

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201892296** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2019.04.30

(22) Дата подачи заявки
2017.04.14

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) **ДОСТАВКА БЕТА-САРКОГЛИКАНА И МИКРОРНК-29 ВЕКТОРОМ НА ОСНОВЕ АДЕНО-АССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА И ЛЕЧЕНИЕ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ**

(31) **62/323,333; 62/433,548**

(32) **2016.04.15; 2016.12.13**

(33) **US**

(86) **PCT/US2017/027583**

(87) **WO 2017/180976 2017.10.19**

(71) Заявитель:

**РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ ЭТ
НЭШНУАЙД ЧИЛДРЕН'С
ХОСПИТАЛ (US)**

(72) Изобретатель:

**Родино-Клапак Луиза, Менделл
Джерри Р. (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе описаны рекомбинантные AAV векторы, содержащие полинуклеотидную последовательность, содержащую β-саркогликан, и способы применения указанных рекомбинантных векторов для уменьшения или предотвращения фиброза у субъекта-млекопитающего, страдающего от мышечной дистрофии. Также в данном документе описаны комбинированные терапии, включающие в себя введение AAV вектора(ов), экспрессирующего(их) β-саркогликан и miR-29c субъекту-млекопитающему, страдающему мышечной дистрофией.

201892296
A1

201892296

A1

ДОСТАВКА β -САРКОГЛИКАНА И МИКРОРНК-29 ВЕКТОРОМ НА ОСНОВЕ АДЕНО-АССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА И ЛЕЧЕНИЕ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/323333, поданной 15 апреля 2016 года, и предварительной заявке США № 62/433548, поданной 13 декабря 2016 года, которые обе включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛОВ, ПОДАННЫХ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Данная заявка содержит в качестве отдельной части раскрытия перечень последовательностей в машиночитаемой форме, который полностью включен в данное описание посредством ссылки и определен как: имя файла - 50622A_SeqListing.txt; размер - 21466 байт; созданный - 13 апреля 2017 года.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В данном документе описаны терапевтические векторы, такие как AAV (адено-ассоциированный вирус) векторы, экспрессирующие β -саркогликан, и способы применения данных векторов для уменьшения и предотвращения фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией. Согласно данному изобретению также предложены способы комбинированной генной терапии, включающие введение первого AAV вектора, экспрессирующего β -саркогликан, и второго AAV вектора, экспрессирующего miR-29, для уменьшения и предотвращения фиброза у пациентов, страдающих мышечной дистрофией.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Мышечная дистрофия лимба-пояса (LGMD, limb-girdle muscular dystrophy) типа 2E (LGMD2E) представляет собой аутосомно-рецессивное нарушение, вызванное мутациями в гене, кодирующем β -саркогликан (SGCB), вызывающими потерю функционального белка (1). LGMD2E представляет собой относительно распространенную и тяжелую форму LGMD в Соединенных Штатах, с общемировой частотой встречаемости 1/200000-1/350000

(2). Отсутствие β -саркогликана приводит к прогрессирующей дистрофии с хронической потерей мышечных волокон, воспалением, заменой жиром и фиброзом, что приводит к ухудшению мышечной силы и функции (3, 4). В виде комплекса саркогликаны (α -, β -, γ -, δ -), варьирующие в размере от 35 до 50 кДа (5), все представляют собой трансмембранные белки, которые обеспечивают стабильность сарколеммы, предоставляя защиту от механического стресса во время мышечной активности (3). Потеря β -саркогликана в LGMD2E обычно приводит к различной степени сопутствующей потери других саркогликановых белков, делая мышечную мембрану непрочной, что приводит к потере мышечных волокон (1). Хотя диапазон времени проявления клинического фенотипа LGMD2E варьирует, диагноз обычно ставят до 10 лет, а потеря способности к перемещению происходит в промежуток с среднего до позднего подросткового возраста (1, 6, 7). Пациенты имеют повышенную сывороточную креатинкиназу (СК), слабость проксимальных мышц, трудности при вставании с пола и прогрессирующую потерю способности передвигаться. В пятидесяти процентах случаев встречаются проблемы с сердцем.

[0005] Адено-ассоциированный вирус (AAV) является парвовирусом с дефектной репликацией, одноцепочечным ДНК-геном, длина которого составляет около 4,7 т.п.н., включая два 145 нуклеотидных инвертированных концевые повторы (ITR). Существует несколько серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV являются известными. В качестве других примеров полный геном AAV-1 предоставлен под номером доступа ГенБанка NC_002077; полный геном AAV-2 предоставлен под номером доступа ГенБанка NC_001401 и Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983); полный геном AAV-3 предоставлен под номером доступа ГенБанка NC_1829; геном AAV-4 предоставлен под номером доступа ГенБанка NC_001829; геном AAV-5 предоставлен под номером доступа ГенБанка AF085716; геном AAV-6 предоставлен под номером доступа ГенБанка NC_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 предоставлены под номерами доступа ГенБанка AX753246 и AX753249 соответственно; геном AAV-9 предоставлен в Gao et al., J.

Viol., 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 предоставлен в *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 предоставлен в *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). Последовательность генома AAV rh.74 представлена в патенте США № 9434928, включенном в данный документ посредством ссылки. Цис-действующие последовательности, направляющие репликацию, инкапсулирование/упаковку и интеграцию в хромосомы клетки-хозяина вирусной ДНК (*rep*), содержатся в ITR (инвертированные концевые повторы) AAV. Три промотора AAV (обозначенные p5, p19 и p40 по их относительному расположению на геномной карте) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены *rep* и *cap*. Два промотора *rep* (p5 и p19) в комбинации с дифференциальным сплайсингом одиночного интрона AAV (при нуклеотидах 2107 и 2227) приводят к получению четырех белков рецепта (*rep* 78, *rep* 68, *rep* 52 и *rep* 40) из гена *rep*. Белки *Rep* обладают несколькими ферментативными свойствами, которые в конечном счете отвечают за репликацию вирусного генома. Ген *cap* экспрессируется из промотора p40 и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативные сайты сплайсинга и неконсенсусные старт-кодны трансляции отвечают за продуцирование трех родственных капсидных белков. Единственный консенсусный сайт полиаденилирования находится в позиции 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

[0006] AAV обладает уникальными особенностями, которые делают его привлекательным в качестве вектора доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. Инфицирование клеток AAV в культуре является нецитопатическим, а естественное инфицирование людей и других животных является скрытым и бессимптомным. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что позволяет применять различные типы тканей *in vivo*. Кроме того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и не делящиеся клетки, и может по существу сохраняться в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомный элемент) в течение жизни данных клеток. Геном провируса AAV вставляют в клонированную ДНК в плазмиды, что делает возможным

создание рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, направленные на репликацию и инкапсулирование генома AAV, содержатся в ITR генома AAV, некоторые или все внутренние приблизительно 4,3 т.н. генома (кодирующие репликацию и структурные капсидные белки, *rep-cap*) могут быть заменены на чужеродную ДНК. Для создания векторов на основе AAV белки *rep* и *cap* могут быть представлены в транс. Еще одна важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно стабильным и крепким вирусом. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56° до 65°C в течение нескольких часов), что делает холодное хранение AAV менее критичным. AAV даже может быть лиофилизирован. Наконец, AAV-инфицированные клетки не устойчивы к суперинфекции.

[0007] Многочисленные исследования продемонстрировали долгосрочную (больше чем 1,5 года) опосредованную рекомбинантным AAV экспрессию белка в мышцах. См., Clark et al., *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., *Proc Nat. Acad Sc. USA*, 93: 14082-14087 (1996); and Xiao et al., *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996). См. также, Chao et al., *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) and Chao et al., *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Более того, поскольку мышца сильно васкуляризирована, трансдукция рекомбинантным AAV приводит к появлению трансгенных продуктов в кровеносной системе после внутримышечной инъекции, как описано в Herzog et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5804-5809 (1997) и Murphy et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13921-13926 (1997). Кроме того, Lewis et al., *J Virol*, 76: 8769-8775 (2002) продемонстрировали, что волокна скелетных мышц обладают необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, свертывания и секреции антител, что указывает на то, что мышца способна к устойчивой экспрессии секретлируемых белковых терапевтических агентов.

[0008] Возникающей формой терапии LGMD2E является доставка гена посредством вируса, для восстановления белка дикого типа в пораженной мышце, что приводит к восстановлению мышечной функции. Учитывая, что у подмножества пациентов может развиваться

кардиомиопатия (8, 9, 10, 13), это следует учитывать при долгосрочном уходе за данными пациентами. В предыдущих сообщениях была хорошо охарактеризована мышь Sgcb-null. Araishi et al. (3) создали мышь с недостаточностью по β -саркогликану, с сопутствующей потерей всех саркогликанов, а также саркоспана, с по меньшей мере небольшим сохранением мерозина, дистрогликанов и дистрофина, воспроизводя клиническую картину, наблюдаемую при LGMD2E. Гистологические изменения в данной животной модели были также прототипом клинического аналога, включая отчетливость фиброза скелетных мышц (14). Dressman et al. (25) инъецировали поперечную брюшную мышцу применяя rAAV2.CMV.SGCB. Экспрессия сохранялась в течение 21 месяца, а мышечные волокна были защищены от рецидивирующего некроза. Было также описано применение самокомплементарного AAV для усиления экспрессии трансгена (16), а также мышечно-специфического промотора для улучшения скелетной мышцы (20, 26), и оптимизации гена β -саркогликана человека (hSGCB).

[0009] Функциональное улучшение у пациентов, страдающих от LGMD и других мышечных дистрофий, требует как восстановления генов, так и уменьшения фиброза. Существует необходимость в способах уменьшения фиброза, которые могут быть объединены с способами восстановления генов для более эффективного лечения LGMD и других мышечных дистрофий.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] В данном документе описаны геннотерапевтические векторы, например AAV, экспрессирующие ген β -саркогликана и способы доставки β -саркогликана в мышцы для уменьшения и/или предотвращения фиброза; и/или для увеличения мышечной силы и/или для лечения β -саркогликанопатии у субъекта-млекопитающего, страдающего мышечной дистрофией.

[0011] Кроме того, согласно данному изобретению предложены комбинированные терапии, и подходы с использованием геннотерапевтических векторов, доставляющих β -саркогликан для компенсации генного дефекта, наблюдаемого при LGMD2E, и геннотерапевтические векторы, доставляющие miR-29 для

последующего подавления фиброза.

[0012] В одном аспекте, в данном документе описан рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую β -саркогликан. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность, кодирующая β -саркогликан, содержит последовательность, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более типично 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и кодирует белок, который сохраняет активность β -саркогликана. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность, кодирующая β -саркогликан, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность, кодирующая β -саркогликан, представляет собой нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[0013] В другом аспекте, рекомбинантный AAV вектор, описанный в данном документе, содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую β -саркогликан, который по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% или 89%, более типично по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93% или 94%, и еще более типично по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по последовательности идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и белок сохраняет активность β -саркогликана.

[0014] В другом аспекте, в данном документе описан рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный β -саркогликан, которая содержит нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в строгих условиях с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или ей комплементарным.

[0015] Термин «строгий» применяется для обозначения

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

[0016] Другие агенты могут быть включены в гибридизационные и промывочные буферы с целью уменьшения неспецифической и/или фоновой гибридизации. Примеры представляют собой 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,1% поливинилпирролидона, 0,1% пирофосфата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия, NaDodSO₄, (SDS), фиколл, раствор Денхардта, разрушенная ультразвуком ДНК спермы лосося (или другая не комплементарная ДНК) и сульфат декстрана, хотя могут быть применены и другие подходящие агенты. Концентрация и типы этих добавок могут быть изменены без существенного влияния на строгость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8–7,4, однако в типичных условиях ионной силы скорость гибридизации практически не зависит от pH. См. Anderson et al., *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Специалистами в данной области техники могут быть скорректированы условия гибридизации, чтобы приспособить

эти переменные и позволить ДНК с различной степенью родственности последовательности формировать гибриды.

[0017] В другом аспекте, рекомбинантные AAV векторы, описанные в данном документе, могут быть функционально связаны с регуляторным элементом, специфичным для мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный для скелетных мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор MEF, мышечную креатинкиназу (МКК), тМКК (усеченную МКК), тяжелую цепь миозина (МНС), МНСК7 (гибридная версия МНС и МСК), С5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышины креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

[0018] В некоторых вариантах осуществления, специфичный для мышц промотор является МНСК7 (SEQ ID NO: 4). Иллюстративный rAAV, описанный в данном документе, представляет собой pAAV.МНСК7.hSCGB, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3; причем промотор МНСК7 охватывает нуклеотиды 130-921, химерный интрон SV40 охватывает нуклеотиды 931-1078, последовательность β -саркогликана охватывает нуклеотиды 1091-2047, а последовательность поли-А охватывает нуклеотиды 2054-2106.

[0019] В некоторых вариантах осуществления, специфичный для мышц промотор представляет собой тМКК (SEQ ID NO: 6). Иллюстративный rAAV, описанный в данном документе, представляет собой pAAV.тМКК.hSCGB, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5; причем промотор тМКК охватывает нуклеотиды 141-854, химерный интрон SV40 охватывает нуклеотиды 886-1018, последовательность β -саркогликана охватывает нуклеотиды 1058-2014, а последовательность поли-А охватывает нуклеотиды 2021-2073.

[0020] AAV может иметь любой серотип, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh.74. Получение псевдотипированного rAAV описано, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с мутациями капсида. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22 (11): 1900-1909 (2014).

[0021] Также рассматриваются композиции, содержащие любой из rAAV векторов, описанных в данном документе.

[0022] Также предлагаются способы получения рекомбинантной AAV векторной частицы, включающие культивирование клетки, которая была трансфицирована любым рекомбинантным AAV вектором, описанным в данном документе, и выделение рекомбинантных AAV частиц из супернатанта трансфицированных клеток. Также рассматриваются вирусные частицы, содержащие любой из рекомбинантных AAV векторов, описанных в данном документе.

[0023] Также предлагаются способы уменьшения фиброза у нуждающегося в нем субъекта-млекопитающего. В этом отношении способ включает введение терапевтически эффективного количества описанного в данном документе AAV вектора (или композиции, содержащей AAV вектор, описанный в данном документе) субъекту-млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления, субъект-млекопитающее страдает от мышечной дистрофии. В некоторых вариантах осуществления, введение AAV вектора, описанного в данном документе (или композиции, содержащей AAV вектор, описанной в данном документе), уменьшает фиброз в скелетной мышце или в сердечной мышце субъекта. Данные способы могут дополнительно включать стадию введения второго рекомбинантного AAV вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, содержащую miR29c.

[0024] Термин «мышечная дистрофия», как используется в данном документе, относится к нарушению, при котором сила и объем мышц постепенно снижаются. Неограничивающие примеры болезней мышечной дистрофии могут включать в себя: мышечную дистрофию Беккера, дистрофию большеберцовой мышцы, мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфюсса, плече-

лопаточно-лицевую миопатию, саркогликанопатию, врожденную мышечную дистрофию, такую как врожденная мышечная дистрофия из-за частичной недостаточности LAMA2, врожденная мышечная дистрофия из-за недостаточности мерозина, врожденная мышечная дистрофия типа 1D, врожденная мышечная дистрофия Фукуямы, мышечная дистрофия лимба-пояса 1A, мышечная дистрофия лимба-пояса 2A, мышечная дистрофия лимба-пояса 2B, мышечная дистрофия лимба-пояса 2C, мышечная дистрофия лимба-пояса 2D, мышечная дистрофия лимба-пояса 2E, мышечная дистрофия лимба-пояса 2F, мышечная дистрофия лимба-пояса 2G, мышечная дистрофия лимба-пояса 2H, мышечная дистрофия лимба-пояса 2I, мышечная дистрофия лимба-пояса 2I, мышечная дистрофия лимба-пояса 2J, мышечная дистрофия лимба-пояса 2K, синдром ригидного позвоночника с простым буллезным эпидермолизом, окулофарингеальная мышечная дистрофия, врожденная мышечная дистрофия Ульриха, и склероатоническая мышечная дистрофия Ульриха. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от мышечной дистрофии лимба-пояса. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от мышечной дистрофии лимба-пояса 2E (LGMD2E).

[0025] Термин «фиброз», как применяется в данном документе, относится к избыточному или нерегулируемому отложению компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), и аномальным процессам восстановления в тканях после повреждения, включая скелетные мышцы, сердечную мышцу, печень, легкие, почки и поджелудочную железу. Компоненты ВКМ, которые отлаживаются, включают в себя коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3, и фибронектин.

[0026] В другом аспекте, в данном документе описан способ увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта-млекопитающего, включающий в себя введение терапевтически эффективного количества описанного в данном документе AAV вектора (или композиции, содержащей AAV вектор, описанный в данном документе) субъекту-млекопитающему.

[0027] В любом из способов согласно данному изобретению субъект может страдать от мышечной дистрофии, такой как мышечная дистрофия лимба-пояса или любой другой дистрофии, связанной с дистрофином.

[0028] Также предложен способ лечения мышечной дистрофии у субъекта-млекопитающего, включающий в себя введение терапевтически эффективного количества описанного в данном документе AAV вектора (или композиции, содержащей AAV вектор, описанный в данном документе) субъекту-млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления, мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию лимба-пояса. Любой из описанных в данном документе способов может дополнительно включать в себя стадию введения второго рекомбинантного AAV вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, содержащую miR29C.

[0029] Также рассматривается комбинированная терапия. В этом отношении любой из вышеперечисленных способов, описанных в данном документе, может дополнительно включать в себя введение второго рекомбинантного AAV вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, содержащую miR29C. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, содержащий miR29C, функционально связан с регуляторным элементом, специфичным для мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор MEF, мышечную креатинкиназу (МКК), tМКК (усеченную МКК), тяжелую цепь миозина (MHC), MHC7 (гибридная версия MHC и MCK), C5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышечной креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE). В некоторых вариантах осуществления, второй рекомбинантный вектор содержит полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 8, как описано в предварительной заявке США № 62/323163 (раскрытие которой включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме).

[0030] В способах комбинированной терапии, описанных в данном документе, в которых как rAAV вектор, экспрессирующий β -саркогликан, так и rAAV вектор, экспрессирующий miR29c, вводят субъекту-млекопитающему, причем rAAV векторы могут быть введены одновременно или введены последовательно, при этом rAAV вектор, экспрессирующий β -саркогликан вводят непосредственно перед или после rAAV, экспрессирующего miR29c. Альтернативно, AAV вектор, экспрессирующий β -саркогликан, вводят в течение около 1-24 часов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов) после введения rAAV, экспрессирующего miR-29, или реализуют способы согласно данному изобретению, в которых AAV вектор, экспрессирующий β -саркогликан, вводится в течение около 1-24 часов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов) перед введением rAAV, экспрессирующего miR-29. В некоторых вариантах осуществления, AAV вектор, экспрессирующий β -саркогликан, вводят в течение около 1-5 часов (например, 1, 2, 3, 4 или 5 часов) после введения rAAV, экспрессирующего miR-29, или реализуют способы согласно данному изобретению в которых AAV вектор, экспрессирующий β -саркогликан, вводят в течение около 1-5 часов (например, 1, 2, 3, 4 или 5 часов) перед введением rAAV, экспрессирующего miR-29c.

[0031] В любом из способов согласно данному изобретению rAAV вектор вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом из способов согласно данному изобретению rAAV вводят системно, например вводят парентерально с помощью инъекции, инфузии или имплантации.

[0032] Композиции согласно данному изобретению составлены для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, композиции согласно данному изобретению составлены для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекций, инфузии или имплантации.

[0033] Кроме того, любая композиция составлена для введения субъекту, страдающему от мышечной дистрофии (такой как мышечная

дистрофия лимба-пояса или любой другой дистрофии, связанной с дистрофином). В некоторых вариантах осуществления, композиция может дополнительно содержать второй рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 8.

[0034] В любом из применений согласно изобретению лекарственное средство составлено для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом из применений согласно изобретению лекарственное средство составлено для системного введения, такого как парентеральное введение путем инъекций, инфузии или имплантации. Кроме того, любое лекарственное средство может быть приготовлено для введения субъекту, страдающему от мышечной дистрофии (такой как мышечная дистрофия лимба-пояса, или любой другой мышечной дистрофией, связанной с дистрофином). В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство может дополнительно содержать второй рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 8.

[0035] Вышеупомянутые параграфы не предназначены для определения каждого аспекта изобретения, и дополнительные аспекты описаны в других разделах, таких как ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ. Подразумевается что весь документ должен быть связан как цельное раскрытие, и следует понимать, что рассматриваются все сочетания признаков, описанных в данном документе, даже если комбинация признаков не найдена вместе в одном предложении, или параграфе, или разделе данного документа. Изобретение включает в себя, в качестве дополнительного аспекта, все варианты осуществления изобретения, более узкие по своему объему чем варианты, определенные в конкретных параграфах выше. Например, существуют определенные аспекты изобретения, которые описываются как род, и тогда следует понимать, что каждый член рода является отдельно аспектом изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0036] На Фиг. 1A-1D изображено, что опосредованная AAV

экспрессия β -саркогликана восстанавливает дистрофин-ассоциированные белки и поддерживает целостность мембраны. (а) Самокомплементарный AAV вектор, содержащий кодон-оптимизированный ген β -саркогликана человека (hSGCB), под управлением промотора специфической для мышц УМКК. Кассета также содержит химерный интрон для усиления процессинга и сигнал полиаденилирования для стабильности. (б) Иммунофлуоресцентное окрашивание анти- β -SG-антителом демонстрирует высокие уровни окрашивания трансгена SGCB сарколеммы у 5-недельных мышей через 6 и 12 недель после инъекции. Показаны $\times 20$ изображения. Процент волокон, экспрессирующих бета-саркогликан для каждой ТА мышцы, составлял в среднем $88,4 \pm 4,2\%$ через 6 недель ($n=9$, 4 самца, 5 самок) и $76,5 \pm 5,8\%$ через 12 недель ($n=6$, 4 самца, 2 самки). Экспрессию белка проверяли вестерн-блоттингом с окрашиванием гамма-тубулина в качестве контроля загрузки. (с) Доставка AAV β -саркогликана приводит к восстановлению других членов саркогликанового комплекса; α -саркогликан, дистрофин. $\times 20$ изображения. (d) scAAVrh.74.hSGCB защищает мембраны *sgcb*^{-/-} от повреждений. Сопоставляли изображение, показывающее большую площадь окрашенных эванс голубым волокон (красная), с кластером β -саркогликан-положительных волокон, которые были защищены от окрашивания эванс голубым. Показаны $\times 40$ изображения.

