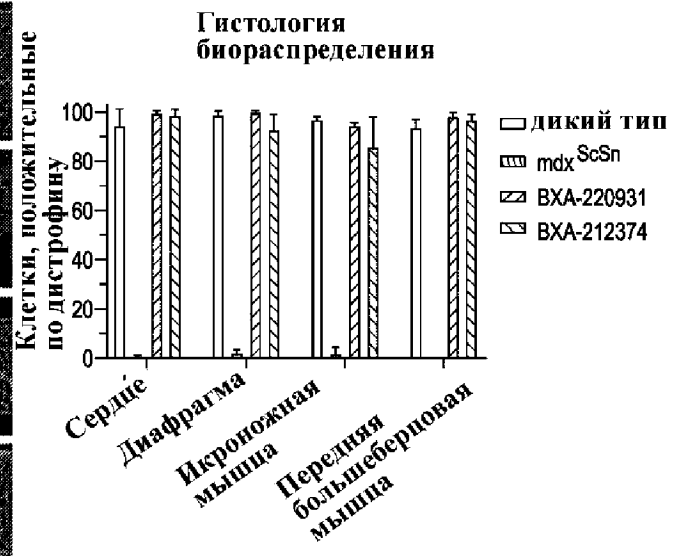
Фиг. 11В



Фиг. 11С

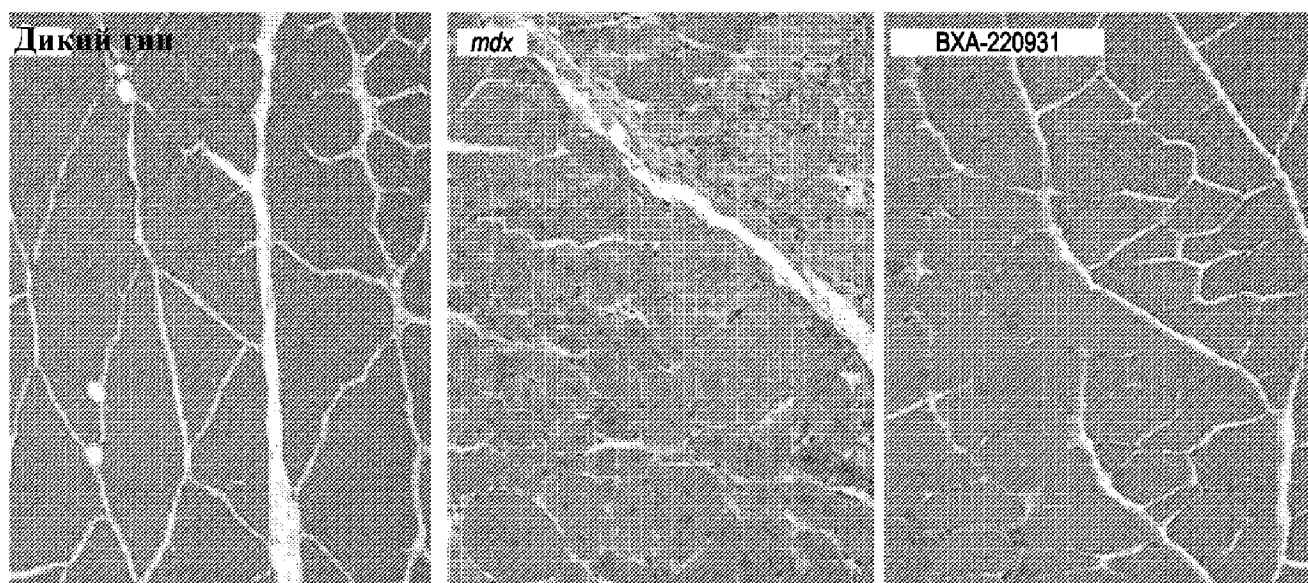


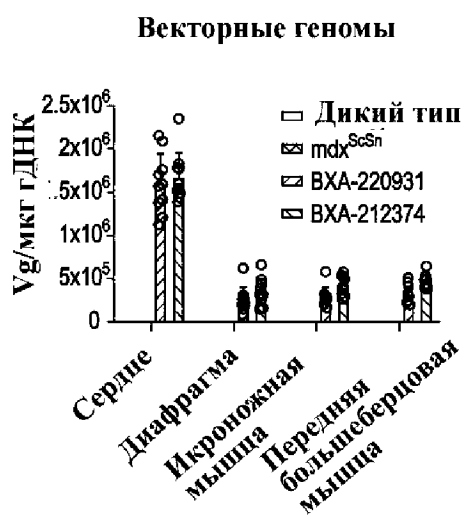
