

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202390260 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.03.07

(22) Дата подачи заявки  
2021.07.06

(51) Int. Cl. C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 15/12 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01)  
C07K 14/47 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01)  
A61P 9/00 (2006.01)  
A61P 21/00 (2006.01)

(54) ВЕКТОР АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ОТКРЫТОЙ РАМКИ  
СЧИТЫВАНИЯ DWORF

(31) 63/048,743

(32) 2020.07.07

(33) US

(86) PCT/US2021/040428

(87) WO 2022/010834 2022.01.13

(71) Заявитель:

ДЗЕ БОРД ОФ РИДЖЕНТС ОФ  
ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС  
СИСТЕМ (US)

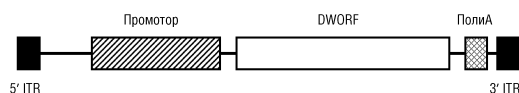
(72) Изобретатель:

Олсон Эрик Н., Бассел-Дуби Ронда С.,  
Нельсон Бенджамин Р., Макаревич  
Кэтрин А. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны способы лечения субъекта, например, страдающего кардиомиопатией или подверженного риску кардиомиопатии, эффективным количеством вириона рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), где вирион rAAV содержит капсид AAV и экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид DWORF, оперативно связанный с промотором. Также описаны композиции и наборы, относящиеся к ним.



202390260

A1

A1

202390260

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-576948EA/026

### **ВЕКТОР АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ОТКРЫТОЙ РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ DWARF**

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[001] По данной заявке испрашивается приоритета предварительной заявки США № 63/048743, поданной 7 июля 2020 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### **ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ФЕДЕРАЛЬНО ФИНАНСИРУЕМЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТОК**

[002] Это изобретение было сделано при государственной поддержке в соответствии с HL141630, HL130253, HL138426, HD087351 и AR067294 Национальных институтов здравоохранения (NIH). Государство имеет определенные права на изобретение.

#### **ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

[003] Заявка подается в электронном виде через EFS-Web и включает представленный в электронном виде список последовательностей в формате.txt. Файл.txt содержит список последовательностей под названием «UTFDP3586WO\_ST25.txt», созданный 24 июня 2021 года и имеющий размер 17 килобайт. Список последовательностей, содержащийся в этом файле.txt, является частью описания и полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

#### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[004] Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения или предупреждения у субъекта заболеваний сердца (например, кардиомиопатии). В частности, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему промотор, специфичный для сердца, связанный с терапевтическим генным продуктом, для лечения заболеваний сердца (например, кардиомиопатии).

#### **ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[005] Кардиомиопатия является причиной примерно половины смертей, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. По оценкам, от 1 из 250 до 1 из 10000 взрослых страдают той или иной формой кардиомиопатии (McKenna *et al. Circ Res.* 121:722-730 (2017)). Несмотря на значительные усилия по скринингу, диагностике и терапевтическим стратегиям, распространенность кардиомиопатий и частота смертей, связанных с кардиомиопатией, остаются высокими (Brieler *Am Fam Physician.* 96:640-646 (2017)).

[006] Кардиомиопатия относится к совокупности состояний сердца, которые возникают, когда его способность перекачивать кровь снижается. Снижение нормального функционирования, такое как сократительная дисфункция сердечной мышцы, может привести к инфаркту миокарда, сердечной недостаточности, образованию тромбов, проблемам с клапанами и к остановке сердца. Кардиомиопатии можно разделить на первичные и вторичные категории, что приводит к различным фенотипам (McKenna *et al. Circ Res.* 121:722-730 (2017)). Первичные кардиомиопатии могут быть генетическими,

приобретенными или смешанной этиологии. Генетические кардиомиопатии наследуются и включают аритмогенную дисплазию правого желудочка, гипертрофию, нарушения ионных каналов, уплотнение левого желудочка и митохондриальные миопатии. Приобретенные кардиомиопатии обусловлены, прежде всего, не вторичными, не генетическими причинами, которые приводят к сердечным осложнениям и включают миокардит, послеродовой период, кардиомиопатию, индуцированную тахикардией, и кардиомиопатию, индуцированную стрессом. Кардиомиопатии смешанной этиологии обусловлены комбинацией негенетических и генетических факторов и включают дилатационную кардиомиопатию и рестриктивную кардиомиопатию. Вторичные кардиомиопатии относятся к заболеваниям сердца, возникающим в результате экстракардиоваскулярной причины. Основные причины вторичных кардиомиопатий могут быть эндокринными, инфекциями, воздействием токсинов, аутоиммунными, алиментарными и/или нервно-мышечными.

**[007]** Кардиомиоциты играют центральную роль в патологии кардиомиопатии. Кардиомиоциты, также называемые клетками сердечной мышцы, сердечными миоцитами или миокардиоцитами, представляют собой сердечные клетки, составляющие сердечную мышцу и отвечающие за сократительную функцию, которая позволяет сердцу действовать как насос. Существует множество механизмов, снижающих способность кардиомиоцитов нормально функционировать (Dadson *et al. Clin Sci (Lond)* 131:1375-1392 (2017)). При аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка прогрессирующее замещение кардиомиоцитов фиброзной тканью приводит к электрической изоляции кардиомиоцитов и атрофии миокарда желудочков, основной структуры, отвечающей за сократительную функцию сердца. При митохондриальной кардиомиопатии дефицит продукции АТФ оказывает прямое влияние на сократительную функцию кардиомиоцитов, которые имеют высокие метаболические потребности. Кардиомиопатии также возникают в результате аномальной сократительной функции в результате потери нормальных процессов высвобождения, захвата и секвестрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из-за потери активности регуляторных ферментов, таких как сарко/эндоплазматический ретикулум кальций-АТФаза (SERCA) (Lennon *et al. Int J Mol Med.* 7:131-41 (2001)).

**[008]** Необходимы стратегии лечения кардиомиопатии. Эффективным подходом является нацеливание на механизм, контролирующий аномальную сократительную функцию в сердечных клетках.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[009]** В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения сердечной недостаточности у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение эффективного количества вириона рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), где вирион rAAV содержит капсид AAV и экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид открытой рамки считывания DWarf (DWORF), функционально связанный с промотором.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект страдает кардиомиопатией или подвержен риску ее развития. В одном варианте осуществления изобретения кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию (DCM). В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект страдает инфарктом миокарда или подвержен риску его развития. В одном варианте осуществления изобретения инфаркт миокарда представляет собой хронический инфаркт миокарда. В одном варианте осуществления изобретения инфаркт миокарда представляет собой острый инфаркт миокарда

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления изобретения вирион гAAV вводят внутривенной или внутрикороной инъекцией. В некоторых вариантах осуществления изобретения гAAV трансдуцирует сердечные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения гAAV трансдуцирует кардиомиоциты.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления изобретения трансдукция гAAV увеличивает экспрессию полипептида DWORF в сердце субъекта

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления изобретения трансдукция гAAV усиливает активность SERCA.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления изобретения вирион гAAV представляет собой вирион гAAV серотипа AAV9. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAV содержит капсидный белок, который по меньшей мере на 98% идентичен SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAV содержит капсидный белок, по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAV содержит капсидный белок, содержащий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор представляет собой промотор куриного сердечного тропонина-T (cTnT). В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор куриного cTnT содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор куриного cTnT содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор куриного cTnT содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF представляет собой мышинный полипептид DWORF. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF содержит

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления изобретения ITR представляют собой AAV2 ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения ITR содержат полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект испытывает улучшение симптомов, связанных с MCD, после введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения улучшенные симптомы представляют собой один или несколько из следующих симптомов: усиленная сократимость; снижение утомляемости; уменьшение одышки; уменьшение отеков; уменьшение боли в груди; снижение аритмии; снижение сгустков крови; улучшение функции сердечного клапана; и уменьшение шума в сердце.

**[0019]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), где вирион rAAV содержит капсид AAV и экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид DWORF, функционально связанный с промотором и фармацевтически приемлемый носитель.

**[0020]** В одном варианте осуществления изобретения вирион rAAV представляет собой вирион rAAV серотипа AAV9. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAV содержит капсидный белок, который по меньшей мере на 98% идентичен SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAV содержит капсидный белок, по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAV содержит капсидный белок, содержащий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор представляет собой промотор сердечного тропонина-Т (сTnT). В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор сердечного тропонина-Т (сTnT) содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор сердечного тропонина-Т (сTnT) содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор сердечного тропонина-Т (сTnT) содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF представляет собой полипептид DWORF. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид

DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления изобретения ITR представляют собой AAV2 ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения ITR содержат полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

**[0024]** В другом аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) в соответствии с любым из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит около  $5 \times 10^{13}$  вирионов.

**[0025]** В другом аспекте в настоящем изобретении предложен набор, включающий контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе.

**[0026]** Дополнительные аспекты и варианты осуществления изобретения будут очевидны из следующего далее подробного описания.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**[0027]** Следующие чертежи составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации некоторых аспектов настоящего изобретения. Изобретение можно лучше понять, обратившись к одному или нескольким из этих чертежей в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

**[0028]** На ФИГ. 1 показано графическое изображение примера варианта осуществления экспрессионной кассеты, содержащей полинуклеотид, кодирующий промотор cTnT, и полипептид DWORF, фланкированный инвертированными концевыми повторами AAV.

**[0029]** На ФИГ. 2А показан вестерн-блот анализ лизатов тканей мышей, получавших AAV-tdTomato или AAV-DWORF, через 4 недели после доставки AAV. Экспрессию tdTomato оценивали с использованием антитела к красному флуоресцентному белку (RFP). Квад., квадрицепс; GP, подошвенная икроножная мышца.

**[0030]** На ФИГ. 2В показан эхокардиографический анализ сердечной функции и размеров у 8-недельных мышей. Внутренний диаметр левого желудочка (LVID) измеряли во время систолы (s) и диастолы (d). Данные выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение для мышей n=8-12. Р-значение \*\*p<0,01 или \*\*\*p<0,005 по сравнению с MLP KO/AAV-tdTomato.

**[0031]** На ФИГ. 2C показано репрезентативное окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) гистологических срезов мышей с указанными генотипами и обработками.

**[0032]** На ФИГ. 2D показан вестерн-блоттинг лизатов сердца ложных мышей или мышей с MI, получавших лечение AAV-tdTomato или AAV-DWOLF через 12 недель после операции.

**[0033]** На ФИГ. 2E показаны функция и размеры сердца, оцененные с помощью эхокардиографии в начале исследования (0 недель) и через 1, 2, 4, 8 и 12 недель после ложного хирургического вмешательства или операции по поводу MI. Данные выражены как среднее±стандартное отклонение для n=4 ложных мышей или n=6-8 мышей с MI. Значение  $P$  \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  или \*\*\* $p<0,005$  по сравнению с MI/AAV-tdTomato.