[0037] На Фиг. 2A-2D изображен гистологический анализ скелетной мышцы с недостаточностью β -SG. Обработка scAAVrh.74.hSGCB нормализует гистологические параметры мышцей *sgcb*^{-/-}. Окрашивание гематоксилином и эозином, и окрашивание пикросириус красным проводили на ТА мышцах из *sgcb*^{-/-} мышей вместе с обычными контрольными мышцами C57/BL6, и мышцами, обработанными scAAVrh.74.hSGCB, с последующим количественным определением гистологических параметров и % окрашивания коллагена. (а) Окрашивание гематоксилином и эозином показывает наличие центрально-нуклеированных волокон, воспалительных клеток и большой разброс диаметра волокон в мышце с недостаточностью β -SG, и улучшение гистопатологии после переноса гена. (b) Окрашивание

пикросириус красным показывает уменьшение окрашивания в красный коллагена в обработанной мышце. (с) Количественная оценка центрально-нуклеированных волокон, показывающая уменьшение после обработки ($P < 0,0005$, односторонний дисперсионный анализ) и (d) представление распределения размера волокон и увеличение среднего размера волокна ТА мышцы из контрольных мышей C57/BL6 и мышей *sgcb*^{-/-} по сравнению с обработанными мышцами ($P < 0,0001$, односторонний дисперсионный анализ). (е) Количественное определение % коллагена в ТА мышцах из контрольных мышей C57/BL6 и мышей *sgcb*^{-/-} по сравнению с обработанными мышцами *sgcb*^{-/-} ($P < 0,0001$, односторонний дисперсионный анализ). 100 мкм полоска-шкала показана для $\times 20$ изображений. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

[0038] На Фиг. 3А-3С изображено, что внутримышечная доставка *scAAVrh.74.hSGCB* корректирует тетаническую силу и устойчивость к повреждению, вызванному сокращением. Собирали ТА мышцы мышей *sgcb*^{-/-}, обработанных 3×10^{10} гв (геномов вектора) *scAAVrh.74.hSGCB* с помощью ИМ (внутримышечной) инъекции через 6 недель после переноса гена, и применяли методику для оценки тетанической силы, и применяли методику эксцентричного сокращения для оценки устойчивости к травмам, вызванным сокращением. (а) Обработанные *AAVrh.74.hSGCB* ТА мышцы продемонстрировали значительное улучшение как абсолютной тетанической силы ($P < 0,01$, парный t-критерий), (b) нормализованной удельной силы ($P < 0,05$, парный t-критерий), что не отличалось от силы дикого типа (C57/BL6). (с) обработанные *AAVrh.74.hSGCB* ТА мышцы продемонстрировали значительное улучшение устойчивости к травме, вызванной сокращением, по сравнению с необработанными контрольными *sgcb*^{-/-} ($P < 0,01$, двухсторонний дисперсионный анализ). Показано сохранение силы после 10 сокращений. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

[0039] На Фиг. 4А-4С изображены результаты анализа старых мышей, обработанных внутримышечно *scAAVrh.74.tMCK.hSGCB*. (а) Иммунофлуоресцентное окрашивание ТА мышцы из 6-месячных обработанных мышей *sgcb*^{-/-} через 12 недель после инъекции (n=5, 5

самцов) показывает сарколемную экспрессию трансгена SGCB в количествах, составляющих в среднем 80% у инъекцированных мышей по сравнению с необработанными (n=4, 4 самца). (b) Окрашивание пикросириус красным обработанной и необработанной ТА мышцы. (c) Количественное определение коллагена, представленное в окрашенной пикросириус красным ткани, показывает значительное снижение количества коллагена после обработки с помощью rAAVrh.74.tMCK.hSGCB ($P < 0,0001$, односторонний дисперсионный анализ). 100 мкм полоска-шкала показана для $\times 20$ изображений. **** $P < 0,0001$.

[0040] На Фиг. 5A-5C изображены результаты доставки scAAVrh.74.hSGCB через сосуды. Четырехнедельные (n=5, 5 самцов) и пятинедельные (n=4, 2 самца, 2 самки) мыши с недостаточностью β -SG были обработаны вектором через бедренную артерию, чтобы доставить вектор в мышцы нижней конечности. При дозе 5×10^{11} гв экспрессия β -SG составляла $90,6 \pm 2,8\%$ в ТА мышце и $91,8 \pm 4,7\%$ в икроножной мышце обработанных мышей, что сопровождалось улучшением гистопатологии, приводя к значительному улучшению удельной силы по сравнению с необработанными животными даже следуя модели травматизма. (a) экспрессия белков β -SG у трех репрезентативных мышей. Мышца из необработанной мыши β -SG KO показана для сравнения в вставке (внизу справа). Показаны $\times 20$ изображения. Экспрессия в обработанных мышцах, подтвержденная вестерн-блоттингом, и показан гамма-тубулин в качестве контроля загрузки. (b) Гистопатология значительно улучшается после обработки высокой дозой. Верхние панели - обработанные ТА и икроножные мышцы. Нижние панели - необработанные недостаточные по β -SG контрольные мышцы. 100 мкм полоска-шкала показана для $\times 20$ изображений. (c) Процент удельной силы, сохраненной в мышце ДРП (длинный разгибатель пальцев), после 10 циклов повреждения, вызванного эксцентрическим сокращением. Обработка 5×10^{11} гв AAVrh.74.hSGCB привела к значительному улучшению в силе, которая эквивалентна контрольной мышце ДТ (нормальной) ($P < 0,05$, односторонний дисперсионный анализ). * $P < 0,05$.

[0041] На Фиг. 6А-6В изображено снижение фиброза у обработанных ILP (изолированная перфузия конечностей) мышей β -SG KO. (a) Окрашивание пикросириус красным показывает снижение фиброза у обработанных мышей, что указывает на уменьшение отложения коллагена по сравнению с необработанными мышами $sgcb^{-/-}$. (b) Количественное определение коллагена в ТА и икроножных мышцах из VL6 ДТ, необработанных мышей $sgcb^{-/-}$ и обработанных мышей подтверждает снижение количества коллагена у обработанных мышей ($P < 0,001$, односторонний дисперсионный анализ). 100 мкм полоска-шкала показана для $\times 20$ изображений. $***P < 0,001$.

[0042] На Фиг. 7А и 7В изображено векторное биораспределение и экспрессия белка. (a) Гистограмма среднего распределения вектора в тканях, собранных у обработанных ILP мышей, приведенное в копиях транскрипта на микрограмм ДНК, добавленного в qPCR. Обработывали левую конечность. (b) С помощью вестерн-блоттинга не наблюдается экспрессии белка в органах не мишенях.

[0043] На Фиг. 8А-Д изображена гистологическая и функциональная недостаточность у мышей $sgcb^{-/-}$ в 7-месячном возрасте. Трехкрасочное окрашивание в диафрагме (А) и сердце (С) мышей $SGCB^{-/-}$ демонстрирует обширный фиброз (красный). Сила, производимая диафрагмой, значительно уменьшается в диафрагме (В), и также уменьшается фракция сердечного выброса у мышей $sgcb^{-/-}$ (D).

[0044] На Фиг. 9 представлена схема терапевтической трансгенной кассеты с β -саркогликаном. Самокомплементарный AAV вектор, содержащий кодон-оптимизированный ген β -саркогликана человека (hSGCB). Экспрессией управляет специфичный для мышц промотор МНСК7. Кассета также содержит химерный интрон для усиления процессинга и сигнал полиаденилирования для стабильности.

[0045] На Фиг. 10 изображено иммунофлуоресцентное окрашивание β -саркогликана в различных скелетных мышцах, которое демонстрирует устойчивую экспрессию с редкими отрицательными волокнами после 1, 4 или 6 месяцев лечения (показано 1 месяц).

[0046] На Фиг. 11 изображено иммунофлуоресцентное окрашивание β -саркогликана в диафрагме и сердце, которое демонстрирует устойчивую экспрессию с редкими отрицательными волокнами после 1, 4 или 6 месяцев лечения (показано 1 месяц).

[0047] На Фиг. 12A-D изображено восстановление экспрессии SGCB после внутривенной доставки scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (a) Кассета scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (b) Иммунофлуоресцентная визуализация через 6 месяцев после инъекции скелетных мышц, диафрагмы и сердца у мышей $sgcb^{-/-}$, инъецированных внутривенно общей дозой $1e12$ гв scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Репрезентативные изображения скелетных мышц, показывающие в среднем $98,13 \pm 0,31\%$ трансдукции. Показаны 20X изображения. Репрезентативные изображения сердечной ткани, демонстрирующие высокие уровни экспрессии трансгена hSGCB. Показаны 10X изображения. (в) Вестерн-блоттинг всех мышц из одной обработанной мыши $sgcb^{-/-}$ подтверждающий экспрессию трансгена hSGCB. (d) Вестерн-блоттинг на экспрессию hSGCB в сердцах пяти обработанных мышей $sgcb^{-/-}$ с количественной оценкой плотности, показывающий сверхэкспрессию hSGCB вплоть до 72,0% уровней BL6 ДТ.

[0048] На Фиг. 13A-D изображен эффект системного лечения с помощью scAAVrh74.MHCK7.hSGCB на мышечную патологию. (a) Гематоксилиновое и эозиновое окрашивание диафрагмы и мышцы QUAD мышей C57BL/6 ДТ, $sgcb^{-/-}$ и обработанных scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, показывающее нормализованную гистопатологию. (б) Количественная оценка уменьшения центрально нуклеированных волокон в мышцах у обработанных $sgcb^{-/-}$ по сравнению с необработанными $sgcb^{-/-}$ (TA, GAS, GLUT, диафрагма, $p < 0,0001$) (QUAD, PSOAS, TRI, $p < 0,05$). (c) Нормализация распределения волокон в GAS, PSOAS и TRI, и (d) увеличение среднего размера волокна в обработанных мышцах по сравнению с необработанными мышцами $sgcb^{-/-}$ ($p < 0,001$) (односторонний дисперсионный анализ) ($n=5$ на группу).

[0049] На Фиг. 14A и 14B изображено уменьшение отложения коллагена у внутривенно обработанных мышей β -SG KO. (a) Окрашивание пикросириус красным показало снижение фиброза у обработанных мышей, как показано уменьшением отложения коллагена

в диафрагме и GAS по сравнению с необработанными мышами *sgcb*^{-/-}. (b) Количественное определение уровней коллагена в мышцах диафрагмы и GAS у мышей C57BL/6 ДТ (n=4), необработанных мышей *sgcb*^{-/-} (n=4), и обработанных мышей *sgcb*^{-/-} (n=5) подтверждает снижение уровней коллагена в обеих обработанных мышцах (p < 0,0001, односторонний дисперсионный анализ). Полоска масштаба 100 мкм показана для изображений 20X.

[0050] На Фиг. 15 изображено, что доставка scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB через хвостовую вену мышам *sgcb*^{-/-} полностью восстанавливает силу в диафрагме после 6 месяцев лечения (введение IV (1e12гв)). Мышечные полосы диафрагмы собирали у обработанных и контрольных мышей SGCB^{-/-} и мышей ДТ, и подвергали измерениям силы; лечение восстанавливало силу до уровней ДТ.

[0051] На Фиг. 16 показана схема rAAV вектора scAACrh.74.CMV.miR29c и нуклеотидная последовательность miR-29c в природном каркасе miR-30.

[0052] На Фиг. 17 изображено, что после 3 месяцев лечения с помощью AAVrh.74.CMV.miR29C мышцы TA собирали у обработанных и контрольных мышей SGCB^{-/-} и мышей ДТ, и анализировали на фиброз (количества коллагена) (n=5 в группе). Используя окрашивание сириус красным и количественную оценку, наблюдали снижение количеств коллагена после лечения (см. Фиг. 18). Результаты показали, что количества транскриптов Col1A, Col3A и Fbn нормализовались, а размер мышечных волокон увеличился.

[0053] На Фиг. 18 изображены репрезентативные изображения отсканированных полных срезов необработанных и обработанных с помощью AAVrh.74.CMV.miR29C передних большеберцовых мышц, окрашенных сириус красным, который окрашивает коллаген 1 и 3. Количественная оценка изображена на Фиг. 17.

[0054] На Фиг. 19А и 19В изображена коррекция кифосколиоза в грудном отделе позвоночника. (a) Кифосколиоз у мышей *sgcb*^{-/-} как обнаружено рентгенографией. (b) Бал кифотического индекса (KI) мышей *sgcb*^{-/-} (3,69) является низким по сравнению с C57BL/6 ДТ (6,01) (p < 0,01), но увеличивается после лечения scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB (5,39) (p < 0,05 по сравнению с *sgcb*^{-/-})

(односторонний дисперсионный анализ) (n=6 в группе).

[0055] На Фиг. 20A-D изображена оценка кардиомиопатии в сердечной мышце. (a) Покраска гематоксилином-эозином и пикросириус красным сердец 7-месячных BL6 ДТ, *sgcb*^{-/-} и обработанных AAV.МНСК7.hSGCB *sgcb*^{-/-} через 6 месяцев после лечения показывает дистрофию миокарда в необработанных мышцах *sgcb*^{-/-} и улучшение после лечения. (b) ЯМР анализ сердца, показывающий уменьшение ударного объема сердец *sgcb*^{-/-} (p<0,01), минутного объема сердца и фракции выброса (p<0,05) (односторонний дисперсионный анализ), и улучшение через 6 месяцев после лечения (n=6 на группу). (c) Вестерн-блоттинг двух сердец C57BL/6 ДТ, двух сердец *sgcb*^{-/-} и пяти обработанных с помощью AAV.МНСК7.hSGCB сердец *sgcb*^{-/-}, показывающий снижение количества сердечного тропонина I у больных мышей. (d) Денситометрическая количественная оценка, показывающая снижение сердечного тропонина I (сTrpI) до 60,38% по сравнению с количествами у BL6 ДТ, и сверхэкспрессия вплоть до 135,8% по сравнению с количествами BL6 ДТ.

[0056] На Фиг. 21A-B изображены исправление функции диафрагмы и увеличенная активность в клетке с открытым пространством. (a) Мышечные полоски диафрагмы собирали для измерения силы и сопротивления усталости у мышей BL6 ДТ (n=5), мышей *sgcb*^{-/-} (n=4) и обработанных AAV.МНСК7.hSGCB *sgcb*^{-/-} (n=5), все в возрасте 7 месяцев. Шесть месяцев лечения восстановили силу до уровней ДТ (p<0,01 по сравнению с *sgcb*^{-/-}) и улучшили устойчивость к усталости. (b) Общая способность к передвижению в плоскостях x и y значительно снижается у мышей *sgcb*^{-/-} (p<0,0001) и немного улучшена у мышей, обработанных МНСК7 (p<0,05). Вертикальная активность, в виде передвижения на задних конечностях, также снижалась у мышей *sgcb*^{-/-} (p<0,01) и значительно увеличивалась у мышей, обработанных МНСК7 (p<0,05) (односторонний дисперсионный анализ) (n=6 в группе).

[0057] На Фиг. 22A-B изображен анализ биораспределения и анализа экспрессии трангена вне мишени системной доставки scAAVrh.74.МНСК7.hSGCB. (a) Гистограмма распределения среднего количества копий гв транскрипта на микрограмм ДНК, добавленной в

реакцию кПЦР в различных тканях из двух мышей *sgcb*^{-/-} после IV (внутривенной) доставки scAAVrh.74.МНСК7.hSGCB при общей дозе 1e12 гв. (b) Биораспределение согласно вестерн-блоттингу в мышцах и органах из мышей *sgcb*^{-/-}, систематически инъецированных scAAVrh.74.МНСК7.hSGCB, указывает на отсутствие экспрессии трансгена hSGCB в любых не-мышечных образцах.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0058] Данное изобретение основано на обнаружении того, что введение AAV вектора, содержащего полинуклеотид, экспрессирующий β -саркогликан, приводит к уменьшению или полному обращению вспять мышечного фиброза в животной мышинной модели мышечной дистрофии лимба-пояса. Как показано в Примерах, введение AAV вектора, описанного в данном документе, приводило к обращению вспять признаков дистрофии, включающих в себя меньшее количество редуцированных волокон, уменьшенное воспаление и улучшение функционального восстановления путем защиты от эксцентрического сокращения с увеличенным производством силы.

[0059] Как применяется в данном документе, термин «AAV» является стандартной аббревиатурой для адено-ассоциированного вируса. Адено-ассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК парвовирус, который размножается только в клетках, в которых определенные функции обеспечиваются ко-инфицирующим вспомогательным вирусом. В настоящее время существует тринадцать серотипов AAV, которые были охарактеризованы. Общую информацию и обзоры по AAV можно найти, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228, и Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York). Однако нет сомнений, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны как структурно, так и функционально даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; и Rose, Comprehensive Virology 3:1-61 (1974)). Например, все серотипы AAV, по-видимому, обладают очень сходными свойствами репликации,

опосредованными гомологичными генами *rep*; и все они имеют три родственных капсидных белка, таких как те, которые экспрессируются в AAV2. Степень родства дополнительно предсказывается с помощью гетеродуплексного анализа, который показывает обширную кросс-гибридизацию между серотипами по всей длине генома; и наличие аналогичных самоотжигающихся сегментов на концах, которые соответствуют «последовательностям инвертированного концевой повтора» (ITR). Подобные закономерности инфекционности также предполагают, что функции репликации в каждом серотипе находятся под одинаковым регуляторным контролем.

[0060] «Вектор AAV», как применяется в данном документе, относится к вектору, содержащему один или большее количество представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевой повтора AAV (ITR). Такие векторы AAV могут быть реплицированы и упакованы в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов *rep* и *cap*.

[0061] «Вирион AAV» или «вирусная частица AAV» или «векторная частица AAV» относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного вектора AAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (то есть полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его обычно называют «векторная частица AAV» или просто «AAV вектор». Таким образом, продуцирование векторной частицы AAV обязательно включает в себя получения вектора AAV, поскольку такой вектор содержится в векторной частице AAV.

AAV

[0062] Рекомбинантные геномы AAV согласно данному изобретению содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, и один или большее количество ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах rAAV может быть из любого серотипа AAV, для которого может быть

получен рекомбинантный вирус, включая, но не ограничиваясь лишь этими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh.74. Получение псевдотипированного rAAV описано, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с мутациями капсида. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22 (11): 1900-1909 (2014). Как отмечено в разделе «УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ» выше, нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны в данной области техники. Для способствования специфической для скелетных мышц экспрессии могут применяться AAV1, AAV5, AAV6, AAV8 или AAV9.

[0063] ДНК-плазмиды согласно данному изобретению содержат геномы rAAV. ДНК-плазмиды переносят в клетки, пригодные для инфицирования вспомогательным для AAV вирусом (например, аденовирусом, аденовирусом с удаленным E1, или вирусом герпеса) для упаковки генома rAAV в инфекционные вирусные частицы. Методы получения частиц rAAV, в которых в клетку вводят геном AAV, который должен быть упакован, гены *rep* и *cap*, и вспомогательные вирусные функции, являются стандартными в данной области техники. Получение rAAV требует, чтобы в одной клетке (обозначенная в данном документе как упаковывающая клетка) присутствовали следующие компоненты: геном rAAV, отделенные от (т.е. не в) генома rAAV *rep* и *cap* гены AAV, и функции вспомогательного вируса. Гены *rep* и *cap* AAV могут быть из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут быть из серотипа AAV, который отличается от серотипа ITR генома rAAV, включая, но не ограничиваясь лишь этими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh.74. Получение псевдотипированного rAAV описано, например, в WO 01/83692, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0064] Способ получения упаковывающей клетки заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для продуцирования частиц AAV. Например,

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

[0065] Общие принципы получения rAAV рассмотрены, например, Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Различные подходы описаны в Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); патенте США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте США № 5658776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) Vaccine 13:1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3:1124-1132; патенте США № 5786211; патенте США № 5871982; и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы тем самым включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме, с уделением особого внимания тем разделам документов, которые

касаются получения rAAV.

[0066] Таким образом, согласно изобретению предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный rAAV. В одном варианте осуществления, упаковывающие клетки могут быть стабильно трансформированными раковыми клетками, такими как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная линия 293). В другом варианте осуществления, упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такими как клетки небольшого числа пассажей 293 (клетки почки плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты плода человека), клетки WI-38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода макака резус).

[0067] Рекомбинантные AAV (то есть, инфекционные инкапсулированные частицы rAAV) согласно данному изобретению содержат геном rAAV. Варианты осуществления включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: rAAV обозначенный как rAAV.MHCK7.hSCGB, который содержит полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3; и rAAV.tMCK.hSCGB, который содержит полинуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

[0068] rAAV может быть очищен стандартными способами данной области техники, такими как колоночная хроматография или градиенты хлорида цезия. Способы очистки векторов rAAV от хелперного вируса известны в данной области техники и включают в себя способы, описанные, например, в Clark *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, *Methods Mol. Med.*, 69 427-443 (2002); патенте США № 6566118 WO 98/09657.

[0069] В другом варианте осуществления, в изобретении рассматриваются композиции, содержащие rAAV согласно данному изобретению. Композиции, описанные в данном документе, включают в себя rAAV в фармацевтически приемлемом носителе. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты являются нетоксичными для реципиентов и предпочтительно являются

инертными в используемых дозах и концентрациях и включают в себя: буферы, такие как фосфатный, цитратный, или на основе других органических кислот; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; полипептиды с низкой молекулярной массой; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, плуроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0070] Титры rAAV, которые будут вводит в способах согласно данному изобретению, будут варьировать в зависимости, например, от конкретного rAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(-ов) клеток, которые будут мишенями, и могут быть определены посредством способов данной области техники. Титры rAAV могут находиться в диапазоне или от около 1×10^6 , около 1×10^7 , около 1×10^8 , около 1×10^9 , около 1×10^{10} , около 1×10^{11} , около 1×10^{12} , около 1×10^{13} до около 1×10^{14} или больше устойчивых к ДНКазам частиц (DRP) в мл. Дозировки могут также выражаться в единицах геномов вируса (гв).

[0071] В изобретении рассматриваются способы трансдукции клетки-мишени с помощью rAAV, *in vivo* или *in vitro*. Способы *in vivo* включают в себя стадию введения эффективной дозы или эффективных многократных доз композиции, содержащей rAAV согласно данному изобретению, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития нарушения/заболевания, введение является профилактическим. Если доза вводится после развития нарушения/заболевания, введение является терапевтическим. В вариантах осуществления изобретения, эффективная доза представляет собой дозу, которая облегчает (устраняет или уменьшает) по меньшей мере один симптом, связанный с состоянием нарушения/заболевания, которое лечат, что

замедляет или предотвращает прогрессирование до состояния нарушения/заболевания, которое замедляет или предотвращает прогрессирование состояния нарушения/заболевания, которое уменьшает степень болезни, что приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или продлевает выживание. Мышечная дистрофия, такая как мышечная дистрофия лимба-пояса представляет собой пример заболевания, которое рассматривается как пригодное для профилактики или лечения способами согласно данному изобретению.

[0072] В данном изобретении также рассматриваются комбинированные терапии. Комбинация, применяемая в данном документе, включает в себя как одновременное лечение, так и последовательное лечение. Специально рассматриваются комбинации способов согласно данному изобретению с стандартными лекарственными терапиями (например, кортикостероидами), как и комбинации с новыми терапиями.

[0073] Терапевтически эффективное количество rAAV вектора представляет собой дозу rAAV в диапазоне от около $1e13$ гв/кг до около $5e14$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $2e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $3e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $4e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $5e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $6e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $7e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $8e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $9e13$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $1e14$ гв/кг, или от около $1e13$ гв/кг до около $2e14$ гв/кг, или от $1e13$ гв/кг до около $3e14$ гв/кг, или от около $1e13$ до около $4e14$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $4e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $5e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $6e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $7e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $8e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $9e13$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $1e14$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $2e14$ гв/кг, или от $3e13$ гв/кг до около $3e14$ гв/кг, или от около $3e13$ до около $4e14$ гв/кг, или от около $3e13$ гв/кг до около $5e14$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $6e13$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около $7e13$ гв/кг, или от около $5e13$ гв/кг до около

8e13 гв/кг, или от около 5e13 гв/кг до около 9e13 гв/кг, или от около 5e13 гв/кг до около 1e14 гв/кг, или от около 5e13 гв/кг до около 2e14 гв/кг, или от 5e13 гв/кг до около 3e14 гв/кг, или от около 5e13 до около 4e14 гв/кг, или от около 5e13 гв/кг до около 5e14 гв/кг, или от около 1e14 гв/кг до около 2e14 гв/кг, или от 1e14 гв/кг до около 3e14 гв/кг, или от около 1e14 до около 4e14 гв/кг, или от около 1e14 гв/кг до около 5e14 гв/кг. Изобретение также включает в себя композиции, содержащие данные диапазоны rAAV вектора.