Фиг. 12А



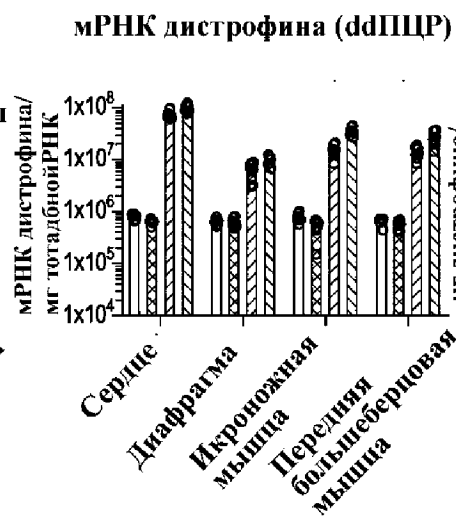
Фиг. 12В

Фиг. 13

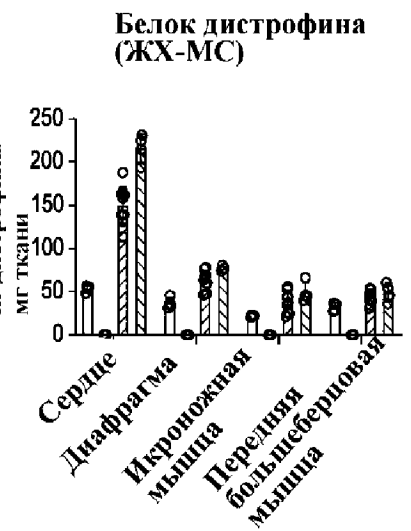