**[0034]** На ФИГ. 2F показано окрашивание трихромом по Массону на серийных срезах сердца мышей через 12 недель после имитационных процедур или процедур MI. Мышей лечили AAV-tdTomato или AAV-DWOLF, как указано. Срезы брали с шагом 0,5 мкм.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **ОБЗОР**

**[0035]** Аномальное обращение с кальцием является универсальной характеристикой кардиомиопатии, и сниженная активность кальциевой АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA) играет центральную роль как в инициации, так и в прогрессировании заболевания. SERCA представляет собой кальциевый насос, который способствует поглощению, поддержанию и круговороту ионов  $Ca^{2+}$  в сердечных клетках, таких как кардиомиоциты. Активность SERCA регулируется ингибирующим пептидом фосфоламбаном. Существует значительный интерес к увеличению активности SERCA за счет увеличения количества полипептида, называемого открытой рамкой считывания DWarf (DWOLF), который усиливает активность SERCA за счет прямого замещения ингибирующего SERCA пептида фосфоламбана. Взаимодействие SERCA с DWOLF является стратегией повышения активности SERCA в клетке.

**[0036]** В настоящем изобретении предложены вирионы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид DWOLF или его функциональный вариант, и способы их применения. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирионы rAAV, описанные в настоящем документе, могут, например, трансдуцировать сердечные клетки с помощью полинуклеотида с последовательностью, кодирующей полипептид DWOLF, функционально связанной со специфичной для сердечной клетки промоторной областью, в геном клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-мишени сердца экспрессируют полипептид DWOLF и могут иметь повышенную активность SERCA. В описании также представлены фармацевтические композиции, содержащие описанные в настоящем документе вирионы rAAV. В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения субъекта с диагнозом кардиомиопатии или с

риском развития кардиомиопатии с использованием вирионов rAAV и фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

### **ЭКСПРЕССИОННАЯ КАССЕТА**

**[0037]** Вирионы rAAV по изобретению могут содержать экспрессионную кассету (ФИГ. 1). Экспрессионная кассета может содержать полинуклеотид, кодирующий полипептид DWORF, или его функциональный вариант, необязательно, функционально связанный с промотором, необязательно, сигналом полиаденилирования и, необязательно, сигналом терминации транскрипции. Экспрессионная кассета может быть фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR). Эти компоненты обеспечивают функцию экспрессии трансгена после того, как клетка-хозяин становится мишенью для вириона rAAV. Промоторная последовательность, если она присутствует, контролирует экспрессию полинуклеотида, кодирующего полипептид DWORF или его функциональный вариант. Промотор может быть специфичным для типа клеток. Конститутивные промоторы используются в экспрессионных кассетах и могут представлять собой, например, энхансер цитомегаловируса, слитый с промотором  $\beta$ -актина цыпленка (CAG), промотором обезьяньего вируса 40 (SV40) и промотором тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) (Damdindorj *et al. PLoS One*. 9:e106472 (2014)). Также можно использовать промоторы, специфичные для клеточного типа. Промоторами, специфичными для клеток сердца, могут быть, например, промотор MLC2v (Phillips *et al. Hypertension* 39:651-5 (2002)) и промотор сердечного тропонина-T (cTnT) (Konkalmatt *et al. Circ Cardiovasc Imaging*. 6:478-486 (2013)). Трансгенная полинуклеотидная последовательность в экспрессионной кассете может представлять собой, например, открытую рамку считывания, кодирующую белок. ITR в экспрессионной кассете служат маркерами, используемыми для вирусной упаковки экспрессионной кассеты (Clark *et al. Hum Gene Ther*. 6:1329-41 (1995)).

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 16.

**Таблица 1. Последовательность экспрессионной кассеты**

| Экспрессионная кассета                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGA<br>CCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA<br>ACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCT<br>ACCAGGGTAATGGGGATCCTCTAGAACTATAGCTAGAATTCGCCCTTACGGGGCCC<br>CCCCTCGAGGTCGGGATAAAAGCAGTCTGGGCTTTCACATGACAGCATCTGGGGC<br>TGCGGCAGAGGGTCGGGTCCGAAGCGCTGCCTTATCAGCGTCCCCAGCCCTGGGA<br>GGTGACAGCTGGCTGGCTTGTGTCAGCCCCTCGGGCACTCACGTATCTCCGTCCGA<br>CGGGTTTAAATAGCAAACTCTGAGGCCACACAATAGCTTGGGCTTATATGGGC<br>TCCTGTGGGGGAAGGGGGAGCACGGAGGGGGCCGGGGCCGCTGCTGCCAAAATA<br>GCAGCTCACAAGTGTTGCATTCCTCTCTGGGCGCCGGGCACATTCCTGCTGGCTCT |

```

GCCCCGCCCCGGGGTGGGCGCCGGGGGGACCTTAAAGCCTCTGCCCCCAAGGAGC
CCTTCCCAGACAGCCGCCGGCACCCACCGCTCCGTGGGACGATCCCCGAAGCTCT
AGAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCT
GACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGG
TAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTC
GAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCC
ACTTTGCCTTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCT
AGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCCGCCACCATGGCTGAGAAAGAGT
CAACATCACCACACCTCATGGTTCCCATTTCTTCTCCTGGTTGGATGGATTGTAGGC
TGCATCATCGTTATTTACATTGTCTTCTTCTAACGGCCGCGCGGATCCAGACATGA
TAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAAATG
CTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAA
TAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAG
GTGTGGGAGGTTTTTTTAGTCGACCCGGGCGGCCTCGAGGACGGGGTGAACCTACGC
CTGAGGATCCGATCTTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCC
TTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGT
TGGAATTTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGCAATTCGTTGATCTGAATTTGACCAC
CCATAATACCCATTACCCTGGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACCTA
CAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA
CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID NO: 16)

```

**[0039]** В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета по настоящему изобретению содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид DWORF. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета обеспечивает повышенную экспрессию полипептида DWORF в сердечной клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка сердца представляет собой кардиомиоцит. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия полипептида DWORF может быть увеличена на 5%, 10%, 15%, 20% или 25% по сравнению с экспрессией полипептидного фактора DWORF у субъекта, не получавшего лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия полипептида DWORF может быть увеличена в 1-раз, 2-раза, 3-раза, 4-раза или 5-раз по сравнению с экспрессией полипептида DWORF у субъекта, не получавшего лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF может экспрессироваться на любом определяемом уровне в сердечной клетке, тогда как полипептид DWORF может не экспрессироваться или экспрессироваться на неопределяемом уровне у субъекта, не получавшего лечения. Иными словами, сердечная клетка, в которую вводят вирион gAAV,

может экспрессировать полипептид DWORF в большем количестве, чем клетка сердца, имеющая только эндогенную (то есть нативную) экспрессию полипептида DWORF.

**[0040]** Полипептид DWORF представляет собой эндогенный усилитель активности кальциевой помпы SERCA, желательной лекарственной мишени для регуляции сердечной сократимости. DWORF также является необычно маленьким белком, что делает его хорошим кандидатом для доставки в клетку или ткань-мишень с помощью вирионов rAAV. Поскольку DWORF является эндогенным белком, экспрессия DWORF у людей не будет иммуногенной, что позволяет проводить дозирование и экспрессию в течение длительного времени. Структурные особенности полипептидов DWORF следующие. Во-первых, полипептиды могут иметь от 5 до 35 последовательных остатков открытой рамки считывания DWarf (DWORF), расположенной на хромосоме 3 видов млекопитающих, включая мышь и человека (Nelson *et al. Science*. 351: 271-275 (2016); патент США № 10570183). Таким образом, термин «пептид, имеющий не более X последовательных остатков», даже при включении термина «содержащий», нельзя понимать как содержащий большее количество последовательных остатков. Как правило, пептиды будут состоять из 35 остатков или менее, опять же, включая не более 20 последовательных остатков DWORF. Общая длина может 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 остатков. Рассматриваются диапазоны длин пептида 5-34/35 остатков, 6-34/35 остатков, 7-50 остатков, 7-25, остатков, 5-20 остатков, 6-20 остатков, 7-20 остатков и 7-15 остатков. Количество последовательных остатков DWORF может составлять 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. Рассматриваются диапазоны последовательных остатков в 5-20 остатков, 5-20 остатков, 6-20 остатков, 7-20 остатков и 5-15 остатков, 5-15, остатков, 6-15 остатков или 7-15 остатков.

**[0041]** В некоторых вариантах осуществления изобретения Полипептид DWORF представляет собой полипептид DWORF человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.

**Таблица 2: Последовательности DWORF**

| Вариант | Полипептид DWORF                                   | Нуклеотид (открытая рамка считывания)                                                                                           |
|---------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1       | MAEKESTSPHLMVPILLV<br>GWIVGCIIYIVFF (SEQ ID NO: 1) | Atggtgagaaagagtcaacatcaccacacctcatggttcccat<br>tcttctcctgggtggatggattgtaggctgcatcatcggtatttacat<br>tgtcttcttctaa (SEQ ID NO: 2) |

|   |                                                         |                                                                                                                                      |
|---|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 | MAEKAGSTFSHLLVPILLI<br>GWIVGCIIMYVFFS (SEQ<br>ID NO: 3) | Atggctgaaaaagcgggtctacattttcacaccttctgttctt<br>attcttctctgattggctggattgtgggctgcatcataatgattat<br>gttgcttctcttag (SEQ ID NO: 4)       |
| 3 | MAEKAESTSPHLMVPILL<br>VGWIVGCIIVYVFF (SEQ<br>ID NO: 5)  | Atggctgagaaagcagagtcaacatcaccacacctcatgttcc<br>ccattcttctctgttggtgatggattgtaggctgcatcatcggtattt<br>acattgtcttctctaa (SEQ ID NO: 6)   |
| 4 | MAEKESTSPHLIVPILLVG<br>WIVGCIIVYVFF (SEQ ID<br>NO: 7)   | Atggctgagaaagagtcaacatcaccacacctcattgttccatt<br>cttctctgttggtgatggattgtaggctgcatcatcggtattttacatt<br>gtcttctctaa (SEQ ID NO: 8)      |
| 5 | MAEKAESTSPHLIVPILLV<br>GWIVGCIIVYVFF (SEQ ID<br>NO: 9)  | Atggctgagaaagcagagtcaacatcaccacacctcattgttcc<br>cattcttctctgttggtgatggattgtaggctgcatcatcggtatttta<br>cattgtcttctctaa (SEQ ID NO: 10) |

**[0042]** В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета по изобретению содержит промотор. Термин «промотор», как используется в настоящем документе, относится к последовательности ДНК, которая направляет связывание РНК-полимеразы и тем самым способствует синтезу РНК, то есть минимальной последовательности, достаточной для управления транскрипцией. Промоторы и экспрессия соответствующих белков или полипептидов могут быть повсеместными, что означает высокую активность в широком диапазоне клеток, тканей и видов или специфичность к типу клеток, специфичность к ткани или видоспецифичность. Промоторы могут быть «конститутивными», то есть постоянно активными, или «индуцируемыми», что означает, что промоторы могут быть активированы или деактивированы в присутствии или отсутствии биотических или абиотических факторов. Также в конструкции нуклеиновых кислот или векторы по изобретению включены энхансерные последовательности, которые могут быть или не быть смежными с промоторной последовательностью. Энхансерные последовательности влияют на промотор-зависимую экспрессию генов и могут быть расположены в 5'- или 3'-областях нативного гена.