[0074] Например, терапевтически эффективное количество rAAV вектора представляет собой дозу 1e13 гв/кг, около 2e13 гв/кг, около 3e13 гв/кг, около 4e13 гв/кг, около 5e13 гв/кг, около 6e13 гв/кг, около 7e13 гв/кг, около 8e13 гв/кг, около 9e13 гв/кг, около 1e14 гв/кг, около 2e14 гв/кг, около 3e14 гв/кг, около 4e14 гв/кг и 5e14 гв/кг. Изобретение также включает в себя композиции, содержащие данные дозы rAAV вектора.

[0075] Введение эффективной дозы композиций может осуществляться стандартными путями, которые включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: внутримышечный, парентеральный, внутривенный, пероральный, буккальный, назальный, легочный, внутричерепной, внутрикостный, внутриглазной, ректальный или вагинальный. Путь (и) введения и серотип(ы) компонентов AAV rAAV (в частности, ITR AAV и капсидный белок) согласно данному изобретению могут быть выбраны и/или сопоставлены специалистами в данной области техники, с учетом инфекции и/или состояния болезни, которая подлежит лечению, и целевых клеток/ткани (тканей), которые должны экспрессировать β -саркогликан.

[0076] Согласно данному изобретению предложены местное применение и системное введение эффективной дозы rAAV и композиций согласно данному изобретению. Например, системное введение - это введение в систему кровообращения, чтобы повлиять на весь организм. Системное введение включает в себя энтеральное введение, такое как абсорбция через желудочно-кишечный тракт и парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации.

[0077] В частности, фактическое введение rAAV согласно данному изобретению может быть выполнено с использованием любого физического метода, который будет переносить рекомбинантный вектор rAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно изобретению включает в себя, но не ограничивается лишь этими: инъекцию в мышцу, кровоток и/или непосредственно в печень. Было продемонстрировано, что просто ресуспендирование rAAV в фосфатно-солевом буфере является достаточным для получения переносчика, применимого для экспрессии в мышечной ткани, и нет никаких известных ограничений на носители или другие компоненты, которые могут быть введены совместно с rAAV (хотя для rAAV следует обычным способом избегать композиций, которые разрушают ДНК). Капсидные белки rAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы rAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных препаратов или в виде местных составов, для доставки в мышцы трансдермальным транспортом. Ранее были разработаны многочисленные составы для внутримышечной инъекции и трансдермального транспорта, и они могут быть применены в практике изобретения. rAAV могут быть использованы с любым фармацевтически приемлемым носителем для удобства введения и обращения.

[0078] Для внутримышечной инъекции могут быть использованы растворы в адъюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или водный пропиленгликоль, а также стерильные водные растворы. При желании такие водные растворы могут быть забуференны, а жидкий разбавитель сначала подвергается изотоническому воздействию солевого раствора или глюкозы. Растворы rAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсия rAAV также может быть приготовлена в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и применения

данные препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В связи с этим применяемые стерильные водные среды легко доступны для получения стандартными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

[0079] Лекарственные формы, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии, и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной, и должна быть текучей в той степени, чтобы существовала возможность ее ввести с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси, и растительные масла. Нужную текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, и с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобным. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Продленная абсорбция инъектируемых композиций может быть достигнута за счет применения агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[0080] Стерильные растворы для инъекций получают путем внесения rAAV в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем внесения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков

для приготовления инъеклируемых стерильных растворов, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и метод сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента, плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

[0081] Трансдукция с помощью rAAV также может проводиться *in vitro*. В одном варианте осуществления, желаемые мышечные клетки-мишени удаляют из субъекта, трансдуцируются rAAV и повторно вводят субъекту. Альтернативно, могут применяться изогенные или ксеногенные мышечные клетки, поскольку данные клетки не будут вызывать неуместный иммунный ответ у субъекта.

[0082] Подходящие способы трансдукции и реинтродукции трансдуцированных клеток в субъект известны в данной области техники. В одном варианте осуществления, клетки могут быть трансдуцированы *in vitro* путем объединения rAAV с мышечными клетками, например, в соответствующей среде, и проведен поиск клеток, несущих ДНК интереса, с использованием обычных методов, таких как Саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или с использованием селективных маркеров. Затем трансдуцированные клетки могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций, а композицию вводят субъекту различными способами, такими как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция, или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу, используя, например, катетер.

[0083] Трансдукция клеток с помощью rAAV по изобретению приводит к устойчивой экспрессии микроРНК β -саркогликана. Таким образом, данное изобретение относится к способам введения/доставки rAAV, который экспрессирует β -саркогликан, животному, предпочтительно человеку. Данные способы включают в себя трансдуцирование тканей (включая, но не ограничиваясь лишь тканями, такими как мышцы, органами, такими как печень и мозг, и железами, такими как слюнные железы) одним или большим количеством rAAV согласно данному изобретению. Трансдукция может быть проведена с помощью генных кассет, содержащих специфичные для ткани регуляторные элементы. Например, в одном варианте

осуществления, согласно данному изобретению предложены способы трансдуцирования мышечных клеток и мышечных тканей, управляемые с помощью специфических для мышц регуляторных элементов, включающих в себя, но не ограничивающихся лишь этими: те, которые получены из семейств генов актина и миозина, например, из семейства генов myoD [см. Weintraub *et al.*, *Science*, 251: 761-766 (1991)], специфичный для миоцитов энхансер-связывающий фактор MEF-2 [Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)], регуляторные элементы, полученные из гена актина скелетных мышц человека [Muscat *et al.*, *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], гена актина сердца, последовательности элементов креатинкиназы мышц [см. Johnson *et al.*, *Mol Cell Biol*, 9: 3393-3399 (1989)] и энхансерный элемент мышшиной креатинкиназы (mCK), регуляторные элементы, полученные из гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца и гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон: индуцируемые гипоксией ядерные факторы (Semenza *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5680-5684 (1991)), стероид-индуцибельные элементы и промоторы, включающие в себя глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, *Proc. Natl. Akad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993)) и другие регуляторные элементы.

[0084] Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. В изобретении рассматривается устойчивая экспрессия микроРНК из трансдуцированных миофибрил.

[0085] Под «мышечной клеткой» или «мышечной тканью» подразумевается клетка или группа клеток, полученных из мышц любого вида (например, скелетных мышц и гладких мышц, например, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или сердечной ткани). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, такими как миобласты, миоциты, миотубы, кардиомиоциты и кардиомиобласты.

[0086] Термин «трансдукция» применяется для обозначения введения/доставки полинуклеотида интереса (например,

полинуклеотидной последовательности, кодирующей β -саркогликан) в клетку-реципиент или *in vivo*, или *in vitro*, с помощью rAAV с дефектом репликации согласно изобретению, что приводит к экспрессии β -саркогликана клеткой-реципиентом.

[0087] Таким образом, согласно данному изобретению предложены способы введения пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной дозы (или доз, вводимых, по существу, одновременно или через заданные интервалы) rAAV, который кодирует β -саркогликан.

[0088] Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки в полном объеме, как если бы каждая отдельная публикация или патент был(была) конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки. В случае конфликта данная заявка, включая любые определения в данном документе, будет иметь преимущество права владения.

[0089] Изобретение дополнительно описано в следующих Примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанного в формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

[0090] *Животные модели* - Все процедуры были одобрены Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных Нучно-исследовательского института Национальной детской больницы (протокол AR12-00040). Гетерозиготные мыши B6.129-Sgcb^{tm1Kcam/1J} были приобретены в Jackson Laboratory (Bar Harbor, Мен, США, штаб № 006832). Мышей sgcb^{-/-} получали скрещиванием гетерозиготных мышей. Мышей KO разводили и поддерживали в качестве гомозиготных животных в стандартизованных условиях в Центре животных ресурсов в Научно-исследовательском институте Национальной детской больницы. Мышей удерживали на диете грызунов Teklad Global (еда с 3,8z5 клетчатки, 18,8% белка, 5% жира) с 12:12-часовым циклом тьма-свет. Идентификацию мышей SGCB^{-/-} проводили путем генотипирования с использованием ПЦР. Все животные помещались в стандартные клетки для мышей с пищей и водой в избытке.

[0091] *Конструирование гена бета-саркогликана.*

Полноразмерная кДНК бета-саркогликана человека (номер доступа ГенБанка NM_0034994.3) была кодон-оптимизирована и синтезирована в GenScript Inc, Пискатауэй, Нью-Джерси, США. Оптимизация кодонов с помощью GenScript использует алгоритм, который учитывает параметры, которые включают транскрипцию, процессинг мРНК и стабильность, трансляцию и белковый фолдинг для проектирования последовательности кДНК, которая приводит к максимальной экспрессии в мышечной ткани (www.genscript.com).

[0092] Для конструкции pAAV.tMCK.hSGCB кДНК затем клонировали в плазмиду, содержащую IТА AAV2, и кассета содержала консенсусную последовательность Козак (ССАСС), химерный интрон SV40 и сайт синтетического полиаденилирования (53 п. н.). Рекомбинантный промотор tMCK был любезно предоставлен доктором Сяо Сяо (Университет Северной Каролины). Он представляет собой модификацию ранее описанного промотора СК627 и содержит модификацию в энхансере выше промоторной области, содержащей сайты связывания факторов транскрипции. Энхансер состоит из двух E-боксов (правого и левого). Модификация промотора tMCK включает в себя мутацию, преобразующую левый E-box в правый E-box (модификация 2R) и вставку 6 п. н. (модификация S5). Вектор pAAV.tMCK.hSGCB был сконструирован путем лигирования фрагмента KpnI/XbaI 1040 п. н. из pUC57-BSG (Genscript Inc.) в сайты KpnI/XbaI pAAV.tMCK.hSGCA (26).

[0093] Вектор pAAV.MHCK7.hSGCB был сконструирован путем удаления промотора tMCK и химерного интрона SV40 по сайтам NotI/KpnI и вставки амплифицированного с помощью ПЦР фрагмента, содержащего промотор MHCK7 и идентичный химерный интрон SV40 в сайты NotI/KpnI. MHCK7 является промотором на основе MCK, который использует энхансер 206 п.н., взятый из примерно 1,2 кб 5' сайта начала транскрипции в гене креатинкиназы эндогенных мышц с проксимальным промотором (enh358MCK, 584-bp)^{3,12}. Сам промотор MHCK7 содержит данную модифицированную кассету СК7 из семейства генов MCK, лигированных с 188 п. н. α -MyHC (тяжелая цепь α -миозина) энхансером 5' части СК для усиления экспрессии в

сердце12. Часть промотора креатинкиназы (СК) на 96% идентична между tMCK и MCK7. Наконец, вектор pAAV.MCK7.hSGCB был сконструирован путем лигирования фрагмента 960 п. н. NotI/KpnI MCK7+интрон из pAAV.MCK7.DYSF5'DV44 в сайты NotI/KpnI pAAV.tMCK.hSGCB (Pozgai et al., *Gene Ther.* 23: 57-66, 2016)

[0094] *Получение rAAV.* Для создания rAAV вектора был применен модифицированный подход к перекрестной упаковке, ранее описанный Rodino-Kларас et al. (*J. Trans. Med.* 5:45, 2007). Здесь способ тройной трансфекции с осаждением CaPO₄ клеток HEK293 позволяет упаковывать ITA AAV2 в капсид AAV другого серотипа (28,29). Полученные плазмиды представляли собой: (i) pAAV.tMCK.hSGCB или pAAV.MCK7.hSGCB, (ii) модифицированные AAV хелперные плазмиды rep2-caprh.74, кодирующие cap изолята rh.74 подобного серотипу 8, и (iii) типа 5 аденовируса хелперную плазмиду (pAdhelper), экспрессирующую гены аденовируса E2A, E4 ORF6 и VA I/II РНК. Векторы очищали и титр инкапсулированных гв (применяя детекторную систему Prism 7500 Taqman, PE Applied Biosystems, Карлсбад, Калифорния, США) определяли, как описано ранее (30). Праймер и флуоресцентный зонд были нацелены на промотор tMCK и представляли собой: форвардный праймер tMCK, 5'-ACC CGA GAT GCC TGG TTA TAA TT-3' (SEQ ID NO: 10); реверсный праймер tMCK, 5'-TCC ATG GTG TAC AGA GCC TAA GAC-3' (SEQ ID NO: 11); и tMCK-зонд, 5'-FAM-CTG CTG CCT GAG CCT GAG CGG TTA C-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 12). Праймер и флуоресцентный зонд были нацелены на промотор MCK7 и представляли собой: форвардный праймер MCK7, 5'-ССА АСА ССТ GCT GCC ТСТ ААА-3' (SEQ ID NO: 16); реверсный праймер MCK7, 5'-GTC CCC САС АСГ СТТ GTT C-3' (SEQ ID NO: 17); и MCK7-зонд, 5'-FAM-TGG ATC CCC-Zen-TGC ATG CGA AGA TC-3IABKFQ-3' (SEQ ID NO: 18).

[0095] *Внутримышечная доставка генов.* Для внутримышечной инъекции мышей анестезировали и удерживали под 1-4% изофлураном (в O₂). Передний отдел нижней левой конечности мышей SGCB^{-/-} в возрасте 4-6 недель был очищен с помощью 95% EtOH, после чего в поперечную брюшную мышцу (ТА) вводили 3 × 10¹¹ гв scAAVrh.74.tMCK.hSGCB, разведенного в физиологическом растворе,

в объеме 30 мкл с использованием сверхтонкого инсулинового шприца 30 калибра. Контралатеральная мышца оставалась необработанной, чтобы служить контролем. Мышцы ТА из обеих конечностей выдалаили либо 6 (n=9, 4 самца, 5 самок), либо 12 (n=6, 4 самца, 2 самки) недель после инъекции для оценки эффективности переноса генов. В экспериментах с 6-месячными мышами (n=5, 5 самцов) лечение состояло из внутримышечной инъекции в левую ТА 3×10^{11} гв scAAVrh.74.tMCK.hSCGB. Для экспериментов по изолированной перфузии конечностей мышам *sgcb^{-/-}* впрыскивали в возрасте 4 (n=5, 5 самцов) и 5 (n=4, 2 самца, 2 самки) недель 5×10^{11} гв scAAVrh.74.tMCK.hSCBB путем инъекции в бедренную артерию, как описано ранее (19). Животные были подвергнуты эвтаназии и мышцы были проанализированы через 8 недель после переноса гена.

[0096] *Системная доставка генов:* системная доставка была достигнута путем инъекции вектора в хвостовую вену мышей *sgcb^{-/-}*. Мышам вводили 1×10^{12} гв scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, разведенного в физиологическом растворе, в объеме 212 мкл с использованием ультратонкого шприца для инсулина 30 калибра. Мышей обездвигивали в удерживающей трубке, помещая хвост обратно через хвостовой паз, чтобы согреть его, чтобы расширить кровеносные сосуды для облегчения инъекции. После нахождения артерии по центральной линии хвоста инъекцию выполняли в одну из фиолетовых/синих боковых вен, которые проходят вдоль хвостовой артерии. Всех обработанных мышей инъецировали в возрасте 4–5 недель и подвергали эвтаназии через 6 месяцев после инъекции.

[0097] *Производство силы EDL и защита от эксцентрических сокращений.* Был выполнен физиологический анализ мышц EDL у мышей, обработанных путем изолированной перфузии (ILP). Мышцы EDL из обеих нижних задних конечностей обработанных мышей были иссечены по сухожилиям и были подвергнуты физиологическому протоколу для оценки функции, которая была ранее описана нашей лабораторией и другими (19, 31) с некоторыми адаптациями. Во время протокола эксцентричного сокращения процедуру 5% растяжения-повторного удлинения выполняли от 500 до 700 мс (5%

растягивается в течение 100 мс, а затем возвращается к оптимальной длине за 100 мс). После протокола для тетануса и эксцентричного сокращения мышцу выдаляли, взвешивали в мокром состоянии, размещали в зажимочном устройстве с использованием трагаканта, а затем замораживали в метилбутане, охлажденном в жидком азоте.

[0098] *Производство силы ТА и защита от эксцентрических сокращений.* Протокол оценки функциональных результатов мышцы ТА выполняли на мышцах, выделенных из мышей, получавших IM инъекцию. Данная процедура ТА описана в нескольких предыдущих исследованиях (32, 33). После эксцентрических сокращений мышей подвергали эвтаназии, и НА мышцу иссекали, взвешивали и замораживали для анализа. Анализ данных выполнялся вслепую, но не случайным образом.

[0099] *Иммунофлуоресценция.* Криосрезы (12 мкм) инкубировали с моноклональным анти-человеческий бета-саркогликан первичным антителом (Leica Biosystems, Нью Касл, Великобритания; кат. № NCL-Lb-SARC) при разведении 1:50 в блокирующем буфере (1 × TBS (ТРИС-буферизированный физраствор), 10% козьей сыворотки, 0,1% Tween) в течение 1 часа при комнатной температуре во влажной камере. Срезы затем промывали TBS три раза, каждая промывка 20 мин, и повторно блокировали в течение 30 мин. Конъюгированное с AlexaFluor 594 козье анти-мышиный IgG1 вторичное антитело (Life Technologies, Остров Гранд, Нью-Йорк, США; кат. № A21125) применяли при разведении 1:250 в течение 45 мин. Срезы промывали в TBS три раза, каждая промывка 20 мин, и закрепляли с помощью среды для заливки (Vector Laboratories, Бурлингем, Калифорния, США). Четыре случайных ×20 изображений, охватывающих четыре разных сектора мышцы, были получены с использованием камеры Zeiss AxioCam MRC5. Процент волокон, положительных по окрашиванию бета-саркогликана (450% интенсивности окрашивания мышечной мембраны), определяли для каждого изображения и усредняли для каждой мышцы.

[00100] *Анализ вестерн-блоттингом.* Срезы тканей левой обработанной мышцы ТА и правой контралатеральной мышцы ТА

(толщиной 20–20 микрон) собирали в микроцентрифуге и гомогенизировали 100 мкл буфера для гомогенизации (125 mM Трис-HCl, 4% SDS, 4 M мочевины) в присутствии 1 таблетки смеси ингибиторов протеаз (Roche, Индианаполис, Индиана, США). После гомогенизации образцы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин при 4 °C. Количество белка определяли на NanoDrop (Thermo Scientific, Волтгем, Массачусетс, США). Образцы белка (20 мкг) подвергали электрофорезу в 3–8% полиакриламидном Tris-ацетатном геле (NuPage, Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) в течение 1 ч 5 мин при 150 В и затем переносили на мембрану PVDF (Amersham Biosciences, Пискатауэй, Нью-Джерси, США) в течение 1 ч 15 мин при 35 В. Мембрану блокировали в 5% обезжиренном сухом молоке в TBST (TBS с Tween 20) в течение 1 часа, а затем инкубировали с кроличьим поликлональным анти-человеческий бета-саркогликан антителом (Novus Biologicals, Литлтон, Колорадо, США; кат. № NBP-1-90300 разведение 1:100 или 1:250) и 1:5000 моноклональным анти-мышиный гамма-тубулин антителом (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США; кат. № T6557) или разведенным 1:5000 мышиным моноклональным анти-мышиный α -актинин антителом (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США; кат. № A7811). Применяли разведение 1:500 кроличьих поликлональных анти-мышиный тропонин I сердца антител (Abcam, Кембридж, Массачусетс; кат. № ab47003) и разведение 1:1000 кроличьего анти-мышиный винкулин моноклонального антитела (Invitrogen, Фредерик, Мериленд; кат. № 70062). Для иммунодетекции ECL (Enhanced chemiluminescence, усиленная хемолюминесценция) применяли анти-мышиные (Millipore, Биллерика, Массачусетс, США, кат. № AP308P) и анти-кроличьи (Life Technologies, кат. № 656120), вторичные HRP (пероксидаза хрена) антитела.

[00101] Анализ EBD. Дозу 3×10^{10} гв sCAAVrh.74.tMCK.hSGCB вводили 4-недельным мышам sgcb^{-/-} в левую ТА внутримышечной инъекцией. Через 4 недели после инъекции мышей инъецировали в внутрибрюшинную полость с правой стороны 5 мкл/г массы тела стерилизованного фильтром 10 мг/мл EBD (краситель голубой эванс) в 1x фосфатном буферном растворе. Затем мышей умерщвляли через

24 часа после инъекции, а ткани собирали и нарезали. Срезы фиксировали в холодном ацетоне в течение 10 мин, а затем использовали протокол иммунофлюоресценции для окрашивания бета-саркогликана человека.

[00102] *Морфометрический анализ.* Диаметры мышечных волокон и процент мышечных волокон с центрально расположенными ядрами определяли по мышцам TA и GAS, окрашенных гематоксилином и эозином (ГиЭ). Четыре случайных $\times 20$ изображений для каждого среза для каждого животного были получены с помощью камеры Zeiss AxioCam MRC5. Центально-нуклеированные волокна определяли количественно с использованием программного обеспечения NIH ImageJ (Бэтеда, Мэриленд, США). Диаметры волокон измеряли как самый короткий диаметр через мышечное волокно с использованием программного обеспечения Zeiss Axiovision LE4 (Carl Zeiss Microscopy, Мюнхен, Германия).

[00103] *Анализ биораспределения с помощью количественного ПЦР.* Применяли количественную ПЦР Taqman для определения количества копий геномов вектора, присутствующих в контралатеральной мышце мишени и не-мишени, а также органах-не-мишенях, как было описано выше (18, 30). Набор вектор-специфичного праймера-зонда применяли для амплификации последовательности интронной области непосредственно ниже промотора tMCK, которая является уникальной и расположенной в трансгенной каскаде scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. В данном исследовании применяли следующие праймеры и зонд: форвардный праймер к tMCK и MHC7 5'-GTG AGG CAC TGG GCA GGT AA -3' (SEQ ID NO: 13); реверсный праймер к интрону tMCK и MHC7 5'-ACC TGT GGA GAG AAA GGC AAA G -3' (SEQ ID NO: 14); и зонд к интрону tMCK и MHC7 5'-6FAM-ATC AAG GTT ACA AGA CAG-GTT TAA GGA GAC CAA TAG AAA-tamra-3' (IDT) (SEQ ID NO: 15). Количество копий подается как количество геномов вектора на микрограмм геномной ДНК.

Иммуногистохимия для окрашивания иммунных клеток. Применяли иммуногистохимию для идентификации иммунных клеток. Замороженные срезы тканей на заряженных слайдах микроскопа Fisherbrand Superfrost инкубировали с крысиными моноклональными анти-

мышинными моноклональными антителами с использованием набора HRP детекции анти-крысиный Ig (BD Pharmagen, Сан-Хосе, Калифорния, США, кат. № 551013): CD3 (кат. № 555273), CD4 (м 550280), CD8 (кат. № 550281) и Mac-3 для макрофагов (кат. № 550292). Все первичные антитела разводили 1:20 фосфатно-солевым буфером. Положительное иммуноокрашивание визуализировали с использованием DAB-хромагена, разведенного в DAB-буфере, с помощью Streptavidin-HRP-пероксидазы векстатин ABC пероксидазы. Были получены десять случайных $\times 40$ изображений для каждой мышцы и каждое соответствующе окрашено. Количество моноядерных клеток подсчитывалось и выражалось как общее число на мм^2 .