Фиг. 14А

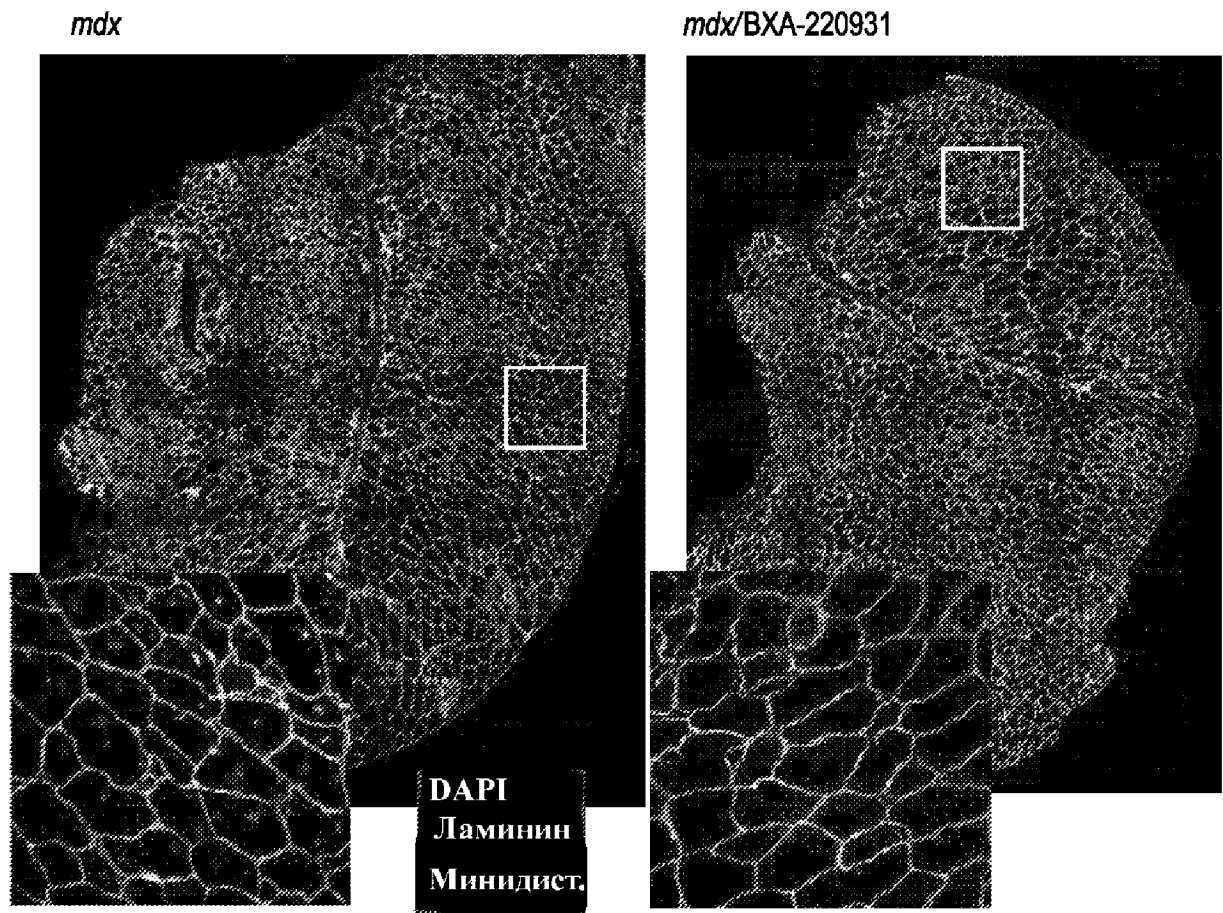


Фиг. 14В

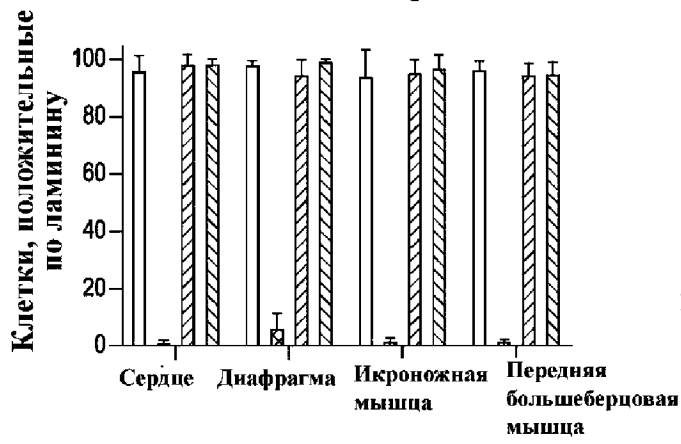


Фиг. 14С