**[0043]** Можно использовать различные промоторы. Преимущественно, промотор, необязательно в сочетании с энхансером, экспрессирует полинуклеотид, кодирующий полипептид DWORF или его функциональный вариант, в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета содержит специфичный для клеточного типа промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор специфически способствует экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид DWORF или его функциональный вариант, в сердечной клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор специфически способствует экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид DWORF или его функциональный вариант, в кардиомиоците.

**[0044]** В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор представляет собой промотор куриного сердечного тропонина-Т (сТнТ). В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор куриного сТнТ содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична промотор куриного сТнТ (SEQ ID NO: 11).

**Таблица 3. Последовательность промотор куриного сТнТ**

| Промотор куриного сТнТ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GGGATAAAAGCAGTCTGGGCTTTCACATGACAGCATCTGGGGCTGCGGCAGAGGG<br>TCGGGTCCGAAGCGCTGCCTTATCAGCGTCCCCAGCCCTGGGAGGTGACAGCTGG<br>CTGGCTTGTGTCAGCCCCTCGGGCACTCACGTATCTCCGTCCGACGGGTTTAAAT<br>AGCAAACTCTGAGGCCACACAATAGCTTGGGCTTATATGGGCTCCTGTGGGGGA<br>AGGGGGAGCACGGAGGGGGCCGGGGCCGCTGCTGCCAAAATAGCAGCTCACAAG<br>TGTTGCATTCTCTCTGGGCGCCGGGCACATTCCTGCTGGCTCTGCCCGCCCCGGG<br>GTGGGCGCCGGGGGGACCTTAAAGCCTCTGCCCCCAAGGAGCCCTTCCCAGACA<br>GCCGCCGGCACCCACCGCTCCGTGGGA (SEQ ID NO: 11) |

**[0045]** В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета фланкирована инвертированными концевыми AAV2 (ITR). В некоторых вариантах осуществления изобретения ITR содержат полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 12 и/или SEQ ID NO: 13.

**Таблица 4: Последовательности ITR**

| Последовательности ITR AAV2                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGA<br>CCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA<br>ACTCCATCACTAGGGGTTCC (SEQ ID NO: 12) |
| GGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG<br>AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT<br>GAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID NO: 13) |

**[0046]** В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионная кассета содержит сигнал полиаденилирования (поли(A)). В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнал поли(A) содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 17.

**Таблица 5. Последовательность полиаденилирования**

| Последовательность полиаденилирования                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAAATGC<br>AGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACC<br>ATTATAAGCTGCAATAACAAGT (SEQ ID NO: 17) |

### РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРИОН AAV

**[0047]** В некоторых аспектах изобретения вирион гAAV используется для доставки экспрессионных кассет, описанных в настоящем документе, в клетки сердца субъекта, например, для лечения кардиомиопатии. Соответственно, в описании предложен вирион гAAV, где вирион гAAV содержит капсид AAV и экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид DWORF, функционально связанный с промотором и фармацевтически приемлемый носитель.

**[0048]** Вирионы гAAV по изобретению содержат капсидный белок. Капсидные белки представляют собой структурные белки, которые составляют собранную икосаэдрическую упаковку вириона гAAV, содержащего экспрессионную кассету. Капсидные белки классифицируются по серотипу. Капсидные серотипы дикого типа в вирионах гAAV могут быть, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 или AAV12 (Naso *et al. BioDrugs* 31:317-334 (2017)). Типы сконструированных капсидов включают химерные капсиды и мозаичные капсиды (Choi *et al. Curr Gene Ther.* 5: 299-310 (2005)). Капсиды выбирают для вирионов гAAV на основании их способности трансдуцировать определенные типы тканей или клеток (Liu *et al. Curr Pharm Des.* 21:3248-56 (2015)).

**[0049]** Можно использовать любой капсидный белок, который может способствовать трансдукции вириона гAAV в клетки сердца для доставки трансгена, как описано в настоящем документе. Капсидные белки, используемые в вирионах гAAV для доставки трансгена в клетки сердца, что приводит к высокой экспрессии, включают AAV4, AAV6, AAV7, AAV8 и AAV9 (Zincarelli *et al. Mol. Ther.* 16:P1073-1080 (2008)).

**[0050]** В некоторых вариантах осуществления изобретения вирион гAAV представляет собой вирион гAAV серотипа AAV9. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAV содержит капсидный белок, который по меньшей мере на 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичен SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий капсид AAV, по меньшей мере на 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичен SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсид AAV содержит капсидный белок, содержащий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

**Таблица 6. Последовательности капсида AAV**

|      | Белок                                                                                                                                                                       | Нуклеотид (открытая рамка считывания)                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAV9 | MAADGYLPDWLEDNLSEGIRE<br>WWALKPGAPQPKANQQHQDN<br>ARGLVLPGYKYLGPNGLDKG<br>EPVNAADAAALEHDKAYDQQL<br>KAGDNPYLKYNHADADEFQERL<br>KEDTSFGGNLGRAVFQAKKRL<br>EPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQ | atggctgccgatggttatcttcagattggctcgaggacaacctt<br>agtgaaggaattcgcgagtgggtgggctttgaaacctggagccc<br>ctcaaccaaggcaaatcaacaacatcaagacaacgctcgag<br>gtcttgtcttcgggttacaataacctggacccggcaacgga<br>ctcgacaagggggagccggtcaacgcagcagacgcgccgg<br>ccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaggcc<br>ggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgcccagccga |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>SPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKR<br/> LNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPA<br/> APSGVGSALTMASSGGAPVADN<br/> NEGADGVGSSSGNWHCDSQWL<br/> GDRVITTSTRTWALPTYNNHLY<br/> KQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP<br/> WGYFDNFNRHFHCHFSRQDWRLI<br/> NNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKE<br/> VTDNNGVKTIANNLSTTVQVFT<br/> DSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFP<br/> ADVFMIPQYGYLTLNDGSQAV<br/> GRSSFYCLEYFPSQMLRTGNF<br/> QFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDR<br/> LMNPLIDQYLYLSKTINGSGQ<br/> NQQLTKFSVAGPSNMAVQGRN<br/> YIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNS<br/> EFAWPGASSWALNGRNSLMNP<br/> GPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIF<br/> GKQGTGRDNVDADKVMITNEE<br/> EIKTTNPVATESYGQVATNHQS<br/> AQAQAQTGWVQNQGILPGMV<br/> WQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG<br/> NFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIK<br/> NTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQ<br/> YSTGQVSVEIEWELQKENSQRW<br/> NPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNT<br/> EGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ<br/> ID NO: 14)</p> | <p>gttcaggagcggctcaaagaagatacgtcttttgggggcaac<br/> ctcgggcgagcagctctccaggccaaaagaggcttctgaac<br/> ctcttggtctggttaggaagcggctaagacggctcctggaaa<br/> gaagaggcctgtagagcagctcctcaggaaccggactcctc<br/> cgcggtattggcaaatcgggtgcacagcccgtaaaaagag<br/> actcaatttcggtcagactggcgacacagagtcagtcacagac<br/> cctcaaccaatcggagaacctcccgagccccctcaggtgtg<br/> ggatctcttacaatggcttcaggtggtggcgaccagtggcag<br/> acaataacgaaggtgccgatggagtggttagttcctcgggaa<br/> attggcattgcgattccaatggctgggggacagagtcacac<br/> caccagcaccgaacctggggcctgccacactacaacaatca<br/> cctctacaagcaaatctcaacagcacatctggaggatcttaa<br/> atgacaacgcctacttcggctacagcaccctgggggtatttt<br/> gacttcaacagattccactgccacttctcaccacgtgactggca<br/> gcgactcatcaacaacaactggggattccggcctaagcgactc<br/> aactcaagctcttcaacattcaggtcaaagaggttacggacaa<br/> caatggagtcaagaccatcgccaataacctaccagcacggtc<br/> caggtcttcacggactcagactatcagctcccgtagctgctcgg<br/> gtcgggtcacgagggtgcctcccgccgtccagcggacgt<br/> tttcatgattcctcagtagcgggtatctgacgcttaatatggaag<br/> ccaggccgtgggtcgttcgtctttactgcctggaatattccc<br/> gtcgcaaatgctaagaacgggtaacaacttcagttcagctac<br/> gagtttgagaacgtacctttccatagcagctacgctcacagcca<br/> aagcctggaccgactaatgaatccactcatcgaccaatactgt<br/> actatctctcaaagactattaacggttctggacagaatcaaaaa<br/> cgctaaaattcagtggtggccggaccagcaacatggctgtcca<br/> gggaagaaactacatacctggaccagctaccgacaacaacg<br/> tgtctcaaccactgtgactcaaaacaacaacagcgaatttgctt<br/> ggcctggagcttcttctgggtctcaatggacgtaatagcttga<br/> tgaatcctggacctgctatggccagccacaaagaaggagagg<br/> accgtttcttcttctgtctggatctttaattttggcaacaaggaa<br/> ctggaagagacaacgtggatgcggacaaagtcatgataacca<br/> acgaagaagaaattaaaactactaaccggtagcaacggagt<br/> cctatggacaagtggccacaaaccaccagagtgcccaagcac<br/> aggcgacagaccggctgggttcaaaaccaaggaatacttccgg</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | gtatggttggcaggacagagatgtgtacctgcaaggaccatt<br>tgggccaaaattcctcacacggacggcaacttcacccttctcc<br>gctgatgggagggttggaatgaagcaccgcctcctcagatc<br>ctcatcaaaaacacacctgtacctgcggatcctccaacggcctt<br>caacaaggacaagctgaactcttcatcaccagttattctactg<br>gccaaagtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaa<br>aacagcaagcgtggaacccggagatccagtacacttccaac<br>tattacaagtctaataatgttgaattgctgttaatactgaagggt<br>atatagtgaaccccgcccccattggcaccagatacctgactcgta<br>atctgt (SEQ ID NO: 15) |
|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**[0051]** В некоторых вариантах осуществления изобретения гAAV является дефектным по репликации, поскольку вирион гAAV не может независимо далее реплицироваться и упаковывать свой геном. Например, когда клетка сердца подвергается воздействию вирионов гAAV, полипептид DWORF экспрессируется в клетке-мишени, однако из-за того, что в клетке-мишени отсутствуют гены гер и сар AAV, а также гены дополнительных функций, гAAV не способен реплицироваться.