[00104] *Окрашивание пикросириус красным и количественное определение коллагена.* Замороженные срезы, размещенные на заряженных слайдах микроскопа Fisherbrand Superfrost, фиксировали в 10% нейтрально забуференном формалине в течение 5 мин, затем промывали в дистиллированной воде. Затем слайды инкубировали в растворе А (фосфомолибденовой кислоты) из набора окрашивания пикросириус красным (Polysciences Inc., Уоррингтон, Пенсильвания, США, кат. № 24901) в течение 2 мин. После тщательной промывки в дистиллированной воде слайды помещали в раствор В (Direct Red 80/2 4 6-Тринитрофенол) на 15 минут с последующим дополнительным промыванием в дистиллированной воде, и затем инкубировали в растворе С (0,1 N гидрохлорид) в течение 2 мин. Слайды докрашивали в течение 2,5 мин с помощью 1% Fast Green в 1% ледяной уксусной кислоте от Poly Scientific (кат. № S2114), используя разведение 1:10 в деионизированной воде. Наконец, слайды снова промывали в дистиллированной воде, дегидратировали в серийно разведенном этаноле, очищали в ксилоле и накрывали покровным стеклом применяя среду Cytoseal 60 от Thermo-Scientific (Вогтгем, Массачусетс, США, кат. № 8310). Изображения были сделаны с использованием программного обеспечения AxioVision 4.9.1 (Carl Zeiss Microscopy). Для анализа окрашивания сириус красным и подсчета % коллагена контраст между красным и зеленым цветами был усилен с использованием Adobe Photoshop. Был выбран плагин деконволюции

цвета в программе ImageJ и был использован вариант деконволюции цвета RGB. Изображение Red включает в себя все соединительные ткани, окрашенные сириус красным. Изображение Green включает в себя все мышцы при контрастном окрашивании Fast Green. Использовались только изображения Red и исходное изображение. Затем к изображениям был применен порог генерации для получения черно-белых изображений с областями, положительными по коллагену в черном цвете и отрицательными областями в белом цвете. Используя функцию измерения, рассчитывали площадь коллагена. Затем общую площадь ткани определяли путем преобразования исходного изображения в «8-бит» и регулировки порога до 254, который является на единицу ниже полностью насыщенного изображения. Затем общую площадь ткани измеряли, как было сделано ранее, и записывали общую площадь. Процент коллагена затем рассчитывали путем деления площади коллагена на общую площадь ткани. Затем вычисляли средний процент для каждого индивида.

[00105] *Тетаническое сокращение диафрагмы для функциональной оценки:* Мышей подвергали эвтаназии и диафрагму отсекали от креплений с ребрами, а центральное сухожилие оставляли нетронутым, и помещали в буфер К-Н, как описано ранее Beastro et al. (*Am. J. Pathol.* 179: 2464-74, 2011), Rafael-Forney et al. (*Circulation* 124: 582-8, 2011) и Moorwood et al. (*J. Visualized Experiments* 71:e50036, [год?]). Была получен срез диафрагмы шириной 2-4 мм. Полоски диафрагмы были крепко обплетены хирургическим шелком (6/0, Surgical Specialties, Reading, PA) по центральному сухожилию и сшиты через часть реберной кости, прикрепленной к дистальному концу полосы. Каждую мышцу переносили на водяную баню, заполненную кислородсодержащим раствором К-Н, который поддерживали при 37 °C. Мышцы были выровнены горизонтально и привязаны непосредственно между неподвижным штифтом и двухмодовым преобразователем силы-серводвигателем (305C; Aurora Scientific, Аврора, Онтарио, Канада). Два платиновых пластинчатых электрода были помещены в ванну для органа так, чтобы охватывать длину мышцы. Мышцу

растягивали до оптимальной длины для измерения одиночных сокращений, и затем оставляли на 10 минут до начала тетанического протокола. Как только мышца стабилизировалась, мышцу размещали при оптимальной длине 1g и подвергали разминке, которая состояла из трех 1 Гц дерганий каждые 30 секунд, за которыми следовали три 150 Гц дергания каждую минуту. После 3-минутного периода покоя диафрагму стимулировали при 20, 50, 80, 120, 150, 180 Гц, обеспечивая период покоя в 2 минуты между каждым стимулом, каждый с длительностью 250 мс для определения максимальной тетанической силы. Измеряли длину и массу мышц. Сила была нормирована по мышечному весу и длине.

[00106] *Магнитно-резонансная томография сердца*: сердечную функцию анализировали с использованием системы визуализации магнитным резонансом (МРТ) 9,4Т и объемной катушки для мыши (Bruker BioSpin, Биллерика, Массачусетс, США). Мышей анестезировали 2,5% изофлуораном, смешанным с карбогеном (1 л/мин) в течение 3 минут перед размещением на сканирующей кровати. При размещении мышей в сканирующем аппарате и начале визуализации смесь изофлуран/карбоген снижали до 1,5% в течение оставшейся части исследования. ЭКГ и дыхание контролировали с использованием МРТ-совместимой системы (Модель 1025, Small Animal Instruments, Стонибрук, Нью-Йорк, США). T1-взвешенные изображения cine FLASH короткой оси сердца при синхронизации были получены для всего левого желудочка (LV) мыши (TR=8 мс, TE=2,8 мс, $\alpha=180^\circ$, матрица=256 × 256, FOV=3,0 × 3,0 см, толщина среза=1 мм, число срезов=7, вплоть до 20 кадров на сердечный цикл). Для анализа изображения были идентифицированы конечная диастолическая и конечная систолическая точки времени каждого изображения по малой оси, а эндокардиальная и эпикардиальная сердечные границы были отслежены вручную. Папиллярные мышцы были исключены из эндокардиальной границы LV (левый желудочек). Из этих измеренных зон рассчитывали конечный диастолический объем (EDV), конечный систолический объем (ESV), ударный объем (SV), минутный объем сердца (CO), фракцию выброса (EF) и среднюю массу LV.

[00107] *Иммунофлуоресценция*: Замороженные срезы (12 мкм) передней большеберцовой мышцы (ТА), икроножной мышцы (ГАС), четырехглавой мышцы (QUAD), поясничной мышцы (ПСОАС), ягодичной мышцы (GLUT), трицепса (TRI) и диафрагмы вместе с сердцем подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию на трансген hSGCB с помощью нашего ранее использованного протокола, как описано в Pozgai et al., Gene Therap. 23: 57-66, 2016. Срезы инкубировали с мышинным моноклональным анти-человеческий бета-саркогликан первичным антителом (Leica Biosystems, Нью Касл, Великобритания; кат. № NCL-Lb-SARC) при разведении 1:100. Четыре случайных $\times 20$ изображений, охватывающих четыре разных сектора мышцы, были получены с использованием камеры Zeiss AxioCam MRC5. Процент волокон, положительных по окрашиванию бета-саркогликана (>50% окрашивания мышечной мембраны) определяли для каждого изображения и усредняли для каждой мышцы.

[00108] *Морфометрический анализ*: окрашивание гематоксилином и эозином (ГиЭ) проводили на 12 мкм криосрезах мышц из 7-месячных мышей C57BL6 ДТ (n=5), мышей $sgcb^{-/-}$ (n=5) и обрабатываемых 6 месяцев rAAV.MHCK7.hSGCB мышей $sgcb^{-/-}$ (n=5) для анализа. Процент миофибрил с центральными ядрами определяли в мышцах ТА, GAS, QUAD, PSOAS, GLUT, TRI и диафрагме. Кроме того, диаметры мышечных волокон измеряли в мышцах GAS, PSOAS, и TRI. Четыре случайных $\times 20$ изображений для каждой мышцы для каждого животного были получены с помощью камеры Zeiss AxioCam MRC5. Подсчитывали центрально-нуклеированные волокна с использованием программного обеспечения NIH ImageJ и диаметры волокон измеряли применяя программное обеспечение Zeiss Axiovision LE4.

[00109] *Рентгеновские снимки*: рентгеновские снимки всего тела получали на анестезированных 7-месячных мышях C57BL6 ДТ (n=6), необработанных мышях $sgcb^{-/-}$ (n=6) и обрабатываемых 6 месяцев rAAV.MHCK7.hSGCB мышях $sgcb^{-/-}$ (n=6) с использованием цифровой рентгеновской системы Faxitron MX-20 при 26 кВ в течение 3 секунд (Faxitron X-Ray Corp, Линкольншир, США).

[00110] *Лазерный мониторинг активности в клетках с открытым пространством*: для определения общей активности

экспериментальных мышей применяли камеру активности в открытом пространстве. Мышей в возрасте 7 месяцев из контрольных групп C57BL6 ДТ (n=6) и необработанных *sgcb*^{-/-} (n=6) вместе с обрабатываемыми 6 месяцев rAAV.MHCK7.hSGCB мышами *sgcb*^{-/-} (n=6) подвергали анализу в соответствии с ранее описанным протоколом (Kobayashi et al., *Nature* 456: 511-5, 2008, Beastro et al., *Am. J. Pathol.* 179: 2464-74, 2011) с несколькими модификациями. Все мыши были протестированы в одно и то же время дня ранним утром, а затем в конце ночного цикла, когда мыши наиболее активны. Всех мышей тестировали в изолированной комнате, при тусклом свете, и это делал один и тот же человек каждый раз. Чтобы уменьшить беспокойство и свести поведенческие изменения к минимуму, что может потенциально повлиять на нормальную активность мышей и, следовательно, результаты анализа, тестируемых мышей не размещали индивидуально (Voikar et al., *Genes Brain Behav.* 4: 240-52, 2005). За активностью мышей наблюдали применяя Photobeam Activity System (San Diego Instruments, Сан-Диего, Калифорния). Эта система использует сетку невидимых инфракрасных световых лучей, которые пересекают камеру сверху и донизу, и справа на лево, чтобы наблюдать за позицией и движением мыши в плоскостях XYZ. Активность регистрировали в течение 1 ч с 5-минутными интервалами. Мышей предварительно приспособливали к комнате тестирования активности в течение начальной 1-часовой сессии за несколько дней до начала сбора данных. Мышей тестировали в индивидуальных камерах по 4 за раз. Оборудование для тестирования чистили каждый раз перед применением, чтобы снизить реакционные поведенческие отклонения у мышей, которые могли бы изменить наши результаты. Собранные данные были преобразованы в рабочий лист Microsoft Excel, и все вычисления были выполнены в программе Excel. Отдельные прерывания лучей при движении в плоскостях X и Y были добавлены для каждой мыши, чтобы воспроизвести общую способность к передвижению, а прерывания лучей в плоскости Z были добавлены для получения вертикальной активности в течение 1-часового периода времени.

Пример 1 конструкция scAAVrh.74.tMCK.hSGCB и эффективность вектора

[00111] Была сконструирована трансгенная кассета, содержащая полноразмерную кодон-оптимизированную кДНК человеческого SCGB, как показано на Фиг. 1А. Кассета включает в себя консенсусную последовательность Козак (ССАСС), химерный интрон SV40, синтетический сайт полиаденилирования и специфичный для мышц промотор tMCK (20), применяемый для управления экспрессией кассеты. Кассета была упакована в самокомплементарный (sc) AAV вектор rh.74, который на 93% гомологичен AAV8. Было показано, что AAVrh.74 является безопасным и эффективным в мышцах и приматах, отличных от человека, особенно при преодолении сосудистого барьера, при доставке в мышцу через систему кровообращения (17, 18, 21). Эффективность вектора была установлена путем внутримышечной инъекцией в левую ТА мышцы Sgcb-null. Доставка 3×10^{10} гв трансдуцировала $70,5 \pm 2,5\%$ мышечных волокон, и 1×10^{11} гв трансдуцировала $89,0 \pm 4,0\%$ мышечных волокон, через 3 недели после переноса гена.

Пример 2 Внутримышечная доставка scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

[00112] После тестирования эффективности вектора, исследования были расширены, чтобы проанализировать эффективность терапии через 6 и 12 недель после переноса гена. В результате высокого уровня экспрессии после короткого 3-недельного исследования эффективности, для применения в последующих исследованиях была выбрана наиболее низкая эффективная общая доза 3×10^{10} гв. Пятинедельных мышей sgcb^{-/-} обрабатывали 3×10^{10} гв scAAVrh.74.tMCK.hSCGB внутримышечно в левую поперечную брюшную мышцу (ТА) и экспрессия β -саркогликана была продемонстрирована с использованием иммунофлуоресценции в $88,4 \pm 4,2\%$ мышечных волокон через 6 недель после инъекции (n=9), и в $76,5 \pm 5,8\%$ мышечных волокон через 12 недель после инъекции (n=6), и экспрессия была подтверждена посредством вестерн-блоттинга (Фиг. 1В). Экспрессия β -саркогликана сопровождалась восстановлением компонентов белкового комплекса, связанных с дистрофином (α -саркогликан и дистрофин) (Фиг. 1С). Применяя

краситель голубой эванс (EBD - Evans blue dye) в качестве маркера проницаемости мембраны (22, 23), мы обнаружили, что все волокна, экспрессирующие экзогенный β -саркогликан, были защищены от утечки и включения EBD (Фиг. 1D). Мышцы из мышей $sgcb^{-/-}$ показали сильную мышечную дистрофию с центрально-нуклеированными волокнами, частым некрозом мышечных волокон, фиброзной тканью и значительной изменчивостью размера волокон, представленную как атрофическими, так и гипертрофическими волокнами (3, 4). Как показано на Фиг. 2A, окрашивание гематоксилином и эозином демонстрирует общее улучшение дистрофического фенотипа пораженной мышцы, включая восстановление центральных ядер (необработанные $sgcb^{-/-}$ - $76,8 \pm 2,3\%$ по сравнению с обработанным AAV.hSCGB - $38,86 \pm 3,5\%$, $P < 0,0001$) (Фиг. 2C). Также наблюдалась нормализация распределения размеров волокон с увеличением среднего диаметра волокна после обработки (необработанные $sgcb^{-/-}$ - $32,6 \pm 0,31$ мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - $35,56 \pm 0,22$ мкм, $P < 0,0001$) (Фиг. 2D).

[00113] Гистопатологическим отличительным признаком мышцы $scgb^{-/-}$ является фиброз, характеризующийся обширной заменой мышечной ткани в основном коллагенами наряду с другими внеклеточными матричными компонентами, такими как фибронектин, эластин, ламинин и декорин (14). Эта замена мышечной ткани соединительной тканью является вызовом для потенциальной ценности замены генов и может ограничить степень улучшения (24). Для проверки этого, мышцей, которых лечили в течение 12 недель, анализировали на предмет уменьшения фиброза. Специально оценивали мышцу TA, поскольку ее наследуемая степень фиброза была воспроизведена в модели KO, и потому, что она представляет собой потенциальную мишень геной доставки с помощью ILV через сосуды. Окрашивание пикросириус красным коллагена типов I и III мышц TA показало значительное снижение (52,74%) количества коллагена, присутствующего в обработанных $scAAVrh.74.tMCK.hSGCB$ мышцах, по сравнению с необработанными мышцами мышцей $sgcb^{-/-}$ ($20,7 \pm 0,57\%$ по сравнению с $43,8 \pm 2,3\%$, обработанные AAV.hSGCB против

необработанных $sgcb^{-/-}$ соответственно, $P < 0,0001$) (Фиг. 2b и e). Необработанная мышца мышей $sgcb^{-/-}$ в возрасте 5 недель на момент инъекции имела $24,05 \pm 1,5\%$ отложения коллагена, что указывает на небольшое (14,0%) снижение количества коллагена после 12 недель лечения.

Пример 3 Исправление функции в скелетных мышцах после генного переноса scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

[00114] Чтобы определить, может ли перенос гена hSGCB улучшать мышечную функцию, мы провели оценивание функциональных свойств мышцы TA у мышей $sgcb^{-/-}$, обработанных scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. После внутримышечной доставки 3×10^{10} гв scAAVrh.74.tMCK.hSGCB в TA 4-недельных мышей $sgcb^{-/-}$, через 6 недель после обработки мышцы TA были подвергнуты измерениям силы *in situ* (n=4). Обработанные мышцы сравнивались с необработанными контралатеральными мышцами и теми из мышей C57BL/6 ДТ. Обработанная scAAVrh.74.tMCK.hSGCB мышца показала значительное улучшение как абсолютной тетанической силы, так и нормированной удельной силы (Фиг. 3A и B). Обработанные мышцы имели среднюю абсолютную силу $1436,9 \pm 199,5$ мН по сравнению с $770,9 \pm 118,3$ мН необработанных контрольных $sgcb^{-/-}$ ($P < 0,01$). Аналогично, обработанные мышцы TA производили среднюю удельную силу, составляющую $254,01 \pm 6,9$ мН/мм², а необработанные мышцы производили $124,2 \pm 13,9$ мН/мм² силы ($P < 0,01$). Наконец, мышцы, обработанные scAAVrh.74.tMCK.hSGCB, показали большую устойчивость к травме, вызванной сокращением, по сравнению с необработанными контрольными мышцами (Фиг. 3C). Обработанные мышцы TA потеряли $34,0 \pm 5,1\%$ силы, произведенной после первого сокращения, тогда как необработанная больная мышца потеряла $54,1 \pm 3,8\%$ ($P < 0,01$) силы после выполнения протокола эксцентрического сокращения. Эти данные показывают, что перенос гена hSGCB действительно обеспечивает функциональное улучшение в подверженной болезни мышце, недостаточной по β -саркогликану.

Пример 4 Лечение старых мышц с помощью scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

[00115] Исследования прогрессирования заболевания в данной мышинной модели LGMD2E показали, что хотя наиболее тяжелое ремоделирование тканей в мышцах происходит между 6 и 20 неделями, гистопатология мышцы продолжает ухудшаться с возрастом, напоминая прогрессирование заболевания у пациентов (3, 4, 14). Следовательно, для имитации клинической ситуации, когда лечение будет осуществляться в более старшем возрасте при более развитых мышечных повреждениях и эндомиоциальном фиброзе, мы лечили 6-месячных мышей $sgcb^{-/-}$ (n=5) внутримышечно в ТА с помощью 3×10^{10} гв scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. После 12 недель лечения, в возрасте 9 месяцев, $80,1 \pm 4,8\%$ мышечных волокон были трансформированы (Фиг. 4А). Окрашивание пикросириус красным коллагена типов I и III показало значительное снижение $42,2\%$ количества коллагена, присутствующего в обработанных мышцах, по сравнению с необработанной мышцей мыши $sgcb^{-/-}$ (обработанные AAV.hSGCB - $20,0 \pm 0,80\%$ по сравнению с необработанной $sgcb^{-/-}$ - $34,6 \pm 1,4\%$, $P < 0,0001$) (Фиг. 4В и С). В возрасте лечения, 6-месячные $sgcb^{-/-}$ мыши имели $30,8 \pm 2,0\%$ отложения коллагена (n=4, 4 самцы); таким образом, данные результаты показывают, что лечение с помощью scAAVrh.74.tMCK.hSGCB не только предотвращает, но также имеет потенциал для устранения существующего фиброза.

Пример 5 ILP scAAVrh.74.tMCK.hSGCB у мышей $sgcb^{-/-}$

[00116] Возможность делать мишенями несколько мышц на одной конечности делает возможным более клинически релевантный метод доставки для переноса пациентам LGMD2E. Доставку 5×10^{11} гв scAAVrh.74.tMCK.hSGCB ILP в 4-6-недельных мышей $sgcb^{-/-}$ (n=9, 7 самцов, 2 самки) анализировали через 2 месяца после переноса гена. Экспрессия β -саркогликана достигала $91,8 \pm 4,7\%$ волокон в икроножной мышце (GAS) и $90,6 \pm 2,8\%$ в ТА (Фиг. 5А). ILP-доставка scAAVrh.74.tMCK.hSGCB привела к значительному повышению защиты от повреждения, вызванного эксцентрическим сокращением ($P < 0,05$), которое не отличалось от ДТ, по сравнению с необработанными контралатеральными мышцами (Фиг. 5С). Доставка через сосуды также восстановила гистопатологические параметры мышц (Фиг. 5В).

Центральные ядра были уменьшены в ТА (необработанные $sgcb^{-/-}$ - $76,9 \pm 2,8\%$ по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - $23,2 \pm 5,7\%$, $P < 0,001$) и GAS (необработанные $sgcb^{-/-}$ - $78,2 \pm 2,4\%$ по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - $16,8 \pm 6,6\%$, $P < 0,001$). Перенос гена также приводил к увеличению среднего размера волокна в ТА (необработанные $sgcb^{-/-}$ - $30,53 \pm 0,52$ мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - $41,9 \pm 0,46$ мкм, $P < 0,0001$) и GAS (необработанные $sgcb^{-/-}$ - $38,9 \pm 0,37$ мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - $33,3 \pm 0,44$ мкм, $P < 0,0001$), с нормализацией распределения диаметра волокна. Наблюдали существенное уменьшение (примерно 60%) числа клеток CD3, клеток CD4 и макрофагов (Таблица 1).

Таблица 1. Иммунный ответ в ILP-обработанных scAAVrh.74.tMCK.hSGCB мышей

Тип клетки	Обработанная	Необработанная	Неинъецированные
	левая ТА клеток/мм ²	правая ТА клеток/мм ²	ТА $SGCB^{-/-}$ клеток/мм ²
CD3	$15,6 \pm 3,2$	$37,85 \pm 6,2$	$29,8 \pm 1,7$
CD4	$20,9 \pm 4,7$	$58,1 \pm 2,9$	$49,0 \pm 0,8$
CD8	$8,2 \pm 1,8$	$12,7 \pm 2,4$	$15,5 \pm 5,8$
Макрофаг	$28,2 \pm 5,0$	$75,2 \pm 5,6$	$100,2 \pm 5,9$

Аббревиатуры: ДА, дисперсионный анализ; ILP, изолированная перфузия конечности; SGCB, β -саркогликан; ТА, передняя большеберцовая мышца. Подсчет количества иммунных клеток, представленных в неинъецированных мышцах $SGCB^{-/-}$, и мышцах обработанных и необработанных scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. Показаны данные после ILP-доставки вируса, и представляют среднее число клеток/мм² \pm с.о.с., n=8 в группе. Односторонний дисперсионный анализ применяли для сравнения значений из трех разных групп. Количество иммунных клеток были уменьшены с статистически достоверной разницей ($P < 0,01$) между обработанной левой ТА, и необработанной правой ТА и/или обработанной левой ТА и неинъецированной ТА у всех штаммах за исключением для CD8.

[00117] Окрашивание пикросириус красным мышц ТА и GAS также

показало значительное снижение количества коллагена по сравнению с необработанной мышцей *sgcb^{-/-}* после доставки через сосуды (Фиг. 6а). Уровни коллагена в ТА уменьшались до $21,6 \pm 1,3\%$ в обработанной мышце по сравнению с $40,2 \pm 1,5\%$ у необработанных *sgcb^{-/-}* мышцей в возрасте конечной точки исследования ($P < 0,0001$). Как указывалось ранее, у мышцей *sgcb^{-/-}* в возрасте инъекции было $24,1 \pm 1,5\%$ коллагена в мышце ТА, что указывало на небольшое снижение (10,0%) отложения коллагена после 8 недель лечения. Аналогично, окрашивание мышцы GAS показало, что у обработанных мышцей было $22,9 \pm 0,99\%$ коллагена по сравнению с $37,9 \pm 1,3\%$ у необработанных мышцей *sgcb^{-/-}* в конечной точки исследования ($P < 0,0001$). Выполняли качественную ПЦР для выявления уровней транскрипта коллагена в мышце, которые коррелировали с результатами окрашивания сириус красным. В совокупности эти данные показывают, что AAV-опосредованная доставка человеческого β -саркогликана уменьшает мышечный фиброз, улучшает мышечную функцию и обращает вспять дистрофическую патологию подверженной заболеванию мышцы *sgcb^{-/-}*.