Фиг. 15А

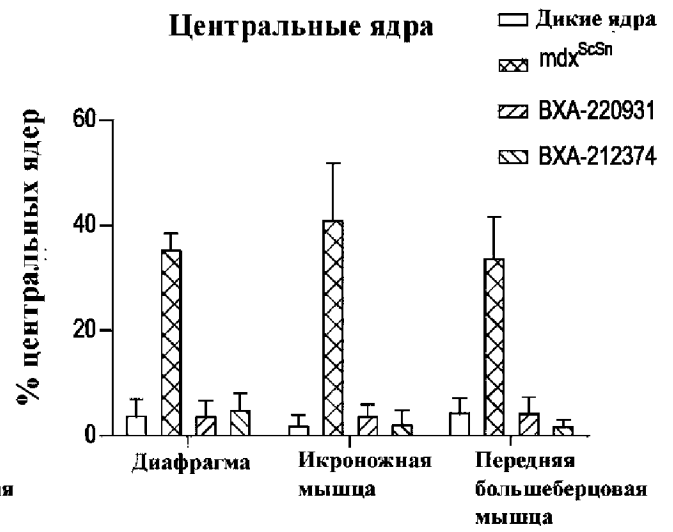


Гистологическое биораспределение в возрасте 12-ти недель



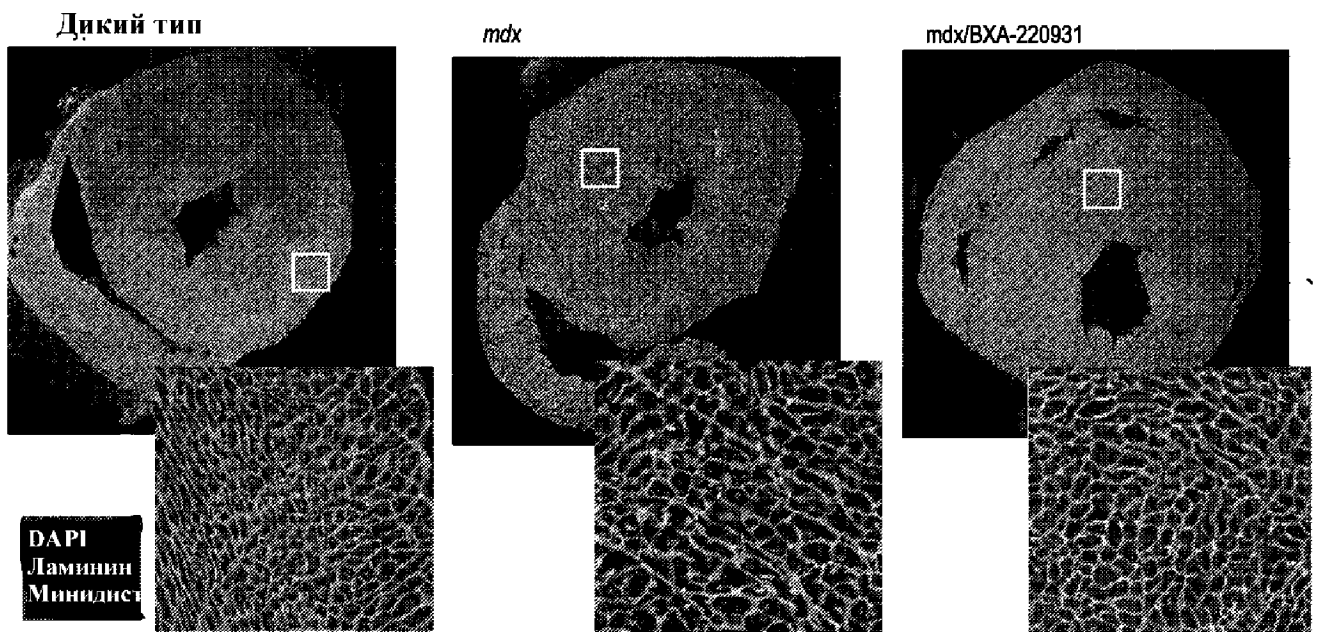
Фиг. 15B

Центральные ядра

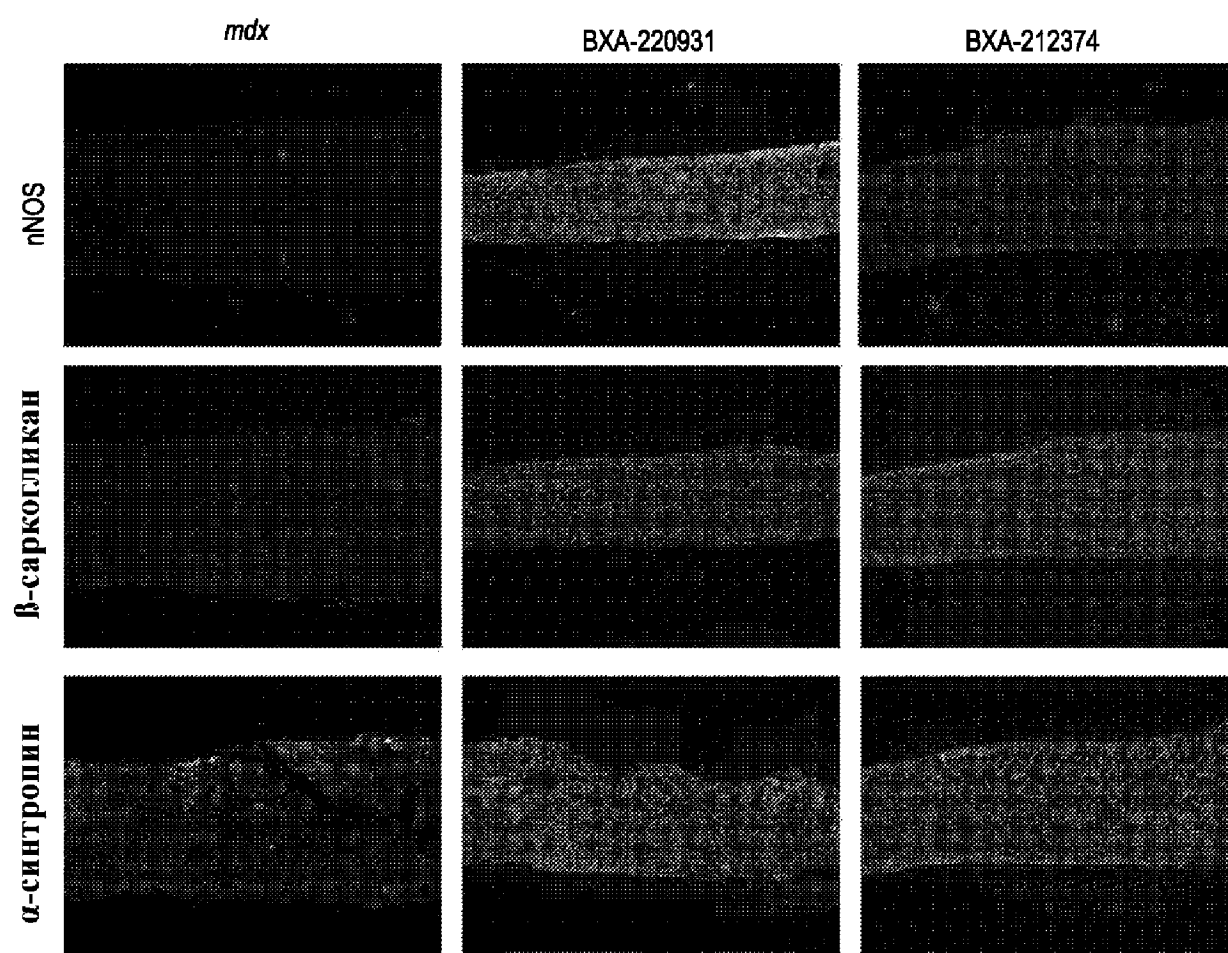


Фиг. 15C

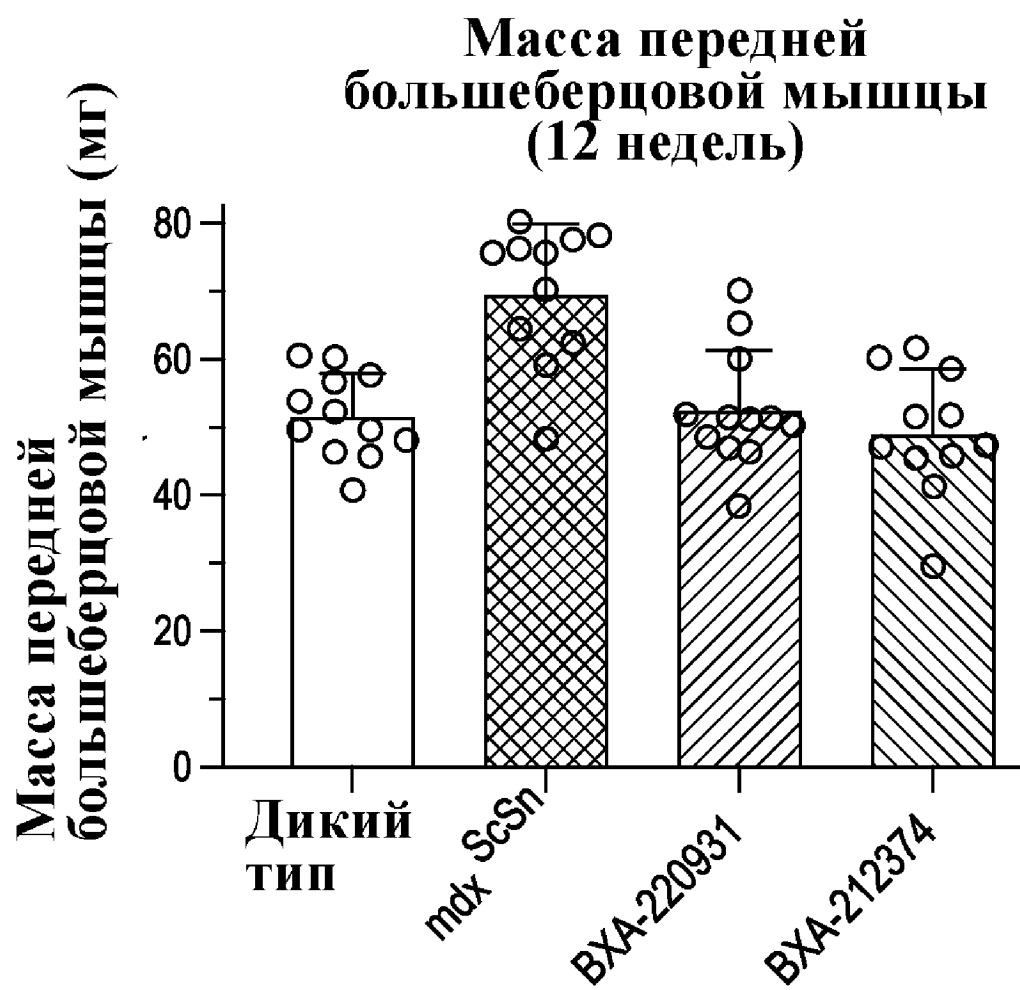