**[0052]** В некоторых вариантах осуществления изобретения вирионы гAAV по настоящему изобретению, инкапсулирующие экспрессионные кассеты, описанные в настоящем документе, могут быть получены с использованием бесхелперной продукции. гAAV являются вирусами с дефицитом репликации и обычно требуют компонентов живого вспомогательного вируса, такого как аденовирус, в клетке-хозяине для упаковки инфекционных вирионов гAAV. Системы производства без хелперов гAAV позволяют получать инфекционные вирионы гAAV без использования живого хелперного вируса. В бесхелперной системе упаковочная клеточная линия хозяина котрансфицируется тремя плазмидами. Первая плазмида может содержать продукты генов аденовируса (например, гены E2A, E4 и РНК VA), необходимые для упаковки вирионов гAAV. Вторая плазмида может содержать необходимые гены AAV (например, гены REP и CAP). Третья плазмида содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую интересующий белок, и промотор, фланкированный ITR. Линия пакующих клеток-хозяев может представлять собой, например, клетки-хозяева AAV-293. Подходящие клетки-хозяева содержат дополнительные компоненты, необходимые для упаковки инфекционных вирионов гAAV, которые не поставляются плазмидами. В некоторых вариантах осуществления изобретения гены CAP могут кодировать, например, капсидные белки AAV, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор представляет собой промоторную последовательность, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения промоторная последовательность представляет собой промоторную последовательность сTnT. В некоторых вариантах осуществления изобретения интересующий полипептид представляет собой полипептид DWORF.

## СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

**[0053]** В одном аспекте вирионы гAAV можно использовать для лечения заболевания (Wang *et al. Nat Rev Drug Discov.* 18:358-378 (2019)). Вирионы гAAV могут доставлять трансгены в клетки субъекта, которые, в свою очередь, экспрессируются в клетке. Трансген, доставляемый вирионом гAAV, может быть включен в геном клетки-мишени, обеспечивая потенциальную долгосрочную экспрессию продукта трансгена. По сравнению с другими системами доставки вирусных трансгенов, такими как аденовирусы, вирионы гAAV обладают преимуществом низкой иммуногенности. Вирионы гAAV можно использовать для трансдукции и доставки трансгенов во многие типы клеток, включая клетки глаза, крови, печени, сердца, тканей суставов, мышц, головного мозга, почек или легких (патент США № 10308957; патент США № 9803218). Вирионы гAAV могут содержать геномы до примерно 5,2 килобаз (kb), что ограничивает размер полинуклеотида, который может быть интегрирован в клетку-хозяин, примерно до 4,4 kb (Choi *et al. Mol Brain.* 7:1 (2014)). Для лечения вирионы гAAV использовались для доставки трансгенов, кодирующих полипептиды, такие как микродистрофин (Chamberlain *et al. Mol Ther.* 25:1125-1131 (2017)), нейротрофический фактор линии глиальных клеток (McFarthing *et al. J Parkinsons Dis.* 9:251-264 (2019)) и фактор IX (Nathwani *et al. N Engl J Med.* 371:1994-2004 (2014)).

**[0054]** Различные стратегии лечения сердечной недостаточности с использованием доставки трансгена на основе гAAV применялись *in vivo*. В модели сердечной недостаточности на свинье  $\beta$ -адренорецептор, регулятор сократительной способности, подвергался действию небольшого полипептида  $\beta$ ARKct, который косвенно предотвращает нарушение передачи сигналов  $\beta$ -адренорецептора (Raake *et al. Eur Heart J.* 34:1437-47 (2013)). В собачьей модели жизнеспособность кардиомиоцитов повышалась за счет доставки изоформы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) на основе гAAV. В клинических испытаниях на людях доставка изоформы кальциевой помпы SERCA, SERCA2a, на основе гAAV в сердце тестировалась в качестве лечения сердечной недостаточности. SERCA, или  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума, или SR  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза, представляет собой Р-АТФазу кальциевого АТФазы. SERCA находится в саркоплазматическом ретикулуме (SR) внутри мышечных клеток. Это  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза, которая переносит  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля клетки в просвет СР за счет гидролиза АТФ при мышечной релаксации. Активность SERCA необходима для правильной сократительной функции сердца. Однако прямая замена активности SERCA доставкой изоформы SERCA2a на основе гAAV не показала значительного эффекта в клинических испытаниях (Bass-Stringer *et al. Heart, Lung and Circulation.* 27:1285-1300 (2018)). Повышение активности SERCA с использованием альтернативных стратегий желательно для лечения заболеваний сердца, например, сердечной недостаточности и кардиомиопатии.

**[0055]** На цитоплазматической поверхности SERCA имеется 3 основных домена: домены фосфорилирования и связывания нуклеотидов, которые образуют каталитический сайт, и активаторный домен, который участвует в передаче основных конформационных

изменений. Скорость, с которой SERCA перемещает  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану SR, может контролироваться регуляторным белком фосфоламбаном (PLB/PLN). SERCA обычно ингибируется PLB, с которым он тесно связан. Повышенная  $\beta$ -адренергическая стимуляция снижает связь между SERCA и PLB за счет фосфорилирования PLB с помощью PKA. Когда PLB связан с SERCA, скорость движения  $\text{Ca}^{2+}$  снижается; при диссоциации PLB движение  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивается.

**[0056]** Альтернативной стратегией усиления активности SERCA путем доставки изоформы SERCA2a является усиление активности нативно экспрессируемого SERCA путем замены PLB. Взаимодействие SERCA с полипептидом DWORF, подробно описанное выше, может вытеснять PLB и повышать активность SERCA.

**[0057]** В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения сердечной недостаточности у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение эффективного количества вириона рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), где вирион rAAV содержит капсид AAV и экспрессию кассета, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид DWORF, функционально связанный с промотором.

**[0058]** В способе лечения субъекта, как описано в настоящем документе, «лечение» или «лечение состояния или субъекта, нуждающегося в этом», относится к (1) принятию мер для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты, такие как уменьшение симптомов; (2) предупреждению заболевания, например, предупреждению развития клинических симптомов заболевания у пациента, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не испытывает или не проявляет симптомов заболевания; (3) приостановлению заболевания, например прекращению или уменьшению развития заболевания или его клинических симптомов; (4) облегчению заболевания, например, вызывающего регресс заболевания или его клинических симптомов; или (5) задерживанию прогрессирования заболевания. Для целей описанных в настоящем документе способов полезные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, уменьшение симптомов, связанных с сердечной недостаточностью, кардиомиопатией, дилатационной кардиомиопатией, инфарктом миокарда, острым инфарктом миокарда и хроническим инфарктом миокарда.

**[0059]** Субъекты, нуждающиеся в лечении с использованием композиций и способов по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, субъекта, страдающего сердечной недостаточностью или подверженного риску сердечной недостаточности. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем документе способ может быть использован для лечения, например, кардиомиопатии. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный в настоящем документе способ может быть использован для лечения, например, дилатационной кардиомиопатии. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект страдает кардиомиопатией или подвержен риску ее развития. В одном варианте осуществления изобретения кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию (DCM). В некоторых вариантах

осуществления изобретения субъект страдает от инфаркта миокарда или подвержен риску его возникновения. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфаркт миокарда представляет собой хронический инфаркт миокарда. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфаркт миокарда представляет собой острый инфаркт миокарда.

**[0060]** В некоторых аспектах способы, описанные в настоящем документе, приводят к уменьшению одного или нескольких симптомов заболевания сердца по сравнению с симптомами заболевания сердца до введения вируса гAAV. Заболеваниями сердца по способу являются, но не ограничиваются ими, сердечная недостаточность, кардиомиопатия, дилатационная кардиомиопатия, инфаркт миокарда, хронический инфаркт миокарда и острый инфаркт миокарда. Как используется в настоящем документе, термин «симптомы» включает любой из диагностических критериев или симптомов, связанных с сердечными заболеваниями, описанными в настоящем документе. Тяжесть и изменения симптомов и результатов диагностики определяются медицинским работником, имеющим право проводить оценки и анализировать результаты таких оценок. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения симптомы уменьшаются после введения гAAV и композиций по настоящему изобретению.

**[0061]** Общими симптомами у субъектов с заболеванием сердца или с риском его развития являются утомляемость, одышка, отеки, боль в груди, аритмии, образование тромбов, нарушение функции сердечных клапанов и шумы в сердце. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта наблюдается ослабление симптомов, связанных с сердечными заболеваниями, описанными в настоящем документе, после введения вируса гAAV и композиций по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в настоящем документе, улучшенные симптомы представляют собой один или несколько из следующих симптомов: усиленная сократимость; снижение утомляемости; уменьшение одышки; уменьшение отеков; уменьшение боли в груди; снижение аритмии; снижение сгустков крови; улучшение функции сердечного клапана; и уменьшение шума в сердце.

**[0062]** Оценка сократительной способности сердца может быть использована для оценки острой и хронической формы сердечной недостаточности. Сократительную способность сердца можно контролировать с помощью инвазивного гемодинамического мониторинга, непрерывного мониторинга ЭКГ, центрального венозного давления, функции почек, пульсоксиметрии, мониторинга артериального давления, катетеризации легочной артерии и/или чреспищеводной эхокардиографии (Kuhn C, Werdan K. *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. Munich: Zuckschwerdt; 2001. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6895/>).

**[0063]** Одышку и утомляемость, связанные с сердечным заболеванием, описанным в настоящем документе, можно оценить с помощью опросников. Для оценки субъектов с заболеванием сердца, описанного в настоящем документе, можно использовать, например, модифицированный опросник функционального состояния легких и одышки (PFSDQ-M)<sup>10</sup>

(Huang *et al. Am J Crit Care.* 17:436-442 (2008)) и Миннесотский вопросник о жизни с сердечной недостаточностью (MLHFQ)<sup>11</sup> (Bilbao *et al. Health Qual Life Outcomes.* 14:23 (2016)). Анкеты заполняются самостоятельно и позволяют получить балл, который используется для оценки тяжести симптомов одышки, утомляемости и других симптомов, связанных со здоровьем сердца.

**[0064]** Кардиомиопатию, инфаркт миокарда и функцию сердечного клапана можно оценить с помощью одного или нескольких тестов с физической нагрузкой, электрокардиограммы, эхокардиограммы, рентгенографии грудной клетки, КТ сердца или ангиограммы с катетеризацией сердца, МРТ сердца, определения уровней натрийуретического пептида типа В (BNP) в крови и/или генетического скрининга. Для диагностики конкретных типов кардиомиопатии, инфаркта миокарда или дисфункции сердечных клапанов требуется дальнейшее тестирование.

**[0065]** Дилатационная кардиомиопатия (DCM) представляет собой прогрессирующее заболевание сердечной мышцы, характеризующееся расширением камер и сократительной дисфункцией левого желудочка при отсутствии хронической перегрузки давлением и/или объемом. DCM диагностируется в первую очередь с помощью эхокардиографии.

**[0066]** Эхокардиография с обзором PLAX в 2D/M-режиме используется для измерения нескольких параметров, включая LVIDd/s, IVSd, LVPWd и фракционное укорочение. Эти параметры используются для оценки размера полости левого желудочка, толщины стенки и радиальной функции. Диагностический критерий DCM включает LVIDd/s более 112% (2 SD) с поправкой на возраст и площадь поверхности тела (BSA). Фракционное укорочение менее 25% является критерием диагностики DCM при наличии дилатации желудочка. (Mathew *et al. Echo Res Pract.* 4:G1-G13 (2017)).