Пример 6 Безопасность и биораспределение rAAVrh.74.tMCK.hSGCB

[00118] Первоначально нормальные мыши ДТ, инъецированные 3×10^{10} гв *scAAVrh.74.tMCK.hSGCB* внутримышечно в ТА, не проявляли признаков токсичности по ГиЭ-окраске, что указывало на отсутствие неблагоприятных эффектов, вызванных вирусом. После IPR-доставки через сосуды 5×10^{11} гв общей дозы *scAAVrh.74.tMCK.hSGCB*, как описано в предыдущем разделе, безопасность оценивали у небольшой группы мышцей в данной группе ($n=4$). Во-первых, гистологично были проанализированы мышцы-мишени с значительной генной экспрессией, а также органы-не-мишени, включая сердце, легкие, печень, почку, селезенку, гонады и диафрагму. Парафиновые срезы были соответственно рассмотрены ветеринарным патологоанатомом и не было обнаружено доказательств токсичности в каком-либо указанном органе (данные не показаны). Экспрессия белка и векторное биораспределение были также оценены

во всех вышеуказанных тканях и органах с помощью вестерн-блоттинга и кЦПР соответственно. Копии генома вектора были обнаружены во всех проверенных органах; однако экспрессия белка не была обнаружена ни в одном образце, кроме обработанной мышцы (Фиг. 7). Наконец, анализ масс обработанной и необработанной влажных мышц не показывает существенных различий или тенденций при сравнении средних масс по сравнению с главной группой (данные не показаны). Эти данные свидетельствуют о том, что специфический для мышц промотор tMCK ограничивал экспрессию до скелетной мышцы, и вектор является нетоксичным.

Пример 7 Гистологические и функциональные дефекты в сердце и диафрагме мышцей SGCB-/-

[00119] Мыши ДТ и 7-месячные SGCB-/- (n=6 на штамм), которые не были обработаны, были проанализированы с помощью МРТ сердца и физиологии диафрагмы для поиска дефектов. После данных анализов животных умерщвляли и оценивали гистопатологию (Фиг. 8). Трехцветное окрашивание показало обширный фиброз (окрашивание красным) как в диафрагме (Фиг. 8А), так и в сердце (Фиг. 8С). Это сопровождалось функциональной недостаточностью удельной силы в диафрагме (116,24 мН/мм² SGCB-/- по сравнению с 236,67 мН/мм² ДТ, Фиг. 8В) и значительной недостаточностью фракции выброса, измеренной с помощью МРТ (ДТ, 78% в сравнении с SGCB-/- 65%, Фиг. 8D).

Пример 8 конструкция scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB и эффективность вектора

[00120] Была сконструирована транстенная кассета, содержащая полноразмерную кодон-оптимизированную кДНК SCGB человека, как показано на Фиг. 9А. Кассета включает в себя консенсусную последовательность Козак (ССАСС), химерный интрон SV40, синтетический сайт полиаденилирования и специфичный для мышц MHCK7, применяемый для управления экспрессией кассеты. Это промотор на основе MCK, который использует энхансер 206 п.н., взятый из примерно 1,2 кб 5' сайта начала транскрипции в гене креатинкиназы эндогенных мышц с проксимальным промотором (enh358MCK, 584-bp)^{3,12}. Кассета была упакована в самокомплементарный (sc) AAV вектор rh.74, который на 93%

гомологичен AAV8. Было показано, что AAVrh.74 является безопасным и эффективным в мышцах и приматах, отличных от человека, особенно при преодолении сосудистого барьера, при доставке в мышцу через систему кровообращения (17, 18, 21). Эффективность вектора была установлена путем внутримышечной инъекцией в левую ТА мышцы Sgcb-null. Доставка 3×10^{10} гв трансдуцировала >90% мышечных волокон через 4 недели после переноса гена.

Пример 9 Системная доставка scAAV.MHCK7.hSGCB

[00121] Мы доставляли вектор через инъекцию в хвостовую вену 14 мышам SGCB-/- в дозе 1×10^{12} гв общей дозы (5×10^{13} гв/кг) для оценки экспрессии трансгена и эффективности нашего вектора при системной доставке с длительным шестимесячным контрольным моментом времени. Мышей инъектировали в возрасте 4 недель, и полное вскрытие было проведено через 6 месяцев после инъекции (1 мышь убрали из исследования через 1 месяц, а 2 мыши - через 4 месяца в качестве промежуточных оценок экспрессии). Все скелетные мышцы, обсуждавшиеся выше, вместе с диафрагмой и сердцем были извлечены для анализа. Органы также были изымали для анализа токсикологии и биораспределения. Иммуофлуоресцентное окрашивание бета-саркогликана человека использовали для определения экспрессии трансгена hSGCB в 5 мышцах конечностей, как левых, так и правых, в дополнение к диафрагме и сердцу 6 мышей KO, которым давали системную инъекцию вектора hSGCB. Данные мышцы включали ТА, икроножную мышцу (GAS), четырехглавую мышцу (QUAD), ягодичную мышцу (GLUT) (не показана), поясничную мышцу (PSOAS) и трицепс (TRI) (Фиг. 10). Качественный анализ сердечной ткани также использовался для оценки относительного уровня экспрессии трансгена в сердечной мышце после доставке.

[00122] Четыре изображения 20X были получены для каждой мышцы, и для каждого изображения был определен процент положительных волокон hSGCB, в результате чего получали средний процент трансдукции для каждой мышцы из каждой мыши. Результаты, показанные на Фиг. 10 и Фиг. 11, демонстрируют трансдукцию $\geq 98\%$

во всех проанализированных мышцах, включая диафрагму и сердце. У мышцей, недостаточных по β -саркогликану, полностью отсутствовал белок как показал анализ иммунофлуоресценции. Терапевтическая доза в виде общей дозы 1×10^{12} гв приводила к средней трансдукции вектором $97,96 \pm 0,36\%$ (\pm СОС) у всех скелетных мышцах, включая диафрагму, и примерно к 95% или больше в сердечной мышце (данные не показаны).

Пример 10 Долгосрочная системная доставка scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB мышам SGCB^{-/-}

[00123] Исследовали длительную (6-месячную) системную доставку трансгенной кассеты β -саркогликана у мышцей *sgcb^{-/-}*, для получения результатов по анализу одномесечной эффективности, описанному в Примере 9. Мышцей *sgcb^{-/-}* 4-5-недельного возраста обрабатывали общей дозой 1×10^{12} гв scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB внутривенно через хвостовую вену (n=5). Мыши были вскрыты через 6 месяцев после инъекции, и экспрессия трансгена hSGCB была продемонстрирована с использованием иммунофлуоресценции в шести скелетных мышцах, как левых, так и правых, в дополнение к диафрагме и сердцу, у всех обработанных мышцей. Скелетные мышцы, которые анализировали, включали в себя TA, GAS, QUAD, ягодичную мышцу (GLUT), PSOAS и TRI. Средняя экспрессия hSGCB, вызванная системной доставкой, у обработанных мышцей составила $98,13 \pm 0,31\%$ (\pm СОС) для всех скелетных мышц, включая диафрагму, с экспрессией в сердце, превышающей > 95%. Репрезентативные изображения показаны на **фиг. 12b**. Уровни экспрессии в каждом отдельном типе мышц, усредненные для всех обработанных мышцей, показаны в **Таблице 2**. Вестерн-блоттинг, как показано на **фиг. 12c**, подтверждает экспрессию трансгена во всех мышцах. Значения экспрессии в Таблице 2 представлены для различных мышц как среднее значение левой и правой мышц из инъектированных системно мышцей (n=5). Значения указаны как среднее \pm СОС. Кроме того, количественное определение экспрессии трансгена hSGCB в сердцах у обработанных мышцей с помощью вестерн-блоттинга и денситометрии указывает на избыточную экспрессию hSGCB вплоть до 72,0% выше уровня экспрессии VL6 ДТ (**фиг. 12d**), что коррелирует с высокими

уровнями, определенными в скелетной мышце.

Таблица 2. Иммунофлуоресценция экспрессии β -саркогликана

Мышца	Путь доставки	Доза (гв Общая доза)	Конечная точка (месяцы)	% Волокон, экспрессирующих SGCB
TA	IV (внутривенно)	1e12	6	98,88 ± 0,55
GAS	IV (внутривенно)	1e12	6	98,24 ± 0,82
QD	IV (внутривенно)	1e12	6	99,32 ± 0,19
GLUT	IV (внутривенно)	1e12	6	97,50 ± 0,39
PSOAS	IV (внутривенно)	1e12	6	98,75 ± 0,23
TRI	IV (внутривенно)	1e12	6	97,21 ± 1,35
Диафрагма	IV (внутривенно)	1e12	6	97,00 ± 1,26
Сердце	IV (внутривенно)	1e12	6	≥95%

[00124] Важная характеристика мышцы *sgcb*^{-/-}, описанная в предыдущих сообщениях (Araishi et al, Hum. Mol. Genet 8: 1589-98, 1999, Durbeej et al., Mol. Cell. 5:141-51, 2000) и проиллюстрированная окрашиванием гематоксилином и эозином GAS и диафрагмы на Фиг. 13а, представляет собой тяжелую дистрофическую патологию, включающую центральное нуклеирование, некроз, воспалительную инфильтрацию и фиброз. Генный перенос значительно улучшил состояние данной патологии, облегчая многие из этих дистрофических признаков (Фиг. 13а). Количественная оценка гистологических параметров показала значительное снижение центрального нуклеирования в различных скелетных мышцах, проанализированных в результате генного переноса (Фиг. 13b). При ожидаемых низких уровнях центрального нуклеирования у мышцей BL6

ДТ во всех мышцах в среднем составляющих $1,89 \pm 0,39\%$, как отмечено в данном документе, с учетом всех проанализированных мышц, в среднем $66,85 \pm 1,86\%$ центральных ядер у необработанных мышцей *ssgcb*^{-/-} по сравнению с $36,30 \pm 5,16\%$ в обработанной AAV.MHCK7.hSGCB мышце *sgcb*^{-/-} ($p < 0,0001$) в таблице 3 ниже приведены подсчеты центральных ядер и диаметров волокон для различных мышц в виде среднего (\pm СОС) левой и правой мышц из BL6 ДТ, *sgcb*^{-/-} и системно инъецированных мышцей (n=5 в группе). Следует отметить, что наиболее значительная волна разрушения/восстановления происходит через 3 недели в мышце *sgcb*^{-/-}, признаком чего служат центрально размещенные ядра. Животных лечили после такого повреждения, и поэтому не ожидалось полное восстановления центральных ядер. Более глубокий анализ гистопатологии мышц показал нормализацию распределения размеров волокон, сопровождающуюся увеличением среднего диаметра волокна у больных мышцей, обработанных вектором, по сравнению с необработанными мышцами *sgcb*^{-/-} у всех трех исследованных мышцах (GAS: необработанные *sgcb*^{-/-} - $28,37 \pm 0,23$ мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - $36,04 \pm 0,17$ мкм, $p < 0,0001$) (PSOAS: необработанные *sgcb*^{-/-} - $24,75 \pm 0,23$ мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - $38,43 \pm 0,28$ мкм, $p < 0,0001$) (TRI: необработанные *sgcb*^{-/-} - $28 \pm 0,31$ мкм по сравнению с обработанными AAV.hSGCB - $35,56 \pm 0,22$ мкм, $p < 0,0001$) (Фиг. 13с, 13d, Таблица 3).

Таблица 3. Анализ процентного центрального нуклеирования

Группа животных	Доза (гв Общая доза)	Мышца	% Центральных ядер (Среднее \pm СОС)	Комбинированное среднее % ЦЯ (\pm СОС)	Диаметр волокна мкм (Среднее \pm СОС)
C57BL6 ДТ	N/A	TA	$1,78 \pm 0,86$	$1,89 \pm 0,39$	N/A
		GAS	$0,83 \pm 0,41$		$39,69 \pm$

		TRI	48,39 ± 6,20		39,92 ± 0,27
		DIA	11,59 ± 2,08		N/A

[00125] Из-за значимой роли фиброза в патогенезе LGMD2E и эффективности терапии было важно продемонстрировать ту же эффективность в снижении фиброза. Это было обнаружено с локализованным переносом гена β -саркогликана сразу же после системной доставки scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Применяя окрашивание пикросирус красным коллагена типов I и III, мы проанализировали уровни коллагена в икроножных мышцах и диафрагме у 7-месячных мышей BL6 ДТ (n=4), необработанных мышей *sgcb*^{-/-} (n=4), и обработанных мышей *sgcb*^{-/-} (n=5) через 6 месяцев после инъекции. Обработанные мышцы показали значительно меньшее отложение коллагена по сравнению с необработанными мышцами *sgcb*^{-/-} (Фиг. 14a). Трансдуцированная вектором мышца GAS содержала 17,55 ± 0,59% коллагена по сравнению с 43,55 ± 3,33% коллагена в необработанных мышцах GAS *sgcb*^{-/-} (p<0,0001). Кроме того, обработанная диафрагма имела 21,67 ± 1,09% коллагена по сравнению с 44,05 ± 2,39% в необработанной мышце *sgcb*^{-/-} (p<0,0001) (Фиг. 14b), демонстрируя способность переноса гена hSGCB уменьшать фиброзный компонент фенотипа LGMD2E.

Пример 11 Восстановление функции диафрагмы после системной доставки

[00126] Чтобы определить, может ли перенос гена hSGCB улучшить функцию мышц, мы оценили функциональные свойства диафрагменной мышцы у мышей SGCB^{-/-}, обработанных scAAVrh.74.MHCK7.hSCGB (см. Griffin et al. для методов). Сначала установили наличие функциональной недостаточности в диафрагмах мышей SGCB^{-/-}. Диафрагмы KO продемонстрировали снижение удельной силы на 50,9% (116,24 мН/мм²) по сравнению с мышами BL6 ДТ (116,24 мН/мм² по сравнению с 236,67 мН/мм²) и большую потерю силы после протокола интенсивного утомления (потеря 23% в SGCB^{-/-}; потеря 7% в BL6 ДТ). Доставка scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB через хвостовую вену привела к почти 100% экспрессии hSGCB в

диафрагме, приводя к восстановлению функции диафрагмы с удельной силой, улучшенной до 226,07 мН/мм², и большей устойчивостью к усталости с потерей только 12% силы (n=5) (Фиг. 15).

Пример 12 Доставка scAAVrh.74.CMV.miR29C уменьшает фиброз у мышцей SGCB-/-

[00127] Обширный фиброз, который мы идентифицировали как в скелетной мышце (Фиг. 2, 4, так и 6), так и в сердце и диафрагме (Фиг. 8), продемонстрировал необходимость лечения отложения коллагена (фиброза) при LGMD2E. Ранее мы обнаружили, что при мышечной дистрофии Дюшенна наиболее сильно была уменьшена Mir29C (из Mir29A, B и C). Было предположено, что Mir-29C также будет уменьшена у мышцей с недостаточностью по бета-саркогликану (мышечная модель LGMD2E). Мы доказали, что является правдой (Фиг. 15). Количество Mir29C были снижены, уровни фиброза (коллагена) были увеличены, а три компонента фиброза (Col1A, Col3A и Fbn) были увеличены на уровне РНК. Чтобы проверить, можем ли мы предотвратить фиброз с помощью Mir29C, в переднюю большеберцовую мышцу 4-недельных мышцей SGCB-/- (n=5) вводили геннотерапевтический вектор scrAAVrh.74.CMV.miR29c (3×10^{11} гв). scrAAVrh.74.CMV.miR29c показан на Фиг. 16 и описан в предварительной заявке США 62/323163, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Через 2 месяца лечения с помощью AAVrh.74.CMV.miR29C мышцы TA собирали у обработанных и контрольных мышцей SGCB-/-, и мышцей ДТ, и анализировали на фиброз (уровни коллагена) (n=5 в группе). Применяя окрашивание сириус красным и количественное определение, обнаруживали что уровни коллагена снижались после лечения (см. Фиг. 17). Количество транскриптов Col1A, Col3A и Fbn нормализовались, а размер мышечных волокон увеличивался. Репрезентативные изображения отсканированных полных срезов необработанных и обработанных AAVrh.74.CMV.miR29C передних большеберцовых мышцей, окрашенных сириусом красным, который окрашивает коллаген 1 и 3, показаны на Фиг. 118. Это свидетельствует о том, что scAAVrh.74.CMV.miR29C снижает фиброз у мышцей SGCB-/- и может применяться в комбинации с заменой гена с

помощью scAAVrh.74.tMCK.hSGCB или scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB.

Пример 13 Внутривенный перенос гена мышам SGCB^{-/-} уменьшает кифосколиоз грудного отдела позвоночника

[00128] Вырождение мышц туловища из-за ухудшающейся гистопатологии у пациентов, страдающих от LGMD2E, можно отнести к кифозу. Кифосколиоз грудного отдела позвоночника из-за ослабления мышц, поддерживающих позвоночный столб, может привести к тому, что диафрагма будет выдвинута вперед, что еще больше ухудшит объем легких и функцию диафрагмы. Была использована рентгенография всего тела для определения степени кифоза у 7-месячных мышей BL6 ДТ (n=6), мышей *sgcb^{-/-}* (n=6) и обработанных мышей *sgcb^{-/-}* через 6 месяцев после инъекции (n=6), из-за тяжести фенотипа у мыши *sgcb^{-/-}* с общим анатомическим видом кифосколиоза. Бал кифотического индекса (KI) определяет количественное значение степени кифосколиоза (Laws et al. *J. Appl. Physiol.* 97: 1970-7, 2004). Как показано на панели ДТ на Фиг. 19а, бал KI представляет собой отношение длины от передней к задней конечности по сравнению с длиной средней линии к вершине кривизны в позвоночнике. В то время как мыши *sgcb^{-/-}* имели сильно изогнутый позвоночник и более низкий показатель KI $3,64 \pm 0,16$ (n=6), мыши BL6 ДТ имеют значительно более прямой позвоночник, что дает более высокую оценку KI $6,01 \pm 0,41$ (n=6) ($p < 0,01$) (Фиг. 19b). Обработанные мыши *sgcb^{-/-}* демонстрируют значительное снижение степени кифоза позвоночника с увеличением показателя KI до $5,39 \pm 0,58$ (n=6) ($p < 0,05$) (Фиг. 19b). Эти данные показали, что внутривенная доставка scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB полезна для общей целостности позвоночника и может облегчить кифоз и суставные контрактуры, присутствующие при данной болезни. Эти данные продемонстрировали облегчение кифоза и увеличение физической активности у мышей *sgcb^{-/-}* после системной доставки rAAV вектора согласно изобретению. Эти данные являются дополнительным доказательством того, что генная терапия согласно изобретению улучшает качество жизни пациентов с LGMD2E.

Пример 14 Оценка кардиомиопатии

[00129] Гистологическое разрушение мышц конечностей и диафрагмы также обнаружено в миокарде 7-месячных мышей *sgcb^{-/-}*, особенно с проявлением некроза миокарда и фиброза, как видно по окрашиванию ГиЭ и пиркосириус красного (Фиг. 20a). Презентация нарушения функции сердца часто в виде расширенной кардиомиопатии с уменьшенным минутным объемом сердца и меньшей фракцией выброса (Semplicini et al., *Neurology* 84: 1772-81, 2015, Fanin et al., *Neuromuscul Disorder* 13:303-9, 2003). Была использована магнитно-резонансная томография сердца (МРТ) для оценки нескольких функциональных параметров сердца с целью установления функциональной неостаточности в миокарде мышей *sgcb^{-/-}* по сравнению с мышами BL6 ДТ для использования в качестве меры измерения функциональности. Визуализация контрольных мышей в возрасте 7 месяцев показала снижение на 29,4% ударного объема с $0,041 \pm 0,0019$ мкл у сердец *sgcb^{-/-}* по сравнению с $0,029 \pm 0,0024$ мл у сердец BL6 ДТ ($p < 0,01$), на 31,7% меньший минутный объем сердца с $14,70 \pm 0,74$ мкл/мин у сердец *sgcb^{-/-}* по сравнению с $12,72 \pm 0,97$ мл/мин у сердец BL6 ДТ и, наконец, на 14,3% меньшую фракцию выброса, $66,21 \pm 3,83\%$ у сердец *sgcb^{-/-}* по сравнению с $76,90 \pm 1,67\%$ у сердец BL6 ДТ ($p < 0,05$) (Фиг. 20b). Это указывает на умеренное снижение общей сердечной функции в этом возрасте и тенденцию к развитию кардиомиопатии. Восстановление экспрессии hSGCB в сердцах мышей КО через системную доставку частично исправляло данные недостаточности, улучшая ударный объем до $0,032 \pm 0,0027$ мл, минутный объем сердца до $14,66 \pm 0,75$ мл/мин и фракцию выброса до $68,16 \pm 2,31\%$ (Фиг. 19b). Как показал вестер-блоттинг, коррелирующая с гистологическим и функциональным нарушением сердечной ткани, описанным в данном документе, экспрессия сердечного тропонина I (cTrpI), важного регулятора сердечной функции и индикатора (биомаркер) сердечного повреждения, уменьшена в сердцах больных *sgcb^{-/-}* до 60,38% уровней, наблюдаемых у мышей BL6 ДТ (Фиг. 20c). Уровни cTrpI восстанавливаются после лечения до уровней 35,80% экспрессии, наблюдаемой в сердцах ДТ (Фиг. 20d).

Пример 15 Функциональное восстановление в мышцах диафрагмы

с увеличением физической активности

[00130] Поскольку при LGMD2E значительными являются диафрагмальная дисфункция и респираторная недостаточность, при клинической оценке системной терапии важно учитывать функциональную пользу для диафрагмы. Применяя экспериментальный протокол *ex vivo* на полосках, взятых из диафрагменной мышцы, было оценено, приносит ли восстановления β -саркогликана функциональную пользу в этой сильно нарушенной мышце. В соответствии со значительной гистопатологией, выявленной в диафрагмах 7-месячных больных мышцей, диафрагмы *sgcb*^{-/-} (n=4) проявили функциональную недостаточность со значительным (51%) уменьшением удельной силы по сравнению с мышцами VL6 ДТ (n=5) (116,24 ± 10,49 мН/мм² по сравнению 236,67 ± 15,87 мН/мм², соответственно, p<0,001), а также большую потерю силы, по сравнению с той, что была произведена после первого сокращения после выполнения протокола интенсивного утомления (23 ± 1,0% потери у *sgcb*^{-/-}; 7,0 ± 3,0% потери у VL6 ДТ, p <0,05) (Фиг. 6а). Через шесть месяцев после доставки через хвостовую вену scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB наблюдалось резкое улучшение удельной силы. Удельная сила увеличивалась до 226,07 ± 27,12 мН/мм² (n=5) (p<0,05 по сравнению с *sgcb*^{-/-}), и наблюдали лучшую защиту мышц от повторяемого утомления с потерей силы только на 12,0 ± 4,0% (p<0,05 по сравнению с *sgcb*^{-/-}) (Фиг. 21а). В целом, эти данные подтверждают наши предыдущие результаты по мышце ТА и показывают, что восстановление β -саркогликана обеспечивает функциональное восстановление мышцы диафрагмы.

[00131] Симптомы повышенного утомления и снижение общей активности часто сообщаются при многих нервно-мышечных заболеваниях, что частично связано с возникновением кифоза. В результате и с учетом фенотипа LGMD2E было высказано предположение, что мышцы КО будут, естественно, менее активными по сравнению с здоровыми мышцами ДТ, и, кроме того, системная доставка rAAV.MHCK7.hSGCB мышцам *sgcb*^{-/-} сделает мышцей более физически активными. Чтобы проверить данную гипотезу и дополнительные потенциальные функциональные преимущества генного

переноса, для всех групп мышей выполняли протокол лазерного наблюдения активности в клетках с открытым пространством, аналогичный описанному в Kobayashi et al., Nature 456: 511-5, 2008 and Beastro et al., Am. J. Pathol. 179: 2464-74, 2011. Графики на Фиг. 21b демонстрируют значительное снижение (55,5%) у мышей КО по сравнению с ДТ как общей способности передвигаться (горизонтальное движение в плоскостях x и y), так и вертикального передвижения на задних конечностях. Среднее число прерываний лазерных лучей горизонтального перемещения в течение 1 часа у мышей ДТ составляло $7355 \pm 400,8$ ($n=6$) по сравнению с $3271 \pm 483,8$ ($n=6$) у мышей КО ($p<0,0001$). Кроме того, среднее число прерываний лазерных лучей вертикального перемещения, зарегистрированное у мышей ДТ, составляло $626,7 \pm 53,76$ по сравнению с $264,5 \pm 63,36$ у мышей КО ($p<0,01$) (Фиг. 21b). В соответствии с исходной гипотезой, обработанные rAAV.МНСК7.hSGCB мыши, были заметно более активными по сравнению с КО, что было проиллюстрировано в количественной оценке активности, когда общее перемещение увеличилось на 22% до $5143 \pm 293,2$ прерываний лазерных лучей ($p<0,05$) и вертикальное перемещение на задних лапах резко увеличилось на 77% до $615,3 \pm 95,93$ прерываний лазерных лучей ($p<0,05$) у обработанных мышей ($n=6$) (Фиг. 21b).