Фиг. 16



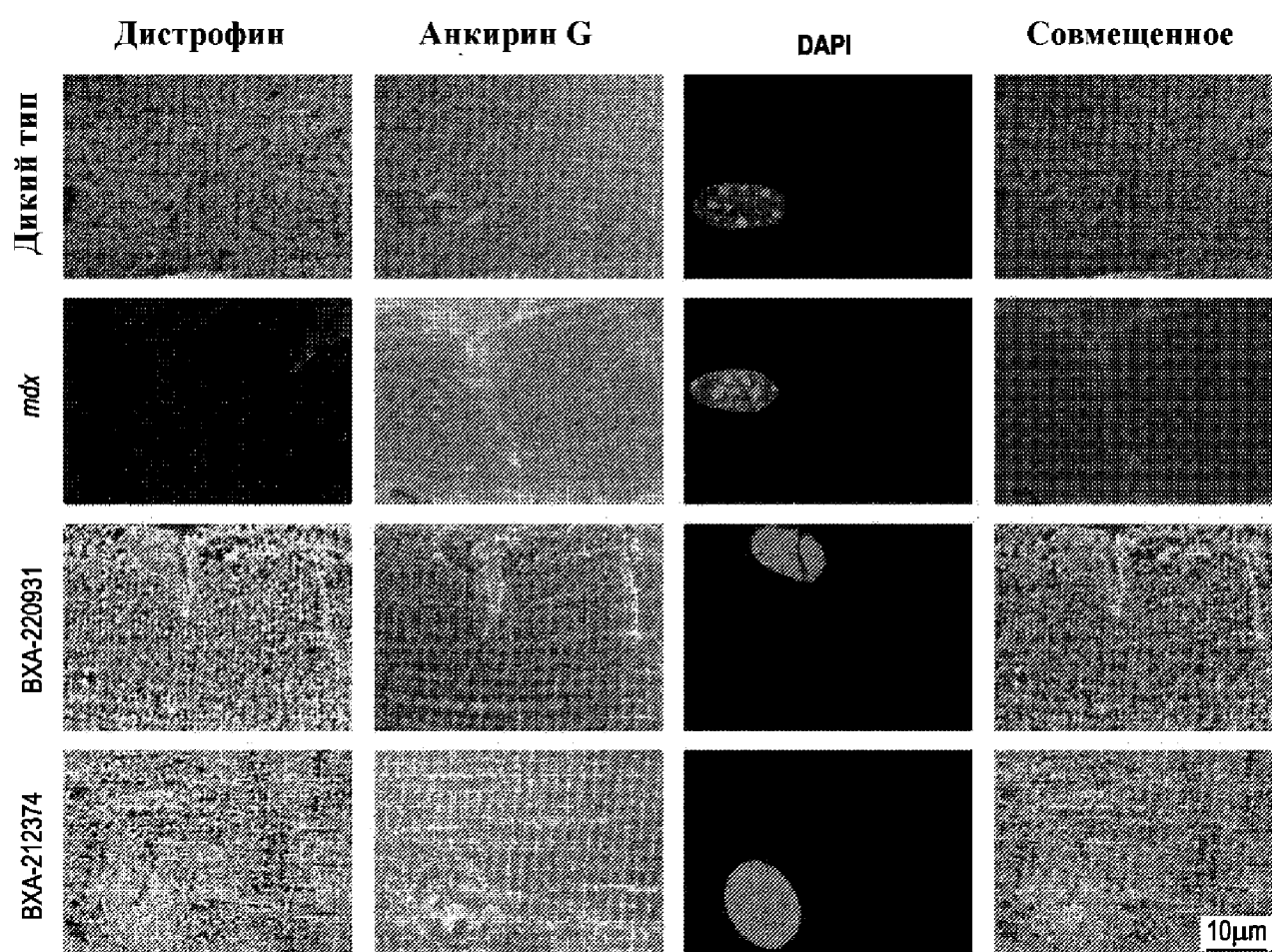
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг.20