**[0067]** Качественная оценка структуры и функции левого и правого желудочка с особым упором на радиальную и продольную функцию и регионарные нарушения движения стенки оценивается с помощью эхокардиографии в апикальной четырехкамерной проекции (A4C) в режиме 2D. Фракция выброса (EF) оценивается бипланым методом Симпсона. EF менее 45% является диагностическим критерием DCM при наличии расширенного желудочка (Mathew *et al. Echo Res Pract.* 4: G1-G13 (2017)).

## **ВВЕДЕНИЕ**

**[0068]** Вирион гAAV и композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, путем системного применения, например, путем внутривенной, внутриартериальной или внутрибрюшинной доставки вектора по аналогии с тем, что было показано на животных моделях (Katz *et al., Gene Ther* 19:659-669 (2012)). В некоторых вариантах осуществления изобретения вирион гAAV и композиции по настоящему изобретению лечат или предотвращают сердечную недостаточность. В некоторых вариантах осуществления изобретения кардиомиопатия, при которой вектор вводят системно. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирион гAAV вводят внутривенной или внутрикороной инъекцией.

**[0069]** В некоторых вариантах осуществления изобретения гAAV трансдуцирует сердечные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения гAAV трансдуцирует кардиомиоциты.

**[0070]** В некоторых вариантах осуществления изобретения трансдукция гAAV увеличивает экспрессию полипептида DWORF в сердце субъекта. «Повышение экспрессии полипептида DWORF» обычно относится к экспрессии по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20% или выше по сравнению с контрольным субъектом или тканью, не обработанной вектором. В некоторых вариантах осуществления изобретения определяемая экспрессия означает экспрессию в 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза или 3 раза выше, чем в контроле без вектора. Экспрессию можно оценить вестерн-блоттингом, как описано в следующем примере, или твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA), или другими способами, известными в данной области техники. В некоторых случаях экспрессию измеряют количественно, используя стандартную кривую. Стандартные кривые могут быть получены с использованием очищенного белка, например, очищенного полипептида DWORF, способами, описанными в примерах или известными в данной области техники. Альтернативно, экспрессию продукта терапевтического гена можно оценить путем количественного определения соответствующей мРНК.

**[0071]** В некоторых вариантах осуществления изобретения повышенная экспрессия DWORF в ткани сердца происходит при дозах в геномах вектора (гв) на килограмм веса субъекта (кг),  $3 \times 10^{14}$  гв/кг или меньше,  $2 \times 10^{14}$  гв/кг или меньше,  $1 \times 10^{14}$  гв/кг или меньше,  $9 \times 10^{13}$  гв/кг или меньше,  $8 \times 10^{13}$  гв/кг или меньше,  $7 \times 10^{13}$  гв/кг или меньше,  $6 \times 10^{13}$  гв/кг или меньше,  $5 \times 10^{13}$  гв/кг или меньше,  $4 \times 10^{13}$  гв/кг или меньше,  $3 \times 10^{13}$  гв/кг или меньше,  $2 \times 10^{13}$  гв/кг или меньше или  $1 \times 10^{13}$  гв/кг или меньше.

### ***ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И НАБОРЫ***

**[0072]** Вирион гAAV по настоящему изобретению обычно доставляется субъекту в виде фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемый растворитель (например, воду и т.д.) и одно или несколько вспомогательных веществ. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции содержат буфер с примерно нейтральным pH (pH 5, 6, 7, 8 или 9). В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит фосфатно-солевой буфер (например, PBS при pH около 7). Фармацевтические композиции могут содержать фармацевтически приемлемую соль. Концентрация соли может быть выбрана таким образом, чтобы фармацевтическая композиция была изотонической или почти изотонической по отношению к ткани-мишени.

**[0073]** В различных вариантах осуществления изобретения композиции, описанные в настоящем документе, содержат несущие среды (например, носители, разбавители и эксципиенты), которые являются фармацевтически приемлемыми для состава, пригодного для инъекций. Это могут быть, в частности, изотонические, стерильные солевые растворы (мононатрий или динатрий фосфат, хлорид натрия, калия, кальция или магния и тому подобное или смеси таких солей) или сухие, особенно лиофилизированные композиции,

которые при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического раствора, позволяют создавать инъекционные растворы. Примеры фармацевтических форм, пригодных для инъекций, включают, например, стерильные водные растворы или дисперсии; составы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный раствор пропиленгликоля; и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций.

**[0074]** В различных вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат около  $1 \times 10^8$  копий генома на миллилитр (GC/мл), около  $5 \times 10^8$  GC/мл, от около  $1 \times 10^9$  GC/мл, около  $5 \times 10^9$  GC/мл, около  $1 \times 10^{10}$  GC/мл, около  $5 \times 10^{10}$  GC/мл, около  $1 \times 10^{11}$  GC/мл, около  $5 \times 10^{11}$  GC/мл, около  $1 \times 10^{12}$  GC/мл, около  $5 \times 10^{12}$  GC/мл, около  $5 \times 10^{13}$  GC/мл, или около  $1 \times 10^{14}$  GC/мл вектора вируса (например, вирион rAAV). В различных вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат около  $1 \times 10^8$  копий генома на миллилитр (GC/мл), от около  $5 \times 10^8$  GC/мл до около  $1 \times 10^9$  GC/мл, от около  $1 \times 10^9$  GC/мл до около  $5 \times 10^9$  GC/мл, от около  $5 \times 10^9$  GC/мл до около  $1 \times 10^{10}$  GC/мл, от около  $1 \times 10^{10}$  GC/мл до около  $5 \times 10^{10}$  GC/мл, от около  $5 \times 10^{10}$  GC/мл до около  $1 \times 10^{11}$  GC/мл, от около  $1 \times 10^{11}$  GC/мл до около  $5 \times 10^{11}$  GC/мл, от около  $5 \times 10^{11}$  GC/мл до около  $1 \times 10^{12}$  GC/мл, от около  $1 \times 10^{12}$  GC/мл до около  $5 \times 10^{12}$  GC/мл, от около  $5 \times 10^{12}$  GC/мл до около  $5 \times 10^{13}$  GC/мл или от около  $5 \times 10^{13}$  GC/мл до около  $1 \times 10^{14}$  GC/мл вектора вируса (например, вириона rAAV). В различных дополнительных вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат от около  $5 \times 10^8$  GC/мл до около  $5 \times 10^9$  GC/мл, от около  $5 \times 10^9$  GC/мл до около  $5 \times 10^{10}$  GC/мл, от около  $5 \times 10^{10}$  GC/мл до около  $5 \times 10^{11}$  GC/мл, от около  $5 \times 10^{11}$  GC/мл до около  $5 \times 10^{12}$  GC/мл или от около  $5 \times 10^{12}$  GC/мл до около  $1 \times 10^{14}$  GC/мл вектора вируса (например, вирион rAAV). В дополнительных вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат от около  $5 \times 10^8$  GC/мл до около  $5 \times 10^{10}$  GC/мл, от около  $5 \times 10^{10}$  GC/мл до около  $5 \times 10^{12}$  GC/мл или от около  $5 \times 10^{12}$  GC/мл до около  $1 \times 10^{14}$  GC/мл вектора вируса (например, вириона rAAV).

**[0075]** В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению вводят в общем объеме около 10 мкл, около 20 мкл, около 30 мкл, около 40 мкл, около 50 мкл, около 60 мкл, около 70 мкл, около 80 мкл, около 90 мкл, около 100 мкл, 110 мкл, около 120 мкл, около 130 мкл, около 140 мкл, около 150 мкл, около 160 мкл, около 170 мкл, около 180 мкл, около 190 мкл или около 200 мкл. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению вводят в общем объеме от около 10 мкл до около 20 мкл, от около 20 мкл до около 30 мкл, от около 30 мкл до около 40 мкл, от около 40 мкл до около 50 мкл, от около 50 мкл до около 60 мкл, от около 60 мкл до около 70 мкл, от около 70 мкл до около 80 мкл, от около 80 мкл до около 90 мкл, от около 90 мкл до около 100 мкл, от около 100 мкл до около 110 мкл, от около 110 мкл до около 120 мкл, от около 120 мкл до около 130 мкл, от около 130 мкл до около 140 мкл, от около 140 мкл до около 150 мкл, от

около 150 мкл до около 160 мкл, от около 160 мкл до около 170 мкл, от около 170 мкл до около 180 мкл, от около 180 мкл до около 190 мкл или от около 190 мкл до около 200 мкл.

**[0076]** Копии генома на миллилитр можно определить с помощью количественной реакции полимеразного изменения (qPCR) с использованием стандартной кривой, полученной с эталонным образцом, имеющим известную концентрацию полинуклеотидного генома вируса. Для AAV в качестве эталонного образца часто используется плаزمид-переносчик, используемая для создания вириона гAAV, но могут использоваться и другие эталонные образцы.

**[00772]** Альтернативно или дополнительно концентрацию вектора вируса можно определить путем измерения титра вектора на клеточной линии. Титр вируса обычно выражается в виде вирусных частиц (vp) на единицу объема (например, vp/мл). В различных вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат около  $1 \times 10^8$  вирусных частиц на миллилитр (vp/мл), около  $5 \times 10^8$  vp/мл, около  $1 \times 10^9$  vp/мл, около  $5 \times 10^9$  vp/мл, около  $1 \times 10^{10}$  vp/мл, около  $5 \times 10^{10}$  vp/мл, около  $1 \times 10^{11}$  vp/мл, около  $5 \times 10^{11}$  vp/мл, около  $1 \times 10^{12}$  vp/мл, около  $5 \times 10^{12}$  vp/мл, около  $5 \times 10^{13}$  vp/мл или около  $1 \times 10^{14}$  vp/мл вектора вируса (например, вириона гAAV). В различных дополнительных вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат от около  $1 \times 10^8$  вирусных частиц на миллилитр (vp/мл) до около  $5 \times 10^8$  vp/мл, от около  $5 \times 10^8$  vp/мл до около  $1 \times 10^9$  vp/мл, от около  $1 \times 10^9$  vp/мл до около  $5 \times 10^9$  vp/мл, от около  $5 \times 10^9$  vp/мл до около  $1 \times 10^{10}$  vp/мл, от около  $1 \times 10^{10}$  vp/мл до около  $5 \times 10^{10}$  vp/мл, от около  $5 \times 10^{10}$  vp/мл до около  $1 \times 10^{11}$  vp/мл, от около  $1 \times 10^{11}$  vp/мл до около  $5 \times 10^{11}$  vp/мл, от около  $5 \times 10^{11}$  vp/мл до около  $1 \times 10^{12}$  vp/мл, от около  $1 \times 10^{12}$  vp/мл до около  $5 \times 10^{12}$  vp/мл, от около  $5 \times 10^{12}$  vp/мл до около  $5 \times 10^{13}$  vp/мл или от около  $5 \times 10^{13}$  vp/мл до около  $1 \times 10^{14}$  vp/мл вектора вируса (например, вириона гAAV).

**[0078]** В одном варианте осуществления изобретения в настоящем изобретении предложен набор, содержащий контейнер, включающий фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе.