Пример 16 Анализ безопасности и биораспределения rAAVrh.74.МНСК7.hSGCB

[00132] Потенциальную токсичность или проблемы безопасности генной терапии hSGCB оценивали на мышах $sgcb^{-/-}$ через 6 месяцев после системной доставки scAAVrh.74.МНСК7.hSGCB в общей дозе $1,0 \times 10^{12}$ гв (5×10^{13} гв/кг). Биораспределение вектора и экспрессию трансгена вне мишени анализировали по образцах тканей (ТА, ТРИ, диафрагма, сердце, гонады, легкие, почка, печень и селезенка) из дозированных вектором $sgcb^{-/-}$ животных, с использованием кПЦР и вестерн-блоттинга, соответственно. Применяя наборы вектор-специфичных праймеров-зондов, геномы вектора МНСК7.hSGCB были обнаружены в различных количествах во всех собранных тканях. Как и ожидалось, самые высокие уровни наблюдали в печени, а также в скелетной мышце и сердце, что указывало на то, что испытываемое

изделие эффективно доставлялось во все предполагаемые мышцы мышей, дозированных вектором (Фиг. 22a). Кроме того, вестерн-блоттинг для определения экспрессии белка hSGCB подтвердил функциональность специфичного для мышц промотора МНСК7 и экспрессию транскена, ограниченную сердечной и скелетной мышцами. Экспрессию белка бета-саркогликана наблюдали в различных количествах во всех образцах скелетных мышц, а также в образцах из сердец и, что важно, не обнаруживали ни в одной другой не-мышечной ткани (Фиг. 22b), что подтверждается тем фактом, что бета-саркогликан известен как специфичный для мышц белок. Наконец, проводили окрашивание гематоксилином и эозином криосрезов мышечной ткани и всех органов не-мишеней, собранных у пяти мышей *sgcb*^{-/-}, и пяти мышей С57BL6 ДТ, обработанных системно нашим вектором в терапевтической дозе, применяемой в данном исследовании. Затем данные срезы были соответственно рассмотрены на токсичность ветеринарным патологоанатомом, и ни в одном образце из любой мыши не было обнаружено никаких вредных эффектов. В совокупности эти данные показывают, что испытываемое изделие хорошо переносилось испытываемыми животными.

[00133] Тот факт, что такие высокие уровни трансдукции во всех мышцах по всему телу были достигнуты без побочных эффектов с использованием относительно низкой дозы (общая доза 1×10^{12} гв, 5×10^{13} гв/кг), предоставляет большие перспективы для практического применения пациентами LGMD2E. С клинической точки зрения, доза, применяемая в описанных в данном документе экспериментах, намного ниже дозы, применяемой для системной доставки препарата AAV, экспрессирующего SMN1, предоставляемого младенцам с SMA (спинальная мышечная атрофия), который в настоящее время находится на этапе клинических испытаний (Mendell et al., Mol. Ther. 24: S190, 2016). Высокоэффективное восстановление экспрессии β -саркогликана с использованием промотора МНСК7, сопровождающееся функциональными улучшениями, очень обнадеживает при уровнях дозировки, которые могут быть применены клинически, и системная доставка приносит большую пользу данным пациентам учитывая высокую затрагиваемость сердца

при недостаточности β -саркогликана у пациентов с LGMD2E.

[00134]

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E et al. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995; 11: 266-273.
- 2 Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 995-1003.
- 3 Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1589-1598.
- 4 Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL et al. Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell* 2000; 5: 141-151.
- 5 Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK et al. Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1953-1961.
- 6 Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology* 1999; 52: 176-179.
- 7 Sandona D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Exp Rev Mol Med* 2009; 11: e28.
- 8 Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. *Neuromusc Disord* 2003; 13: 303-309.
- 9 Sveen ML, Thune JJ, Kober L, Vissing J. Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy. *Arch Neurol* 2008; 65: 1196-1201.
- 10 Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA et al. Heart involvement in muscular dystrophies

due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve* 1999; 22: 473-479.

11 Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology* 2014; 83: 1453-1463.

12 Wong-Kisiel LC, Kuntz NL. Two siblings with limb-girdle muscular dystrophy type 2E responsive to deflazacort. *Neuromusc Disord* 2010; 20: 122-124.

13 Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoli R, Vitali A, Felisari G et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet* 2000; 37: 102-107.

14 Gibertini S, Zanotti S, Savadori P, Curcio M, Saredi S, Salerno F et al. Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse. *Cell Tissue Res* 2014; 356: 427-443.

15 McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 2003; 10: 2112-2118.

16 McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 2001; 8: 1248-1254.

17 Chicoine LG, Rodino-Klapac LR, Shao G, Xu R, Bremer WG, Camboni M et al. Vascular delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the gastrocnemius muscle of the rhesus macaque stimulates the expression of dystrophin and laminin alpha2 surrogates. *Mol Ther* 2014; 22: 713-724.

18 Rodino-Klapac LR, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Malik V, Davis N et al. Persistent expression of FLAG-tagged

micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* 2010; 18: 109-117.

19 Rodino-Klapac LR, Janssen PM, Montgomery CL, Coley BD, Chicoine LG, Clark KR et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* 2007; 5: 45.

20 Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther* 2008; 15: 1489-1499.

21 Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Griffin DA, Heller KN et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on micro-dystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther* 2014; 22: 338-347.

22 Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem* 1995; 118: 959-964.

23 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; 139: 375-385.

24 Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther* 2015; 23: 192-201.

25 Dressman D, Araishi K, Imamura M, Sasaoka T, Liu LA, Engvall E et al. Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1631-1646.

26 Rodino-Klapac LR, Lee JS, Mulligan RC, Clark KR, Mendell JR. Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D. *Neurology* 2008; 71: 240-247.

27 Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, Hauschka SD. E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal

muscles and cardiac muscle of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5058-5068.

28 Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; 76: 791-801.

29 Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* 2006; 1: 1412-1428.

30 Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1031-1039.

31 Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 2005; 11: 245-256.

32 Hakim CH, Grange RW, Duan D. The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2- to 20-mo-old mdx mice. *J Appl Physiol* 2011; 110: 1656-1663.

33 Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szogyarto CA, Maiti B, Findlay A et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat Med* 2014; 20: 992-1000.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Исследовательский институт при Национальной детской больнице

<120> ДОСТАВКА В-САРКОГЛИКАНА И МИКРОРНК-29 ВЕКТОРОМ НА ОСНОВЕ АДЕНО-АССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА И ЛЕЧЕНИЕ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

<130> 28335/50622A

<150> US 62/433,548

<151> 2016-12-13

<150> US 62/323,333

<151> 2016-04-15

<160> 18

<170> PatentIn Версия 3.5

<210> 1

<211> 957

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Бета-саркогликан

<400> 1

```

atggcagcag cagccgccc agccgcccag cagcagtcaa gcaatggacc agtgaaaaaa      60
tcaatgagag aaaaagccgt cgagaggaga tcagtgaata aggagcaca cagcaatttc      120
aaagccggct acatccctat tgacgaagat cgcctgcata agacaggcct gagggggcgc      180
aaaggaaacc tggcaatctg cgtcatcatt ctgctgttta tcctggccgt gattaatctg      240
atcattactc tggtgatttg ggctgtcatc cgcattggcc caaacgggtg tgactctatg      300
gagttccacg aaagtggcct gctgcgattt aagcaggtgt ccgatatggg ggtcatccat      360
ccactgtaca aatctactgt cggcggggcgg agaaacgaga atctggatgat caccgggaac      420
aatcagccca ttgtgttcca gcagggaaacc acaaagctgt ctgtggaaaa caataaaaca      480
tcaatcacta gcgacattgg catgcagttc tttgatcccc ggaccagaa tatcctgttc      540
agtaccgact atgagacaca cgaatttcat ctgccttccg gggatgaagtc tctgaacgtc      600
cagaaagcca gactgagag aatcaccagt aacgctacat cagacctgaa tatcaagggtg      660
gatggacgag ctattgtccg gggaaatgag ggcgtgttca tcatgggcaa gacaattgaa      720
tttcacatgg gaggcaacat ggagctgaaa gcagaaaaca gcatcattct gaatgggagc      780
gtgatggtct cactaccag actgcccagc tcctctagtg gagaccagct ggggtccgga      840
gattgggtca ggtataagct gtgcatgtgt gccgatggca ccctgtttaa agtgcaggtc      900
accagccaga atatgggatg tcagattagc gataaccctt gtgggaatac tcattaa      957

```

<210> 2

<211> 318
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Бета-саркогликан

<400> 2

Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Gln Gln Ser Ser Asn Gly
1 5 10 15

Pro Val Lys Lys Ser Met Arg Glu Lys Ala Val Glu Arg Arg Ser Val
20 25 30

Asn Lys Glu His Asn Ser Asn Phe Lys Ala Gly Tyr Ile Pro Ile Asp
35 40 45

Glu Asp Arg Leu His Lys Thr Gly Leu Arg Gly Arg Lys Gly Asn Leu
50 55 60

Ala Ile Cys Val Ile Ile Leu Leu Phe Ile Leu Ala Val Ile Asn Leu
65 70 75 80

Ile Ile Thr Leu Val Ile Trp Ala Val Ile Arg Ile Gly Pro Asn Gly
85 90 95

Cys Asp Ser Met Glu Phe His Glu Ser Gly Leu Leu Arg Phe Lys Gln
100 105 110

Val Ser Asp Met Gly Val Ile His Pro Leu Tyr Lys Ser Thr Val Gly
115 120 125

Gly Arg Arg Asn Glu Asn Leu Val Ile Thr Gly Asn Asn Gln Pro Ile
130 135 140

Val Phe Gln Gln Gly Thr Thr Lys Leu Ser Val Glu Asn Asn Lys Thr
145 150 155 160

Ser Ile Thr Ser Asp Ile Gly Met Gln Phe Phe Asp Pro Arg Thr Gln
165 170 175

Asn Ile Leu Phe Ser Thr Asp Tyr Glu Thr His Glu Phe His Leu Pro
180 185 190

Ser Gly Val Lys Ser Leu Asn Val Gln Lys Ala Ser Thr Glu Arg Ile
195 200 205

Thr Ser Asn Ala Thr Ser Asp Leu Asn Ile Lys Val Asp Gly Arg Ala

210

215

220

Ile Val Arg Gly Asn Glu Gly Val Phe Ile Met Gly Lys Thr Ile Glu
225 230 235 240

Phe His Met Gly Gly Asn Met Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ser Ile Ile
245 250 255

Leu Asn Gly Ser Val Met Val Ser Thr Thr Arg Leu Pro Ser Ser Ser
260 265 270

Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Gly Asp Trp Val Arg Tyr Lys Leu Cys
275 280 285

Met Cys Ala Asp Gly Thr Leu Phe Lys Val Gln Val Thr Ser Gln Asn
290 295 300

Met Gly Cys Gln Ile Ser Asp Asn Pro Cys Gly Asn Thr His
305 310 315

<210> 3
<211> 2306
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<220>
<221> misc_feature
<223> pAAV.МНСК7.hSCGB

<400> 3
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gagtgggggtt aaccaattgg 120
cgcggccgca agcttgcatg tctaagctag acccttcaga ttaaaaataa ctgaggtaag 180
ggcctgggta ggggaggtgg tgtgagacgc tcctgtctct cctctatctg cccatcggcc 240
ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaaggc catggagcca gaggggagcgag 300
ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg 360
gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 420
taaccagac atgtggctgc ccccccccc ccaacacctg ctgcctctaa aaataacct 480
gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat cttcgaacaa ggctgtgggg gactgagggc 540
aggctgtaac aggcttgggg gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact 600
gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt 660
aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctggggcaa 720

gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgccccggca acgagctgaa agctcatctg	780
ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctctgggcta gtcacaccct gtaggctcct	840
ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac	900
agacactcag gagcagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt	960
caggtcccgg atccgggtgg ggtgcaaata aaagaactgc tcctcagtgg atgttgccct	1020
tacttctagg cctgtacgga agtggttactt ctgctctaaa agctgcgga ttgtaccggg	1080
taccgccacc atggcagcag cagccgcccg agccgcccag cagcagtcaa gcaatggacc	1140
agtgaaaaaa tcaatgagag aaaaagccgt cgagaggaga tcagtgaata aggagcacia	1200
cagcaatttc aaagccggct acatccctat tgacgaagat cgcctgcata agacaggcct	1260
gagggggcgc aaaggaaacc tggcaatctg cgtcatcatt ctgctgttta tccctggccgt	1320
gattaatctg atcattactc tgggtgatttg ggctgtcatc cgcattggcc caaacgggtg	1380
tgactctatg gagttccacg aaagtggcct gctgcgattt aagcaggtgt ccgatatggg	1440
ggtcatccat ccaactgtaca aatctactgt cggcgggcgg agaaacgaga atctgggtgat	1500
caccgggaac aatcagccca ttgtgttcca gcaggggaacc acaaagctgt ctgtggaaaa	1560
caataaaaaca tcaatcacta gcgacattgg catgcagttc tttgatcccc ggaccagaa	1620
tatcctgttc agtaccgact atgagacaca cgaatttcat ctgccttccg ggggtgaagtc	1680
tctgaacgtc cagaaagcca gcactgagag aatcaccagt aacgctacat cagacctgaa	1740
tatcaagggtg gatggacgag ctattgtccg gggaaatgag ggcgtgttca tcatgggcaa	1800
gacaattgaa tttcacatgg gaggcaacat ggagctgaaa gcagaaaaca gcatcattct	1860
gaatgggagc gtgatggtct ccaactaccag actgcccagc tcctctagtg gagaccagct	1920
ggggtccgga gattgggtca ggtataagct gtgcatgtgt gccgatggca ccctgtttaa	1980
agtgcaggtc accagccaga atatgggatg tcagattagc gataaccctt gtgggaatac	2040
tcattaaag cttggccgca ataaaagatc tttattttca ttagatctgt gtgttggttt	2100
tttgtgtgtc ctgcaggggc gcgcctctag agcatggcta cgtagataag tagcatggcg	2160
ggttaatcat taactacaag gaacccttag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg	2220
ctcgctcgct cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg	2280
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgc	2306

<210> 4
 <211> 792
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер

<220>
<221> misc_feature
<223> промотор МНСК7

<400> 4
aagcttgcat gtctaagcta gacccttcag attaaaaata actgaggtaa gggcctgggt 60
aggggaggtg gtgtgagacg ctctgtctc tcctctatct gcccatcggc cctttgggga 120
ggaggaatgt gcccaaggac taaaaaaagg ccatggagcc agaggggcca gggcaacaga 180
cctttcatgg gcaaacctg gggccctgct gtctagcatg cccactacg ggtctaggct 240
gcccatgtaa ggaggcaagg cctggggaca cccgagatgc ctggttataa ttaaccaga 300
catgtggctg ccccccccc cccaacacct gctgcctcta aaaataacct tgtccctggg 360
ggatccctg catgcgaaga tcttcgaaca aggctgtggg ggactgaggg caggctgtaa 420
caggcttggg ggccagggct tatacgtgcc tgggactccc aaagtattac tgttccatgt 480
tcccggcga gggccagctg tccccgcca gctagactca gcacttagtt taggaaccag 540
tgagcaagtc agcccttggg gcagccata caaggccatg gggctgggca agctgcacgc 600
ctgggtccgg ggtgggcacg gtgcccgggc aacgagctga aagctcatct gctctcaggg 660
gcccctcct ggggacagcc cctctggct agtcacaccc tgtaggctcc tctatataac 720
ccagggcac aggggctgcc ctattctac caccacctcc acagcacaga cagacactca 780
ggagcagcca gc 792

<210> 5
<211> 2244
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<220>
<221> misc_feature
<223> pAAV.tMCK.hSGCB

<400> 5
ctgcgcctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgacctt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgggggtt aaccaattgg 120
cggccgcaaa cttgcatgcc ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc 180
tggggacacc cgagatgcct ggttataatt aacccaaca cctgctgccc ccccccccc 240
aacacctgct gcctgagcct gagcgggttac cccacccgg tgccctgggtc ttaggctctg 300
tacacatgg aggagaagct cgctctaaaa ataaccctgt ccctgggtgga tccactacgg 360
gtctatgctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 420
taacccaac acctgctgcc ccccccccc caacacctgc tgccctgagcc tgagcgggta 480

ccccaccccg gtgcctgggt cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa 540
aataaccctg tcctgggtgg accactacgg gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc 600
ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taaccccaac acctgctgcc ccccccccc 660
aacacctgct gcctgagcct gagcgggttac cccaccccggtg tgctgggtc ttaggctctg 720
tacaccatgg aggagaagct cgctctaaaa ataaccctgt ccctgggtcct ccctggggac 780
agcccctcct ggctagtac accctgtagg ctctctata taaccagggt gcacaggggc 840
tgccccggg tcacctgcag aagttggctg tgaggcactg ggcaggtaag tatcaaggtt 900
acaagacagg ttaaggaga ccaatagaaa ctgggcttgt cgagacagag aagactcttg 960
cgtttctgat aggcacctat tggcttact gacatccact ttgcctttct ctccacaggt 1020
gtccactccc agttcaatta cagcgcgtgg taccaccatg gcagcagcag ccgccgcagc 1080
cgccgagcag cagtcaagca atggaccagt gaaaaaatca atgagagaaa aagccgtcga 1140
gaggagatca gtgaataagg agcacaacag caatttcaaa gccggctaca tcctattga 1200
cgaagatcgc ctgcataaga caggcctgag ggggcgcaaa ggaaacctgg caatctgcgt 1260
catcattctg ctgtttatcc tggccgtgat taatctgatc attactctgg tgatttgggc 1320
tgtcatccgc attggcccaa acgggtgtga ctctatggag ttccacgaaa gtggcctgct 1380
gcgatttaag caggtgtccg atatgggggt catccatcca ctgtacaaat ctactgtcgg 1440
cgggcggaga aacgagaatc tggatgatcac cgggaacaat cagccattg tgttcagca 1500
gggaaccaca aagctgtctg tggaaaacaa taaaacatca atcactagcg acattggcat 1560
gcagttcttt gatccccgga cccagaatat cctgttcagt accgactatg agacacacga 1620
atctcatctg cttccgggg tgaagtctct gaacgtccag aaagccagca ctgagagaat 1680
caccagtaac gctacatcag acctgaatat caaggtggat ggacgagcta ttgtccgggg 1740
aaatgagggc gtgttcatca tgggcaagac aattgaattt cacatgggag gcaacatgga 1800
gctgaaagca gaaaacagca tcattctgaa tgggagcgtg atggtctcca ctaccagact 1860
gccagctcc tctagtggag accagctggg gtccggagat tgggtcaggt ataagctgtg 1920
catgtgtgcc gatggcacc tgtttaaagt gcaggtcacc agccagaata tgggatgtca 1980
gattagcgat aacccttgtg ggaatactca ttaaaagctt ggccgcaata aaagatcttt 2040
atcttcatta gatctgtgtg ttggtttttt gtgtgtcctg caggggcgcg cctctagagc 2100
atggctacgt agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa ccctagtga 2160
tgagattggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg 2220
tcgcccagcg cccgggcttt gcc 2244

<210> 6
<211> 714

<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<220>
<221> misc_feature
<223> промотор tMCK

<400> 6
ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct 60
ggttataatt aacccaaca cctgctgcc cccccccc aacacctgct gcctgagcct 120
gagcggttac cccaccccg tgctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct 180
cgctctaaaa ataaccctgt ccctgggtga tccactacgg gtctatgctg cccatgtaag 240
gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccaac acctgctgcc 300
cccccccc caacacctgc tgctgagcc tgagcggtta cccaccccg gtgctgggt 360
cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa aataaccctg tcctgggtgg 420
accactacgg gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc 480
tggttataat taacccaac acctgctgcc cccccccc aacacctgct gcctgagcct 540
gagcggttac cccaccccg tgctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct 600
cgctctaaaa ataaccctgt ccctgggtc cctggggac agcccctcct ggctagtcac 660
acctgtagg ctctctata taaccaggg gcacaggggc tgccccggg tcac 714

<210> 7
<211> 296
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<220>
<221> misc_feature
<223> miR29c

<400> 7
ggccggcctg tttgaatgag gcttcagtac tttacagaat cgttgcctgc acatcttggg 60
aacacttgct gggattactt cttcagggtta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg 120
ctggtgacag tgagcgcaac cgatttcaaa tgggtgctaga gtgaagccac agatgtctag 180
caccatttga aatcgggtat gcctactgcc tcggaattca aggggtact ttaggagcaa 240
ttatcttggt tactaaaact gaataccttg ctatctcttt gatacattgg ccggcc 296

<210> 8
<211> 3384

<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<220>
<221> misc_feature
<223> pAAV.CMV.Mir29C