### **ПРИМЕРЫ**

**[0079]** Следующие примеры, а также фигуры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области должно быть понятно, что способы, описанные в примерах или показанные на фигурах, представляют собой способы, обнаруженные изобретателями, которые хорошо функционируют при практическом осуществлении изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как представляющие собой предпочтительные способы его практического применения. Тем не менее, специалисты в данной области техники должны, в свете описания, понимать, что в описанные конкретные варианты осуществления могут быть внесены многие изменения и при этом по-прежнему получены такой же или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема раскрытия.

#### **ПРИМЕР 1**

**[0080] Результаты.** Для изучения терапевтического потенциала генной терапии DWORF при сердечной недостаточности был разработан подход с использованием аденоассоциированного вируса (AAV), который безопасен и эффективен для доставки генов *in vivo* (Lin *et al. Circ Res.* 115:354-63 (2014)). Серотип 9 AAV (AAV9) был выбран из-за его кардиотропных свойств, и для управления специфичной для кардиомиоцитов экспрессией (плазмида Addgene # 69915) использовали промотор сердечного тропонина-T (cTnT) (Lin *et al. Circ Res.* 115:354-63 (2014)). Вирусы AAV9-cTnT-DWORF (AAV-DWORF) и контрольные вирусы AAV9-cTnT-tdTomato (AAV-tdTomato) были проверены на мышах путем доставки на 5-й день после рождения (P5) путем внутрибрюшинной инъекции в количестве  $5 \times 10^{13}$  вирусных геномов/килограмм. Экспрессию белка оценивали через 4 недели с помощью вестерн-блоттинга и наблюдали специфичную для сердца сверхэкспрессию DWORF ( $16,9 \pm 2,4$  раза) и tdTomato (**ФИГ. 2А**). Эффективность генной терапии AAV-DWORF оценивали на мышинной модели DCM, вызванной делецией гена мышечно-специфического белка LIM (MLP, кодируемого геном *Cspr3*). В соответствии с защитными эффектами, ранее наблюдаемыми в результате трансгенной сверхэкспрессии DWORF у мышей с нокаутом MLP (KO) (Makarewich *et al. Elife.* 7 (2018)), эхокардиография мышей MLP KO, получавших AAV-DWORF на P5, показала значительное улучшение сердечной функции по сравнению с контрольными мышами MLP KO/AAV-tdTomato в возрасте 8 недель (**ФИГ. 2В**). Кроме того, неблагоприятное ремоделирование сердца, характеризующееся истончением стенок желудочков, расширением камер и увеличением массы сердца по сравнению с измерениями длины большеберцовой кости, было ослаблено у мышей MLP KO/AAV-DWORF по сравнению с животными MLP KO/AAV-tdTomato (**ФИГ. 2В** и **ФИГ. 2С**). Степень кардиозащиты, наблюдаемая у мышей MLP KO/AAV-DWORF, была снижена по сравнению с мышами MLP KO/DWORF Tg (Makarewich *et al. Elife.* 7 (2018)), вероятно, из-за сниженного уровня сверхэкспрессии DWORF, достигнутого за счет доставки AAV (в  $16,9 \pm 2,4$  раза), по сравнению со сверхэкспрессией DWORF Tg ( $58,5 \pm 14,7$  раза) (**ФИГ. 2А**). Тем не менее, эти результаты показывают, что усиление активности SERCA с помощью генной терапии DWORF является жизнеспособной и многообещающей терапевтической стратегией.

**[0081]** Затем был протестирован потенциал генной терапии DWORF в улучшении сердечных исходов в модели инфаркта сердечной (MI) с инфарктом миокарда. Мыши получали либо AAV-DWORF, либо AAV-tdTomato генную терапию на P5 и подвергались ложной операции или MI путем постоянной перевязки левой коронарной артерии в возрасте 8 недель, а индукция и прогрессирование сердечной недостаточности отслеживались в течение 12 недель. В соответствии с предыдущими наблюдениями на других моделях сердечной недостаточности (Makarewich *et al. Elife.* 7 (2018); Nelson *et al. Science.* 351;271-275 (2016)) экспрессия эндогенного белка DWORF снижалась в сердце в ответ на MI (снижение в  $3,4 \pm 1,0$  раз), как было обнаружено вестерн-блоттингом (**ФИГ. 2D**), что, вероятно, способствует снижению активности SERCA, лежащей в основе сердечной недостаточности. Вестерн-блот-анализ также показал AAV-опосредованную

гиперэкспрессию DWORF как в ложных ( $14,9 \pm 1,0$  раз), так и в образцах MI ( $17,0 \pm 4,8$  раз) в терминальный момент времени через 12 недель после операции (ФИГ. 2D). Сердечная функция оценивалась у мышей с помощью эхокардиографии в исходном состоянии (до операции) и после MI (ФИГ. 2E). По сравнению с мышами MI/AAV-tdTomato, мыши MI/AAV-DWORF продемонстрировали значительное улучшение функции желудочков, измеренное по фракционному укорочению (ФИГ. 2D), а также продемонстрировало заметное уменьшение дилатации сердца (ФИГ. 2E и ФИГ. 2F). Гистологический анализ сердец с окрашиванием трихромом по Массону не показал существенной разницы в размере инфаркта между группами (ФИГ. 2F). Неспособность AAV-DWORF полностью восстановить сердечную функцию, вероятно, отражает необратимую потерю кардиомиоцитов в ответ на ишемию, так что благотворное действие DWORF ограничено теми кардиомиоцитами, которые остались.

**[0082] Обсуждение.** По сравнению с предыдущими подходами генной терапии SERCA, которые использовались в клинических испытаниях сердечной недостаточности (Penny *et al. Hum Gene Ther.* 28:378-384 (2017)), AAV-DWORF может быть терапевтически превосходным по нескольким причинам. Во-первых, небольшой размер микропептида DWORF (34 аминокислоты) позволяет более эффективно транслировать его по сравнению с SERCA, который представляет собой гораздо более крупный многопроходный трансмембранный белок (около 1000 аминокислот). Кроме того, предыдущая работа показала, что DWORF имеет более высокое сродство к SERCA, чем ингибирующий пептид фосфоламбан, и может противодействовать суперингибированию SERCA у трансгенных по фосфоламбану мышей<sup>3</sup>, поэтому избыточная экспрессия DWORF, вероятно, снизит ингибирование SERCA при сердечной недостаточности, вызванное повышенным соотношением фосфоламбана к SERCA (Kranias *et al. Circ Res.* 110:1646-1660 (2012)). Кроме того, экспрессия DWORF сама по себе снижается при сердечной недостаточности человека и нескольких мышинных моделях генетической и приобретенной кардиомиопатии (Makarewich *et al. Elife.* 7 (2018); Nelson *et al. Science.* 351:271-275 (2016)), что способствует непосредственно к нарушению регуляции кальция, поэтому увеличение экспрессии DWORF может быть важным фактором в восстановлении гомеостаза кальция при заболевании. Этот пример характеризует DWORF как молекулярный инотроп, способный сильно повышать активность SERCA и сократительную способность кардиомиоцитов, предоставляя дополнительные доказательства его потенциальной клинической значимости в качестве терапевтической мишени при заболеваниях сердца. В совокупности представленные здесь данные указывают на то, что генная терапия DWORF обещает стать новым средством лечения сердечной недостаточности и представляет собой новый подход по сравнению с предыдущими манипуляциями с уровнями SERCA.

\* \* \* \* \*

**[0083]** Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в свете этого могут быть предложены специалисту в данной

области техники и должны быть включены в сущность и рамки настоящей заявки и объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном документе, настоящим включены посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий введение эффективного количества вириона рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), где вирион гAAV содержит капсид AAV и экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид DWORF, функционально связанный с промотором.
2. Способ по п.1, где способом лечат сердечную недостаточность.
3. Способ по п.1, где способ предотвращает сердечную недостаточность.
4. Способ по п.1, где субъект страдает кардиомиопатией или подвержен риску ее развития.
5. Способ по п.1, где субъект страдает дилатационной кардиомиопатией или подвержен риску ее развития.
6. Способ по п.1, где субъект имеет наследственный аллель риска сердечной недостаточности.
7. Способ по п.1, где сердечная недостаточность представляет собой инфаркт миокарда.
8. Способ по п.1, где сердечная недостаточность представляет собой сердечную недостаточность со сниженной фракцией выброса (HFrEF).
9. Способ по п.1, где сердечная недостаточность представляет собой сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF).
10. Способ по любому из пп.1-9, где субъект страдает инфарктом миокарда или подвержен риску его развития.
11. Способ по п.10, где инфаркт миокарда представляет собой хронический инфаркт миокарда.
12. Способ по п.10, где инфаркт миокарда представляет собой острый инфаркт миокарда.
13. Способ по любому из пп.1-12, где субъект имеет наследственный аллель риска сердечной недостаточности.
14. Способ по любому из пп.1-13, где способ вызывает экспрессию полипептида DWORF в сердце субъекта.
15. Способ по любому из пп.1-14, где способ не вызывает заметной экспрессии полипептида DWORF в мышцах субъекта, кроме сердца.
16. Способ по любому из пп.1-15, где способ не вызывает обнаруживаемой экспрессии полипептида DWORF в печени субъекта.
17. Способ по любому из пп.1-16, где способ вызывает экспрессию полипептида DWORF в кардиомиоцитах.
18. Способ по любому из пп.1-17, где способ не вызывает заметной экспрессии полипептида DWORF в сердечных фибробластах.

19. Способ по любому из пп.1-18, где способ улучшает один или несколько показателей функции сердца, необязательно частичное укорочение и/или внутренний размер левого желудочка (LVID).

20. Способ по п.18, где улучшение сердечной функции наблюдается со 2-й по 12-ю недели.

21. Способ по любому из пп.1-20, где способ уменьшает ремоделирование сердца.

22. Способ по любому из пп.1-21, где способ предотвращает снижение экспрессии DWORF у субъектов, страдающих инфарктом миокарда.

23. Способ по любому из пп.1-22, где вирион rAAV вводят внутривенной или внутрикороной инъекцией.

24. Способ по п.17, где способ повышает активность SERCA.

25. Способ по любому из пп.1-24, где вирион rAAV представляет собой вирион rAAV серотипа AAV9.

26. Способ по любому из пп.1-25, где капсид AAV содержит капсидный белок, который по меньшей мере на 98% идентичен SEQ ID NO: 14.

27. Способ по любому из пп.1-26, где капсид AAV содержит капсидный белок, по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 14.

28. Способ по любому из пп.1-27, где капсид AAV содержит капсидный белок, содержащий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

29. Способ по любому из пп.1-28, где промотор представляет собой промотор сердечного тропонина-T (cTnT).

30. Способ по любому из пп.1-29, где промотор сердечного тропонина-T (cTnT) содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 11.

31. Способ по любому из пп.1-30, где промотор сердечного тропонина-T (cTnT) содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 11.

32. Способ по любому из пп.1-31, где промотор сердечного тропонина-T (cTnT) содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11.

33. Способ по любому из пп.1-32, где полипептид DWORF представляет собой полипептид DWORF человека.

34. Способ по любому из пп.1-33, где полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.

35. Способ по любому из пп.1-34, где полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.

36. Способ по любому из пп.1-35, где полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.

37. Способ по любому из пп.1-36, где экспрессионная кассета фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV.

38. Способ по любому из пп.1-37, где ITR представляют собой AAV2 ITR.

39. Способ по любому из пп.1-38, где ITR содержат полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

40. Способ по любому из пп.1-39, где у субъекта после введения наблюдается улучшение симптомов.

41. Способ по п.40, где улучшенные симптомы представляют собой один или несколько из следующих симптомов: усиленная сократимость; снижение утомляемости; уменьшение одышки; уменьшение отеков; уменьшение боли в груди; снижение аритмии; снижение сгустков крови; улучшение функции сердечного клапана; и уменьшение шума в сердце.

42. Вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), где вирион rAAV содержит капсид AAV и экспрессионную кассету, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид DWORF, функционально связанный с промотором.

43. Вирион rAAV по п.42, где вирион rAAV представляет собой вирион rAAV серотипа AAV9.

44. Вирион rAAV по п.42 или 43, где капсид AAV содержит капсидный белок, который по меньшей мере на 98% идентичен SEQ ID NO: 14.

45. Вирион rAAV по любому из пп.42-44, где капсид AAV содержит капсидный белок, по меньшей мере на 99% идентичный SEQ ID NO: 14.

46. Вирион rAAV по любому из пп.42-45, где капсид AAV содержит капсидный белок, содержащий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14.

47. Вирион rAAV по любому из пп.42-46, где промотор представляет собой промотор сердечного тропонина-T (cTnT).

48. Вирион rAAV по любому из пп.42-47, где промотор сердечного тропонина-T (cTnT) содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 11.

49. Вирион rAAV по любому из пп.42-48, где промотор сердечного тропонина-T (cTnT) содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 11.

50. Вирион rAAV по любому из пп.42-49, где промотор сердечного тропонина-T (cTnT) содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11.

51. Вирион rAAV по любому из пп.42-50, где полипептид DWORF представляет собой полипептид DWORF человека.

52. Вирион rAAV по любому из пп.42-51, где полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.

53. Вирион rAAV по любому из пп.42-52, где полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.

54. Вирион rAAV по любому из пп.42-53, где полипептид DWORF содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 9.

55. Вирион rAAV по любому из пп.42-54, где экспрессионная кассета фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV.

56. Вирион rAAV по любому из пп.42-55, где ITR представляют собой AAV2 ITR.

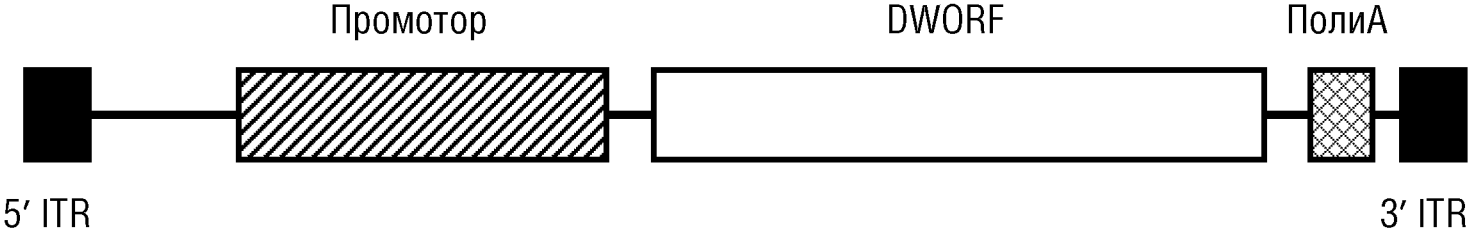
57. Вирион rAAV по любому из пп.42-56, где ITR содержат полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

58. Фармацевтическая композиция, содержащая вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) по любому из пп.42-57 и фармацевтически приемлемый носитель.

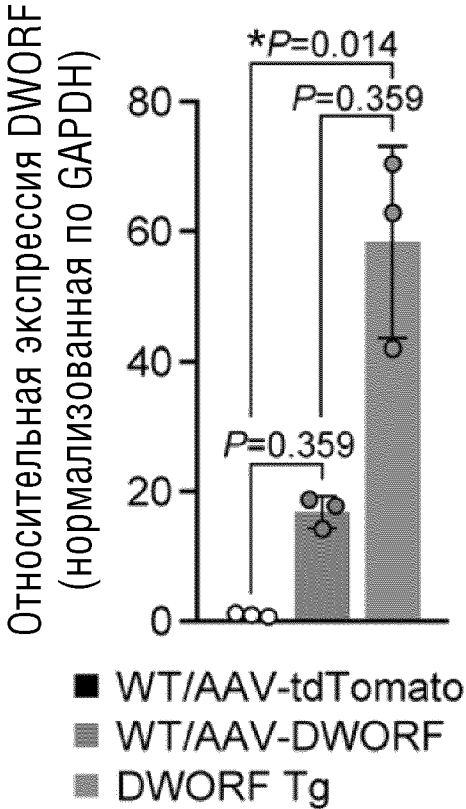
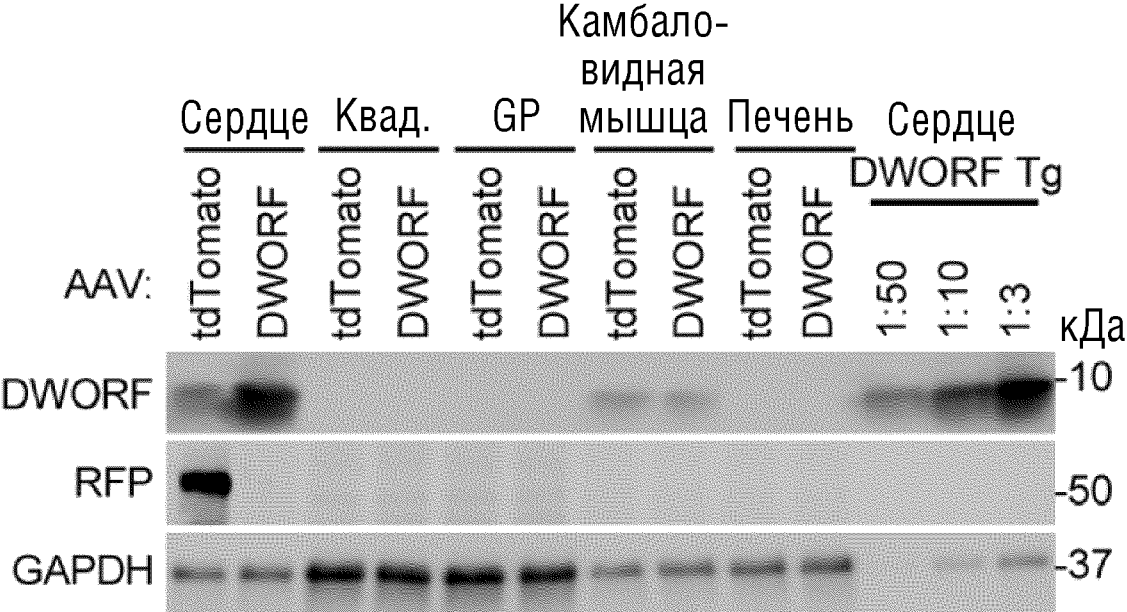
59. Набор, содержащий контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по п.58.