<400> 8
cagcagctgc gcgctcgctc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgctggggcg 60
acctttggtc gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt ggggttaaac 120
tcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 180
tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 240
aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 300
caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcttggcat tatgcccagt 360
acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 420
ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg 480
gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac 540
gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaattgggc ggtaggcgtg 600
tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac 660
gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga ccgatccagc ctccggactc 720
tagaggatcc ggtactcgag gaactgaaaa accagaaagt taactggtaa gtttagtctt 780
tttgtctttt atttcaggtc ccggatccgg tgggtggtgca aatcaaagaa ctgctcctca 840
gtggatggtg cctttacttc taggcctgta cggaagtgtt acttctgctc taaaagctgc 900
ggaattgtac ccggggccga tccaccggtc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac 960
aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca 1020
tgttcggcga ggcggggcct gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa 1080
gctggccggc ctgtttgaat gaggcttcag tactttacag aatcgttgcc tgcacatctt 1140
ggaaacactt gctgggatta cttcttcagg ttaaccacac agaaggctcg agaaggтата 1200
ttgctggtga cagtgagcgc aaccgatttc aaatggtgct agagtgaagc cacagatgtc 1260
tagcaccatt tgaaatcggg tatgcctact gcctcggaat tcaaggggct actttaggag 1320
caattatctt gtttactaaa actgaatacc ttgctatctc tttgatacat tggccggcct 1380
gctctggtgc ctggcctcgc gccgcccgtg atcgccccgc cctgggcggc aaggctggcc 1440
cggtcggcac cagttgcgtg agcggaaaga tggccgcttc ccggccctgc tgcagggagc 1500
tcaaaatgga ggacgcggcg ctcgggagag cgggcgggtg agtcaccac acaaaggaaa 1560

agggcctttc	cgtcctcagc	cgtcgcttca	tgtgactcca	cggagtaccg	ggcgccgctc	1620
aggcacctcg	attagttctc	gagcttttgg	agtacgtcgt	ctttagggtg	gggggagggg	1680
ttttatgcga	tggagtttcc	ccacactgag	tgggtggaga	ctgaagttag	gccagcttgg	1740
cacttgatgt	aattctcctt	ggaatttgcc	ctttttgagt	ttggatcttg	gttcattctc	1800
aagcctcaga	cagtggttca	aagttttttt	cttccatttc	agggtgctgtg	aaaagctagc	1860
gctaccggac	tcagatctcg	agctcaagct	gcggggatcc	agacatgata	agatacattg	1920
atgagtttgg	acaaccaca	actagaatgc	agtgaaaaaa	atgcttttatt	tgtgaaattt	1980
gtgatgctat	tgctttattt	gtaaccatta	taagctgcaa	taaacaagtt	aacaacaaca	2040
attgcattca	ttttatgttt	caggttcagg	gggaggtgtg	ggaggttttt	tcactagtag	2100
catggctacg	tagataagta	gcatggcggg	ttaatcatta	actacaagga	accctagtg	2160
atggagttgg	ccactccctc	tctgcgcgct	cgctcgctca	ctgaggccgg	gcgaccaaag	2220
gtcgcccgac	gcccgggctt	tgcccggggc	gcctcagtga	gcgagcgagc	gcgccagctg	2280
gcgtaatagc	gaagaggccc	gcaccgatcg	cccttcccaa	cagttgcgca	gcctgaatgg	2340
cgaatggaat	tccagacgat	tgagcgtcaa	aatgtaggta	tttccatgag	cgtttttctc	2400
gttgcaatgg	ctggcggtaa	tattgttctg	gatattacca	gcaaggccga	tagtttgagt	2460
tcttctactc	aggcaagtga	tgttattact	aatcaaagaa	gtattgcgac	aacggttaat	2520
ttgctgatg	gacagactct	tttactcggg	ggcctcactg	attataaaaa	cacttctcag	2580
gattctggcg	taccgttctc	gtctaaaatc	cctttaatcg	gcctcctggt	tagctcccgc	2640
tctgattcta	acgaggaaag	cacgttatac	gtgctcgtea	aagcaacat	agtacgcgcc	2700
ctgtagcggc	gcattaagcg	cggcgggtgt	ggtggttacg	cgcagcgtga	ccgctacact	2760
tgccagcgcc	ctagcggccg	ctcctttcgc	tttcttcctc	tcctttctcg	ccacgttcgc	2820
cggttttccc	cgtcaagctc	taaatecggg	gctcccttta	gggttccgat	ttagtgtttt	2880
acggcacctc	gaccccaaaa	aacttgatta	gggtgatggt	tcacgtagtg	ggccatcgcc	2940
ctgatagacg	gtttttcggc	ctttgacggt	ggagtccacg	ttctttaata	gtggactctt	3000
gttccaaact	ggaacaacac	tcaaccctat	ctcgggtctat	tcttttgatt	tataagggat	3060
tttgccgatt	tcggcctatt	ggttaaaaaa	tgagctgatt	taacaaaaat	ttaacgcgaa	3120
ttttaacaaa	atattaacgt	ttacaattta	aatatttgct	tatacaatct	tcctgttttt	3180
ggggcttttc	tgattatcaa	ccgggggtaca	tatgattgac	atgctagttt	tacgattacc	3240
gttcatcgat	tctcttgttt	gctccagact	ctcaggcaat	gacctgatag	cctttgtaga	3300
gacctctcaa	aaatagctac	cctctccggc	atgaatttat	cagctagaac	ggttgaatat	3360
catattgatg	gtgatttgac	tgtc				3384

<211> 296
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<220>
<221> misc_feature
<223> miR29c

<400> 9
ggccggcctg tttgaatgag gcttcagtac tttacagaat cgttgcctgc acatcttgga 60
aacacttgct gggattactt cttcaggтта acccaacaga aggctcgaga aggtatattg 120
ctgttgacag tgagcgcaac cgatttcaaa tggtgctaga gtgaagccac agatgtctag 180
caccatttga aatcggttat gcctactgcc tcggaattca aggggctact ttaggagcaa 240
ttatcttggt tactaaaact gaataccttg ctatctcttt gatacattgg ccggcc 296

<210> 10
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<220>
<221> misc_feature
<223> Форвардный праймер tMCK

<400> 10
acccgagatg cctggttata att 23

<210> 11
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<220>
<221> misc_feature
<223> Реверсный праймер tMCK

<400> 11
tccatggtgt acagagccta agac 24

<210> 12
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер

<220>

<221> misc_feature

<223> зонд к tMCK

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' FAM

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> 3' TAMRA

<400> 12

ctgctgctg agcctgagcg gttac

25

<210> 13

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер

<220>

<221> misc_feature

<223> Форвардный праймер к интрону tMCK

<400> 13

gtgaggcact gggcaggtaa

20

<210> 14

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер

<220>

<221> misc_feature

<223> Реверсный праймер к интрону tMCK

<400> 14

acctgtggag agaaaggcaa ag

22

<210> 15

<211> 39

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер

<220>
 <221> misc_feature
 <223> зонд к интрону tMCK

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' 6FAM

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> 3' TAMRA

<400> 15
 atcaaggтта саагасаггт ттааггагагс саатагааа 39

<210> 16
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер

<400> 16
 ссаасасггт сгсгсгсгтаа а 21

<210> 17
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Реверсный праймер МНСК7

<400> 17
 гтсссссага гсггггггггс 19

<210> 18
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер

<220>
 <221> misc_feature
 <223> зонд МНСК7

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 5' FAM

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Zen

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> 3IABKFQ

<400> 18
tggatcccct gcatgcgaag atc

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный AAV вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую β -саркогликан.

2. Рекомбинантный AAV вектор по п. 1, отличающийся тем, что полинуклеотидная последовательность, кодирующая β -саркогликан, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1.

3. Рекомбинантный AAV вектор по п. 1, отличающийся тем, что полинуклеотидная последовательность, кодирующая β -саркогликан, содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

4. Рекомбинантный AAV вектор по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что вектор имеет серотип AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 или AAV rh.74.

5. Рекомбинантный AAV вектор по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что полинуклеотидная последовательность функционально связана с регуляторным элементом, специфичным для мышц.

6. Рекомбинантный AAV вектор по п. 5, отличающийся тем, что регуляторный элемент, специфичный для мышц, представляет собой человеческий элемент гена актина скелетных мышц, элемент гена актина сердца, миоцит-специфичный связывающий энхансер фактор mef, мышечную креатинкиназу (MCK), усеченную MCK (tMCK), тяжелую цепь миозина (MHC), MHC7, C5-12, энхансерный элемент мышечной креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, элемент гена тропонина С медленно сокращающихся мышечных волокон сердца, элемент гена тропонина I медленно сокращающихся мышечных волокон, индуцируемые гипоксией ядерные факторы, стероид-индуцируемый элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (gre).

7. Рекомбинантный AAV вектор по п. 6, отличающийся тем, что специфичный для мышц регуляторный элемент представляет собой усеченную MCK (tMCK).

8. Рекомбинантный AAV вектор по п. 6, отличающийся тем, что

специфичный для мышц регуляторный элемент представляет собой МНСК7.

9. Рекомбинантный AAV вектор по пп. 1-8, содержащий нуклеотидную последовательность представленную в SEQ ID NO: 3.

10. Рекомбинантный AAV вектор по любому из пп. 1-8, содержащий нуклеотидную последовательность представленную в SEQ ID NO: 5.

11. Композиция, содержащая рекомбинантный AAV вектор по любому из пп. 1-10.

12. Способ лечения мышечной дистрофии у субъекта, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 или композиции по п. 11.

13. Способ увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта-млекопитающего, страдающего от мышечной дистрофии, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 или композиции по п. 11.

14. Способ уменьшения фиброза у субъекта, страдающего от мышечной дистрофии, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 или композиции по п. 11.

15. Способ уменьшения травмы, вызванной сокращением, у субъекта, страдающего от мышечной дистрофии, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 или композиции по п. 11.

16. Способ лечения β -саркогликанопатии у субъекта, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 или композиции по п. 11.

17. Способ по любому из пп. 12-16, отличающийся тем, что субъект страдает от мышечной дистрофии лимба-пояса (limb-girdle muscular dystrophy).

18. Способ по любому из пп. 12-17, отличающийся тем, что

рекомбинантный AAV вектор или композицию вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

19. Способ по любому из пп. 12-17, отличающийся тем, что рекомбинантный AAV вектор или композицию вводят системно.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что рекомбинантный AAV вектор или композиция представляет собой парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации.

21. Способ по любому из пп. 12-20, дополнительно включающий в себя введение второго рекомбинантного AAV вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, содержащую miR29C.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что второй рекомбинантный вектор содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

23. Способ по п. 21 или 22, отличающийся тем, что второй рекомбинантный AAV вектор вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

24. Композиция, содержащая рекомбинантный AAV вектор по любому из пп. 1-10 для уменьшения фиброза у субъекта-млекопитающего, нуждающегося в этом.

25. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что субъект страдает от мышечной дистрофии.

26. Композиция, содержащая рекомбинантный AAV вектор по любому из пп. 1-10 для лечения β -саркогликанопатии у нуждающегося в этом субъекта-млекопитающего.

27. Композиция по п. 26, отличающаяся тем, что субъект страдает от мышечной дистрофии.

28. Композиция, содержащая рекомбинантный AAV вектор по любому из пп. 1-10 для увеличения мышечной силы у субъекта-млекопитающего, страдающего от мышечной дистрофии.

29. Композиция, содержащая рекомбинантный AAV вектор по любому из пп. 1-10 для лечения мышечной дистрофии.

30. Композиция по любому из пп. 24-29, отличающаяся тем, что мышечная дистрофия является мышечной дистрофией лимба-пояса.

31. Композиция по любому из пп. 24-30, дополнительно

содержащая второй рекомбинантный AAV вектор, содержащий нуклеотидную последовательность miR-29.

32. Композиция по п. 31, отличающаяся тем, что второй rAAV содержит второй рекомбинантный вектор содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

33. Композиция по любому из пп. 24-32, которая приготовлена для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

34. Композиция по любому из пп. 24-34, которая представляет собой препарат для системного введения.

35. Композиция по п. 34, отличающаяся тем, что системное введение представляет собой парентеральное введение путем инъекции, инфузии или имплантации.

36. Применение рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 или композиции по п. 11 для приготовления лекарственного средства для уменьшения фиброза у субъекта-млекопитающего, нуждающегося в этом.

37. Применение рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 или композиции по п. 11 для приготовления лекарственного средства для увеличения мышечной силы у субъекта-млекопитающего, нуждающегося в этом.

38. Применение по п. 36 или 37, отличающееся тем, что субъект страдает от мышечной дистрофии.

39. Применение рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 или композиции по п. 11 для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии у субъекта-млекопитающего.

40. Применение по п. 38 или 39, отличающееся тем, что мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию лимба-пояса.

41. Применение по любому из пп. 36-40, отличающееся тем, что лекарственное средство дополнительно содержит второй рекомбинантный AAV вектор, содержащий нуклеотидную последовательность miR-29.

42. Применение рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 или композиции по п. 11 в комбинации с вторым

рекомбинантным AAV вектором, содержащим полинуклеотидную последовательность, содержащую miR29c, для получения лекарственного средства для уменьшения фиброза у субъекта-млекопитающего, нуждающегося в этом.

43. Применение по п. 41 или 42, отличающееся тем, что второй рекомбинантный вектор содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

44. Применение рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 композиции по п. 11 в комбинации с вторым рекомбинантным AAV вектором, содержащим полинуклеотидную последовательность, содержащую miR-29c, в приготовлении лекарственного средства для увеличения мышечной силы у субъекта-млекопитающего, нуждающегося в этом.

45. Применение по п. 44, отличающееся тем, что второй рекомбинантный вектор содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

46. Применение по любому из пп. 39-45, отличающееся тем, что субъект страдает от мышечной дистрофии.

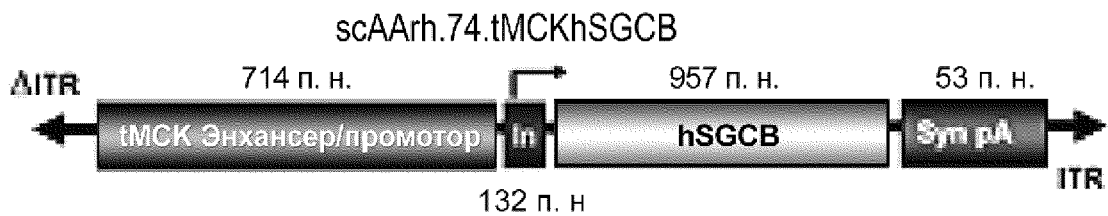
47. Применение рекомбинантного AAV вектора по любому из пп. 1-10 композиции по п. 11 в комбинации с вторым рекомбинантным AAV вектором, содержащим полинуклеотидную последовательность, содержащую miR-29c, для приготовления лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии у субъекта-млекопитающего.

48. Применение по п. 47, отличающееся тем, что второй рекомбинантный вектор содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

49. Применение по п. 47 или 48, отличающееся тем, что мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию лимба-пояса.

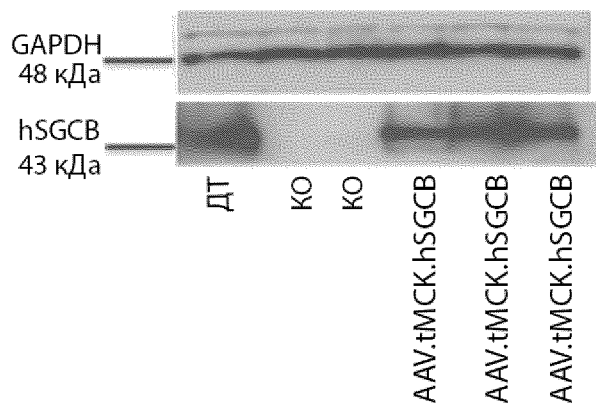
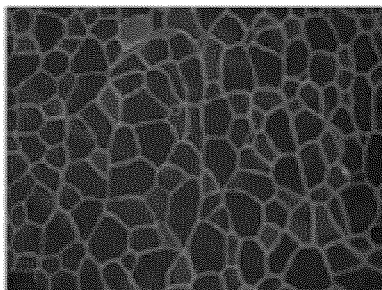
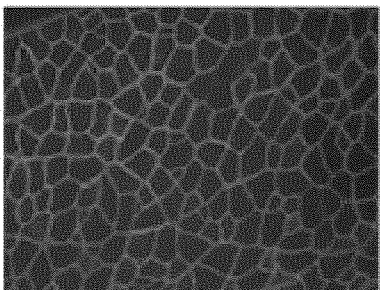
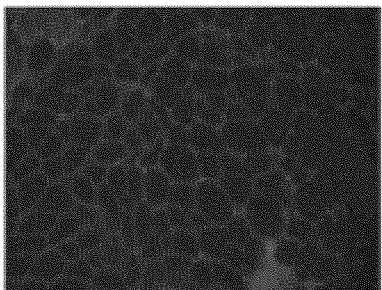
По доверенности

Фиг. 1А

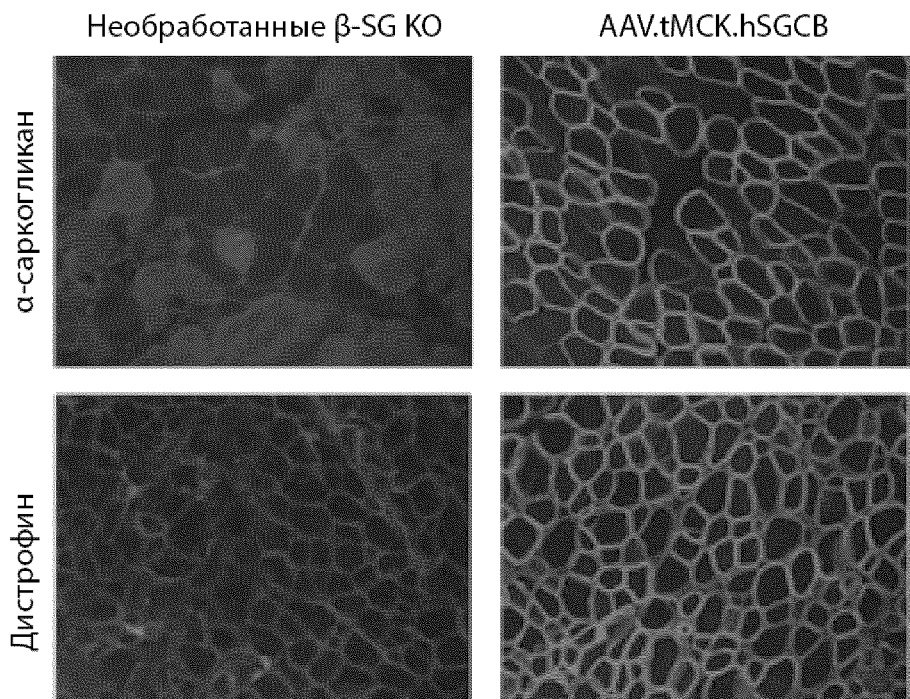


Фиг. 1В

Необработанные β-SG KO AAV.tMCK.hSGCB – 6 недель AAV.tMCK.hSGCB – 12 недель



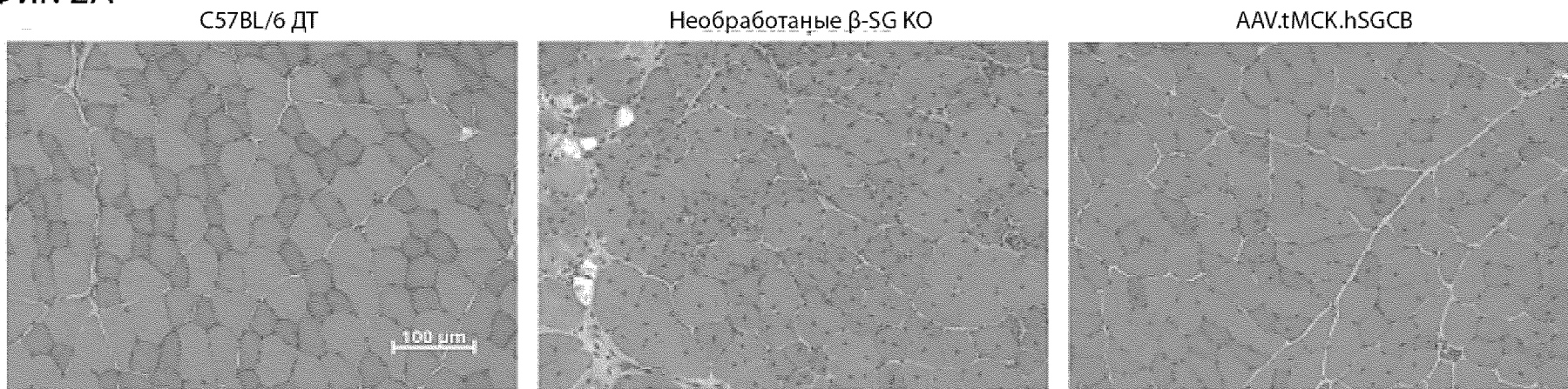
Фиг. 1С



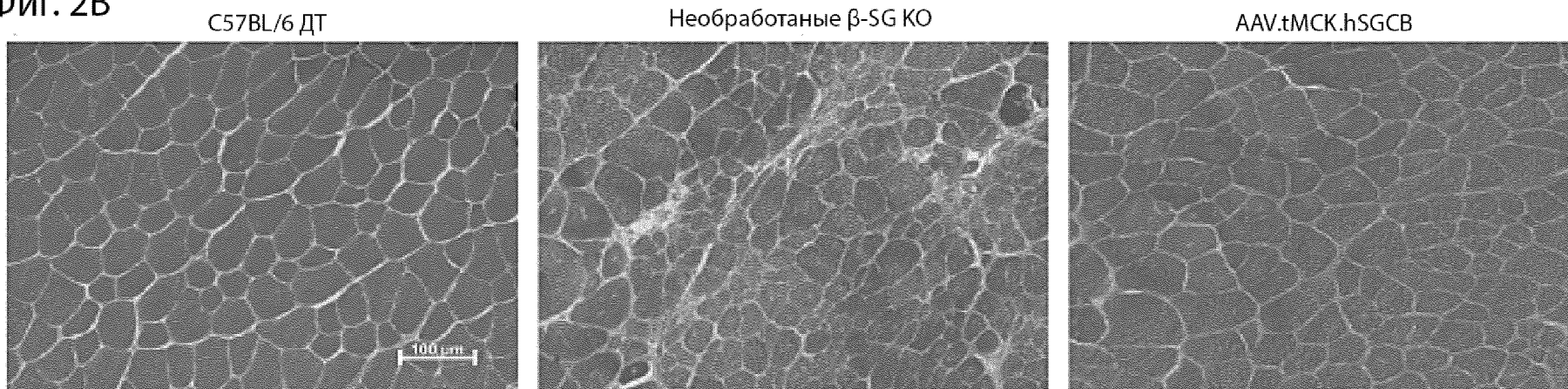
Фиг. 1D

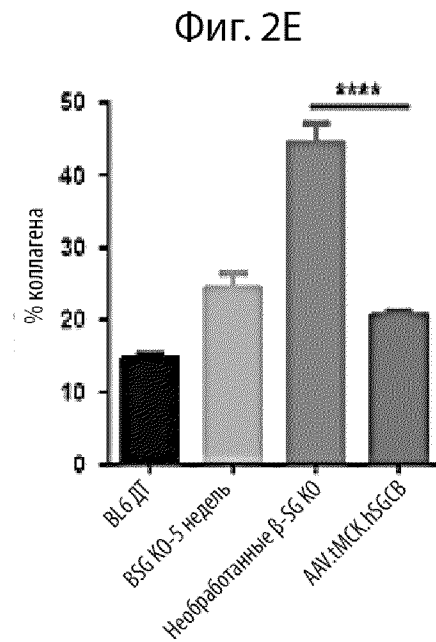
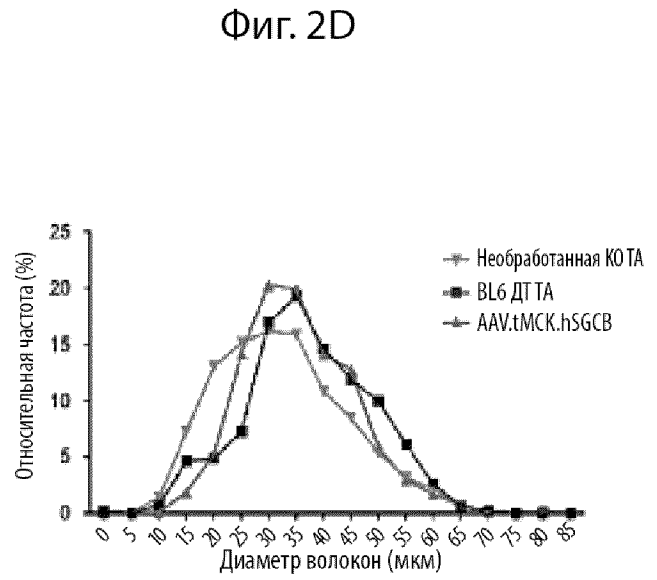
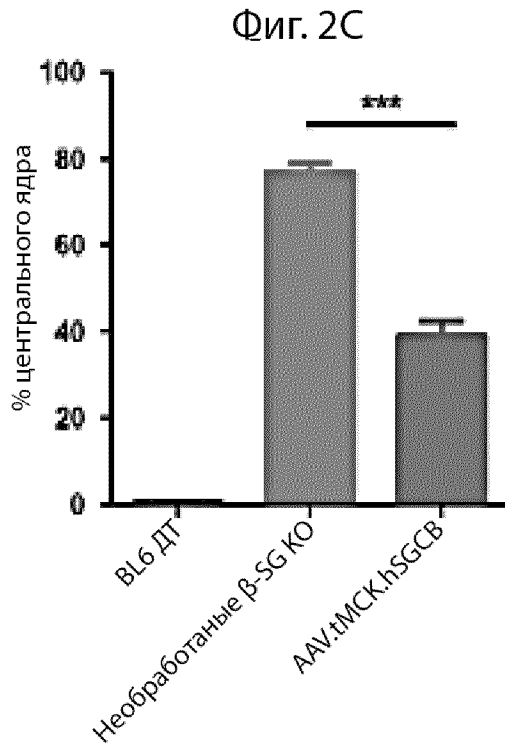