По доверенности

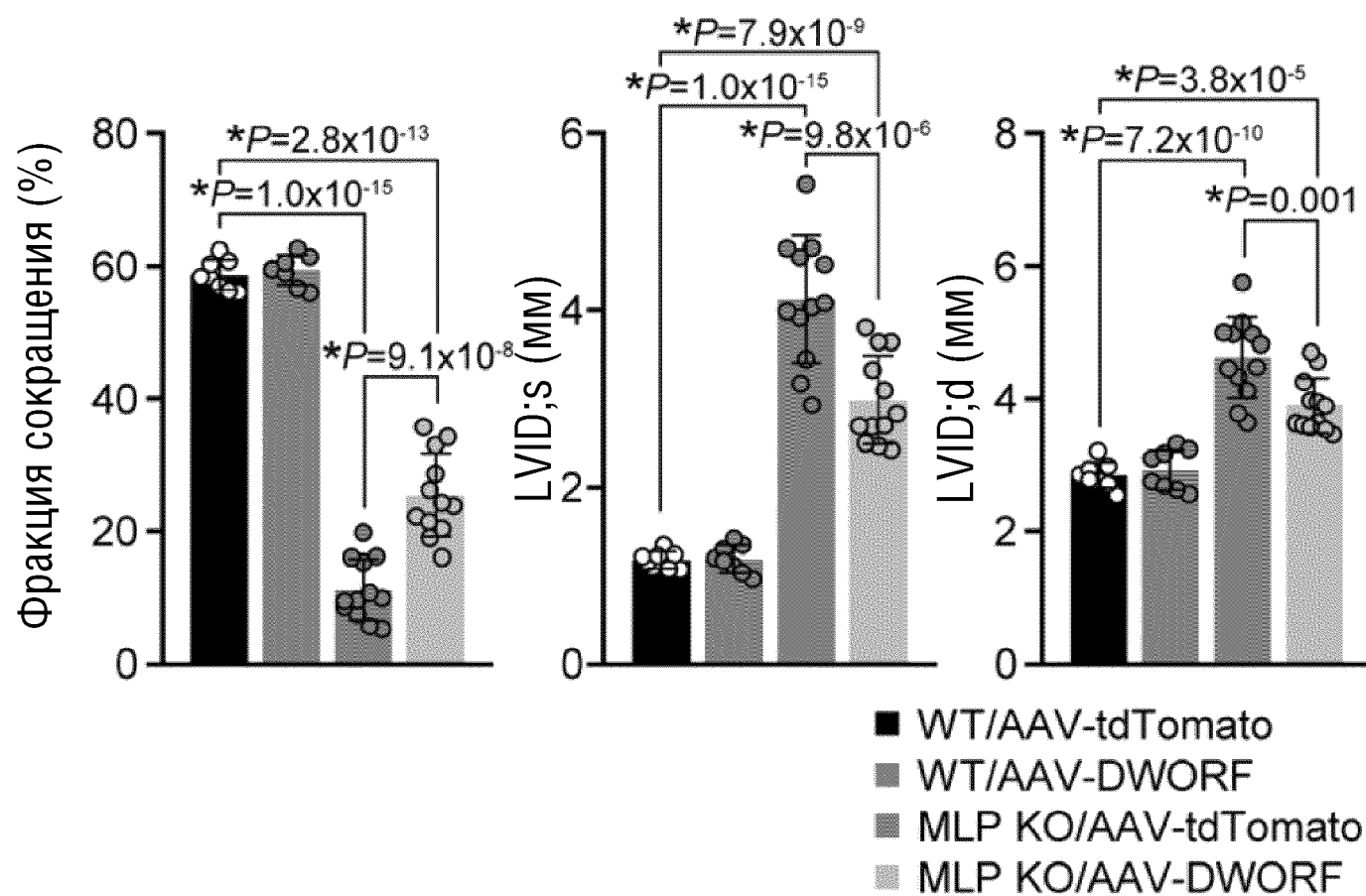
ФИГ.1

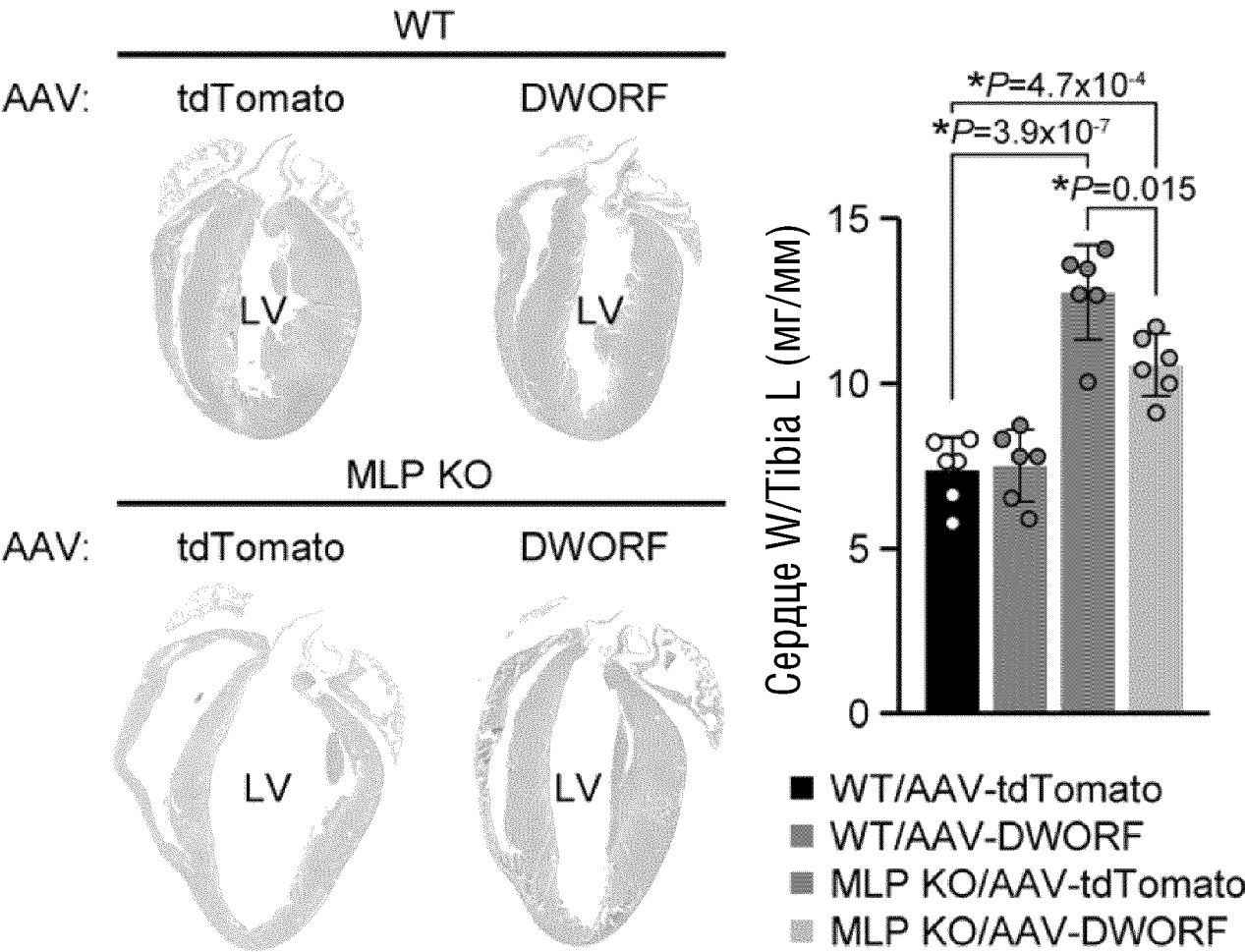


ФИГ.2А

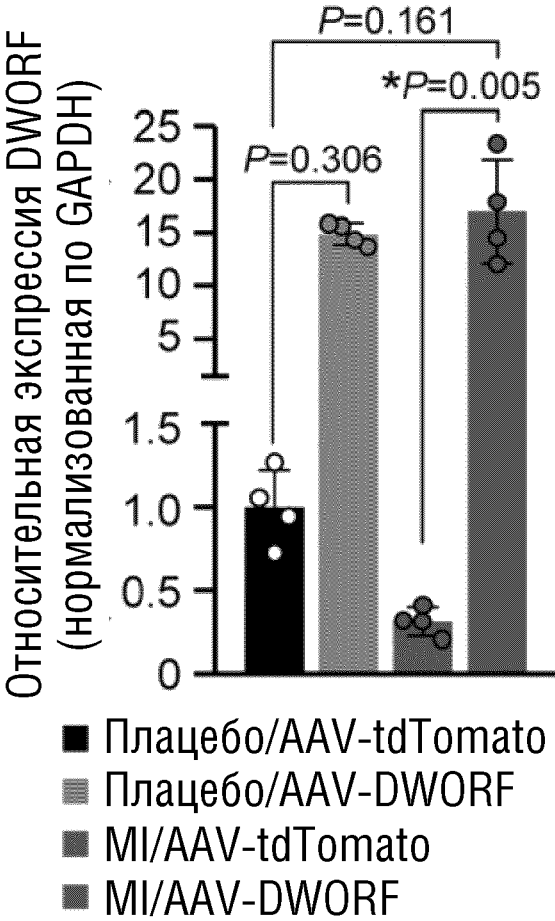
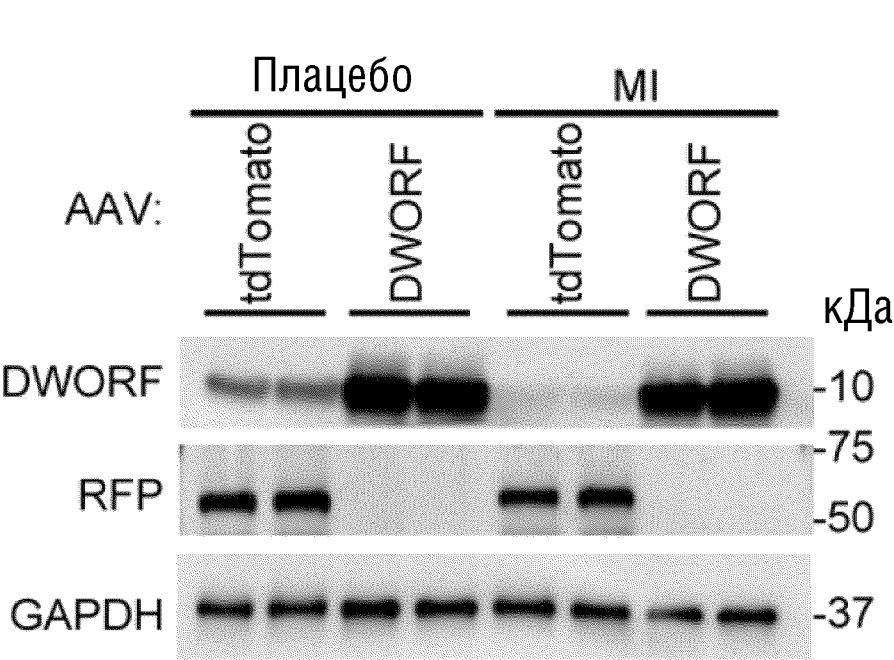


# ФИГ.2В

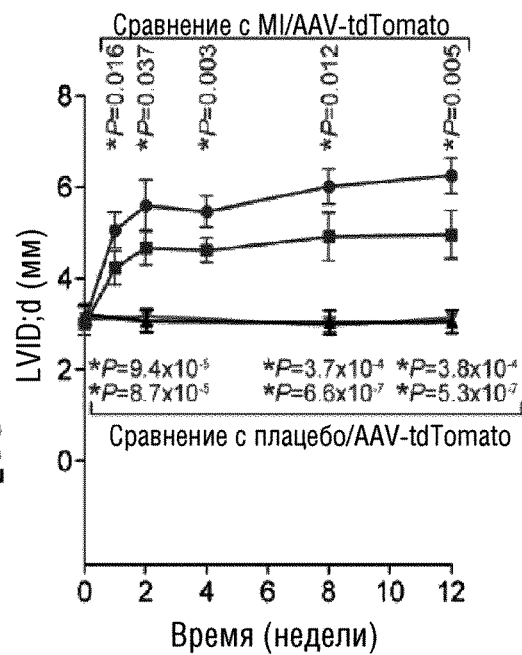
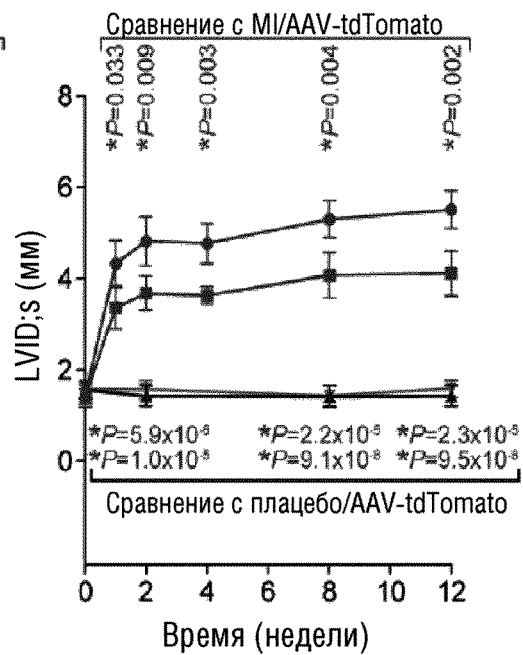
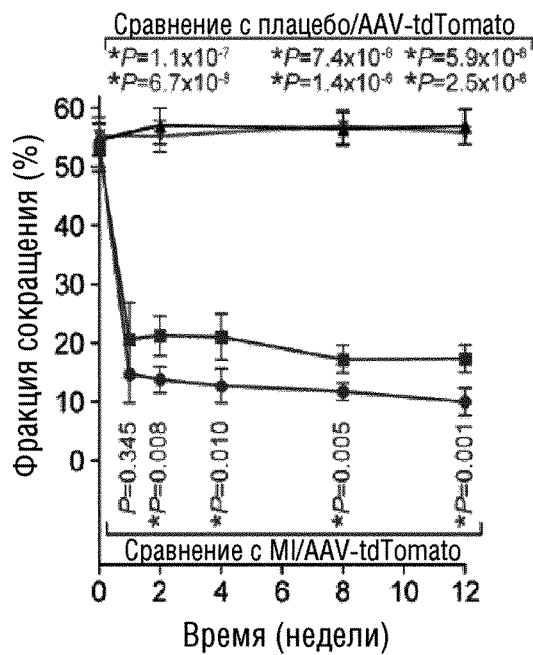




ФИГ.2D



ФИГ.2Е



- Плацебо/AAV-tdTomato
- Плацебо/AAV-DWORF
- MI/AAV-tdTomato
- MI/AAV-DWORF

ФИГ.2F