Фиг. 2А

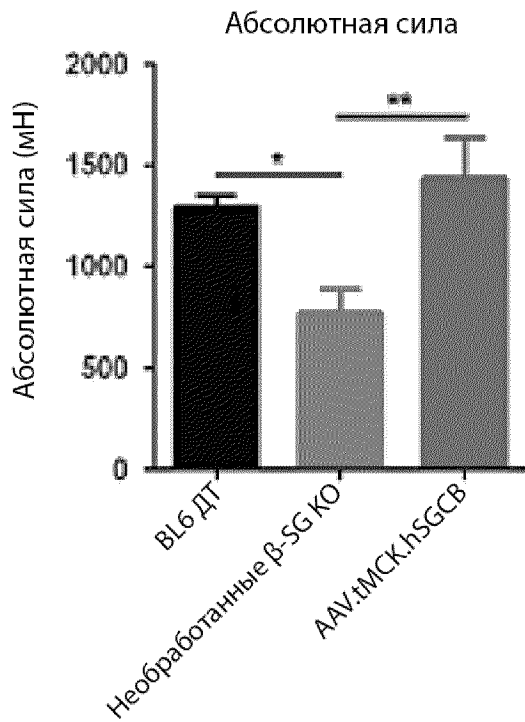


Фиг. 2В

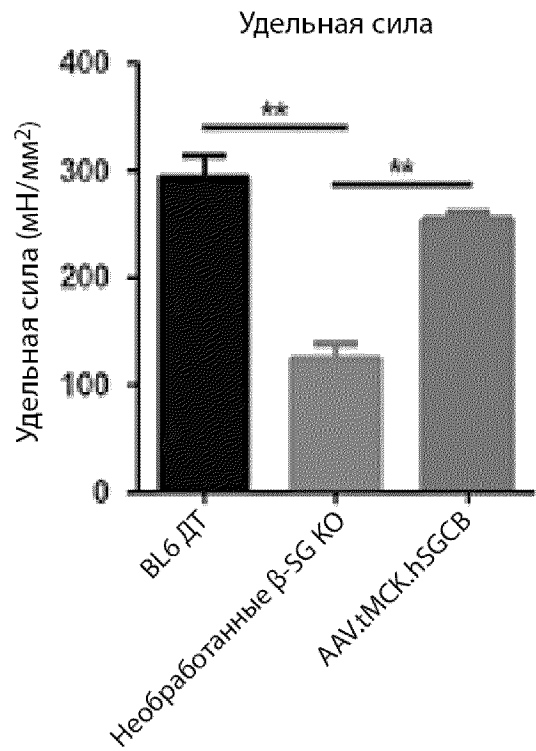




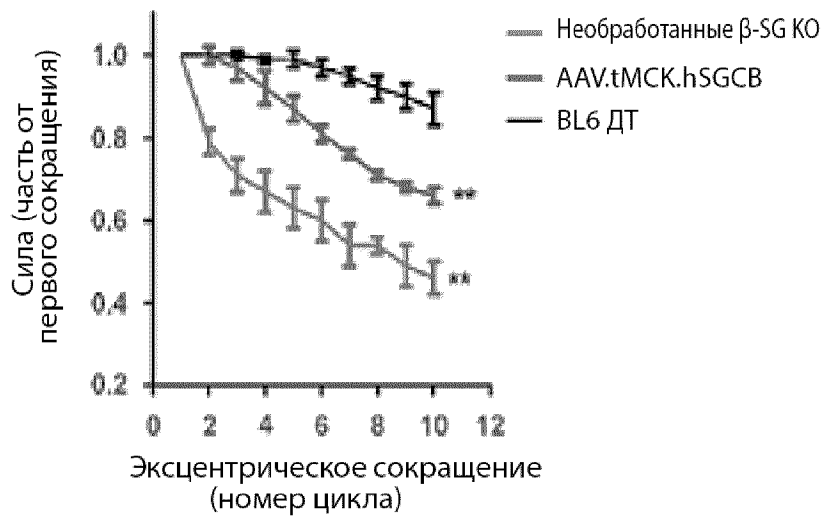
Фиг. 3А



Фиг. 3В

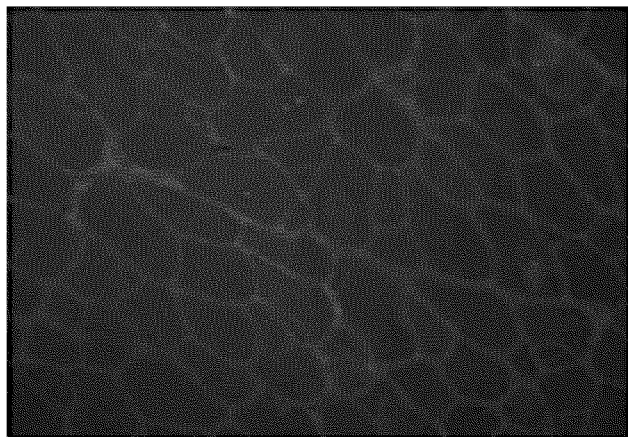


Фиг. 3С

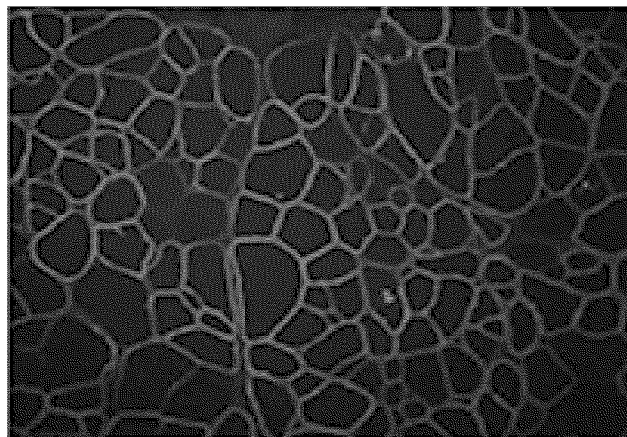


Фиг. 4А

Необработанные β -SG KO

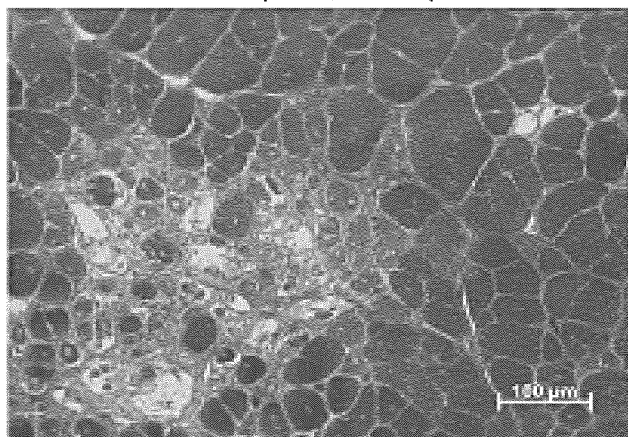


AAV.tMCK.hSGCB

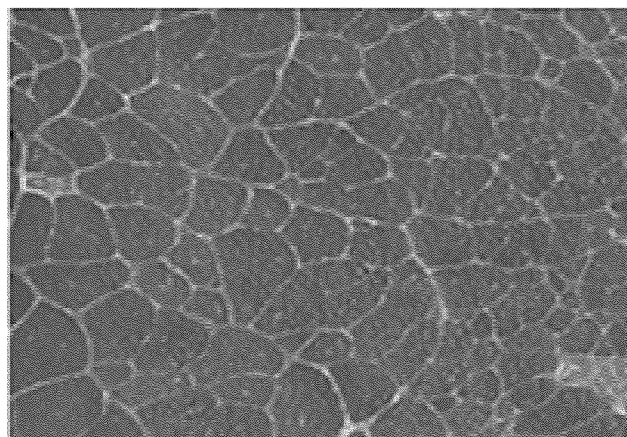


Фиг. 4В

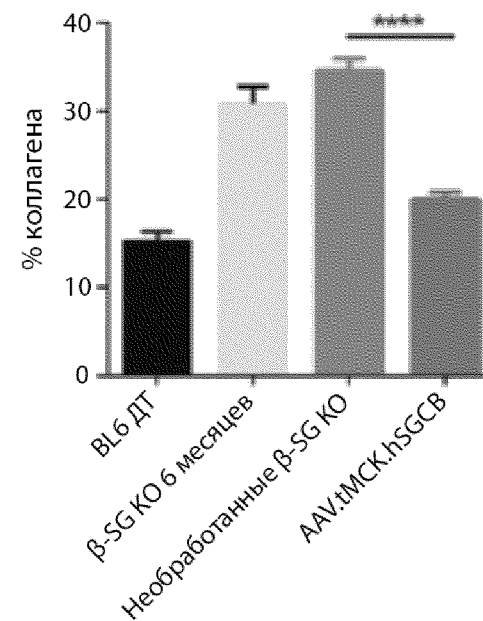
Необработанные β -SG KO



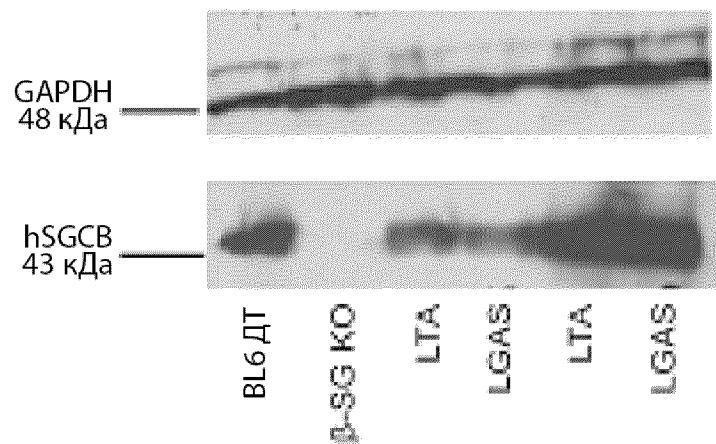
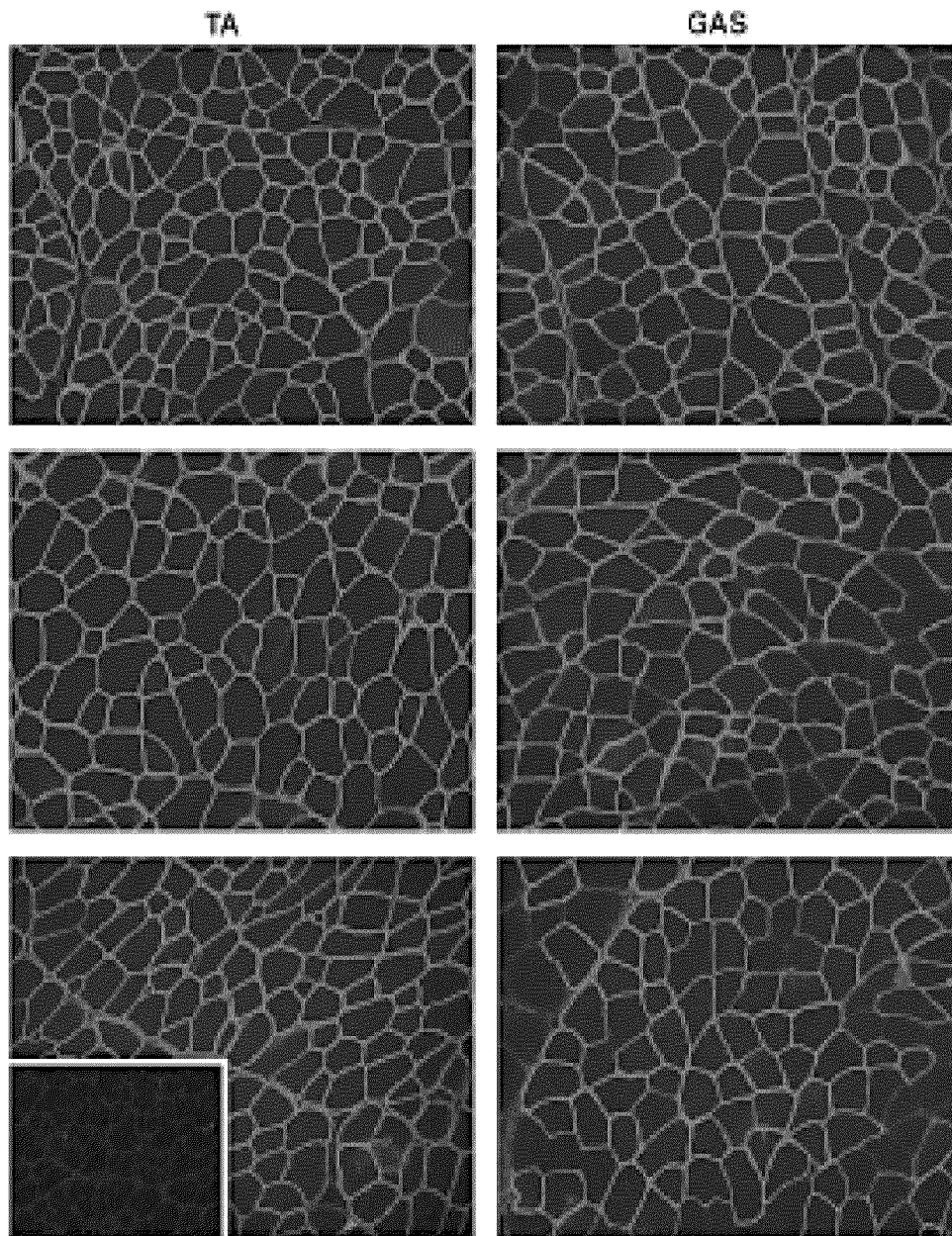
AAV.tMCK.hSGCB



Фиг. 4С

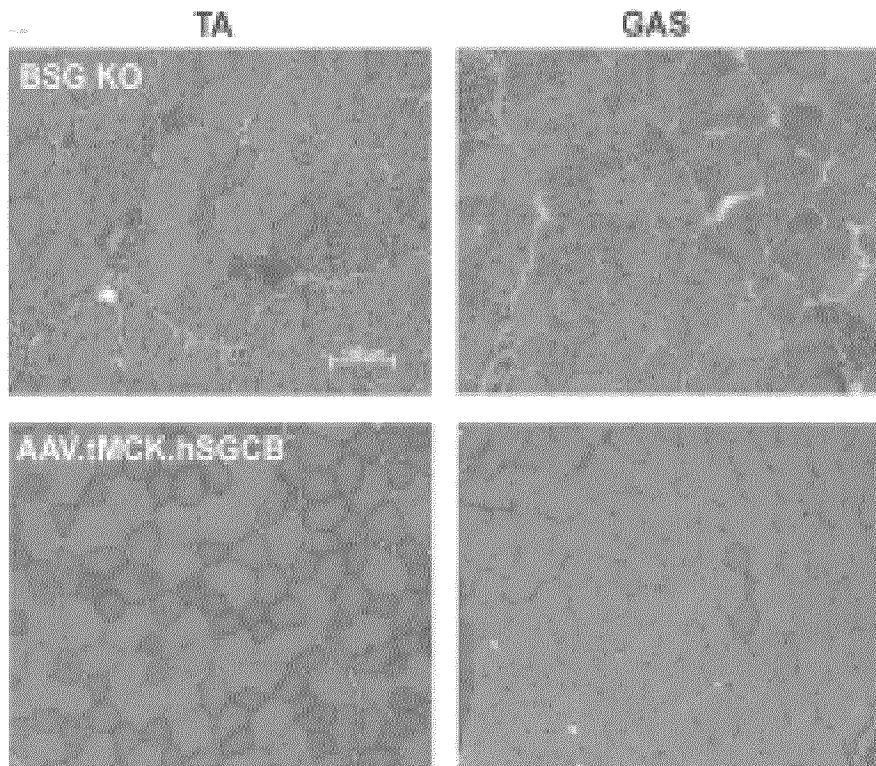


Фиг. 5А

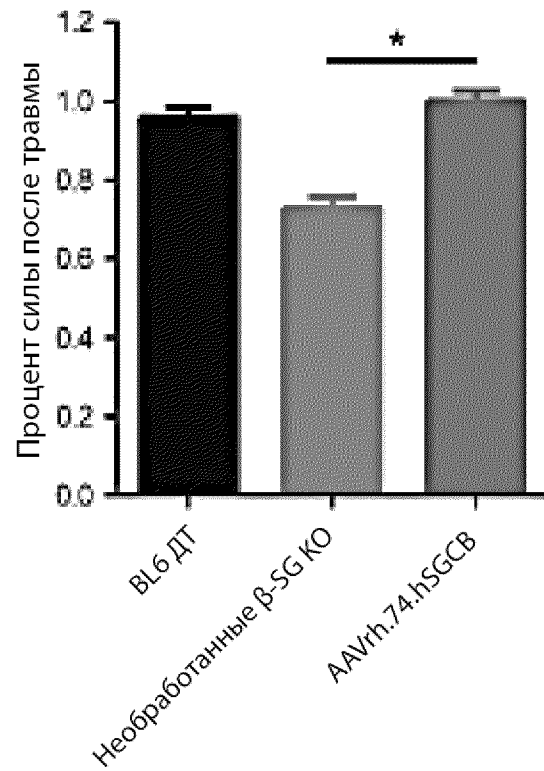


8/27

Фиг. 5В



Фиг. 5С

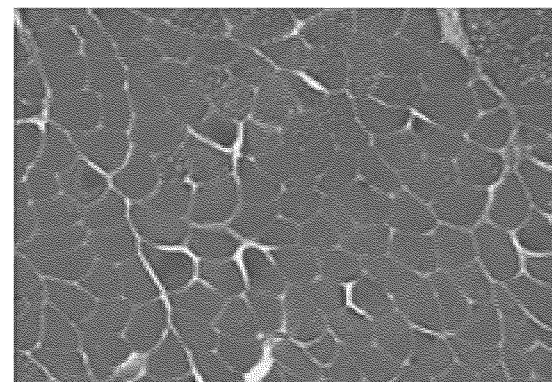
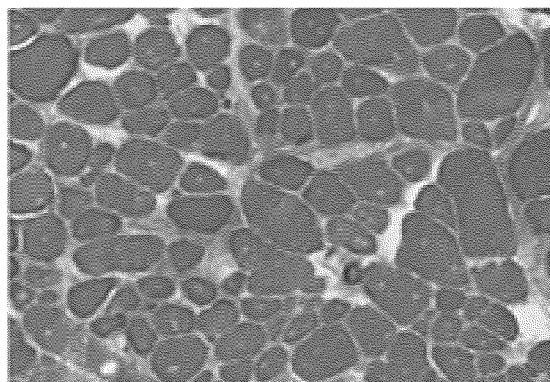
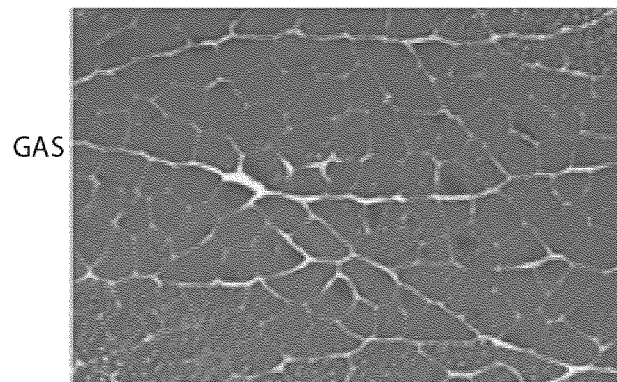
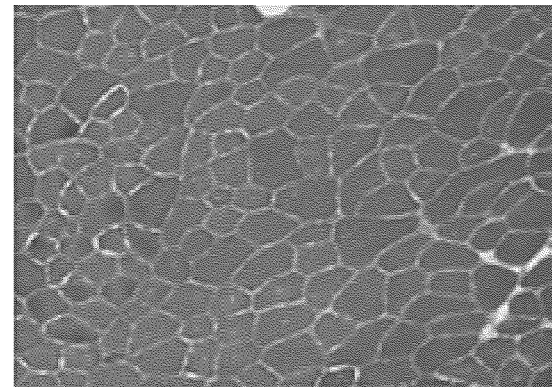
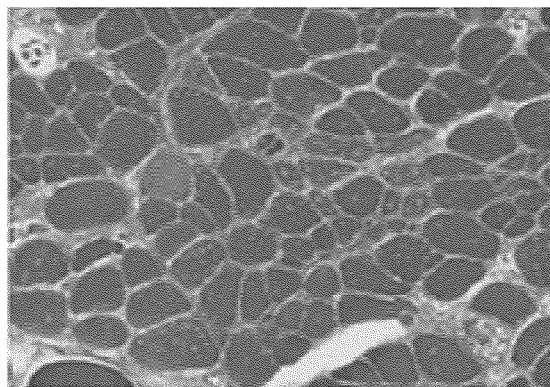
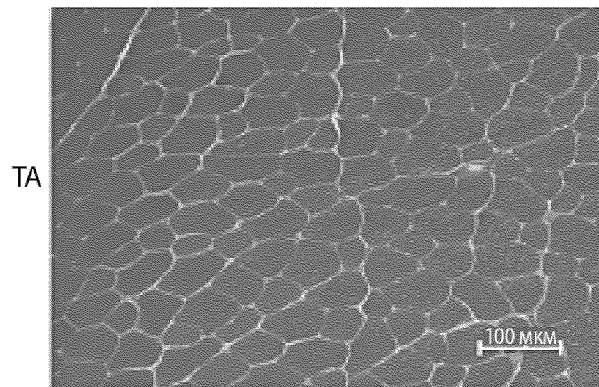


Фиг. 6А

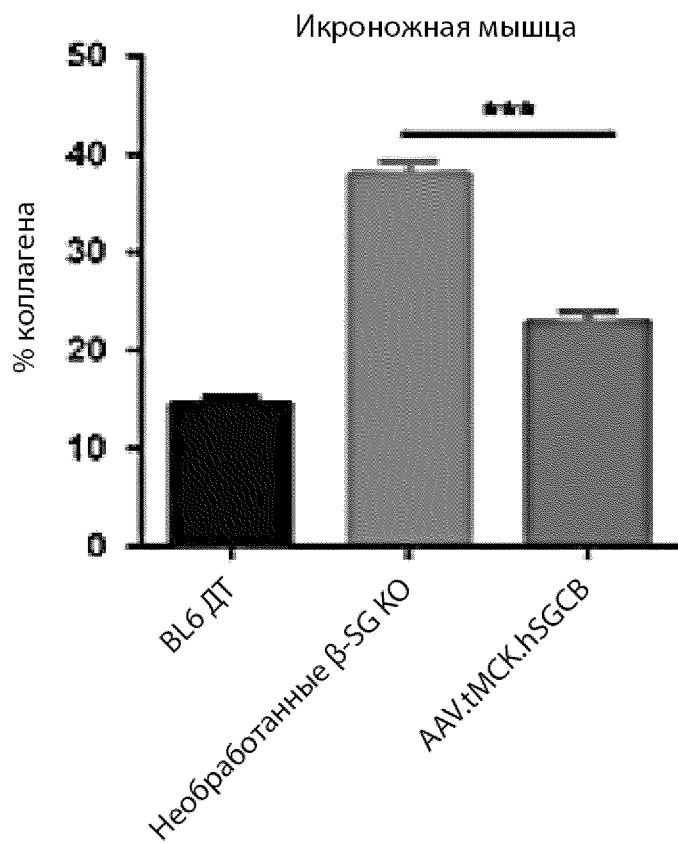
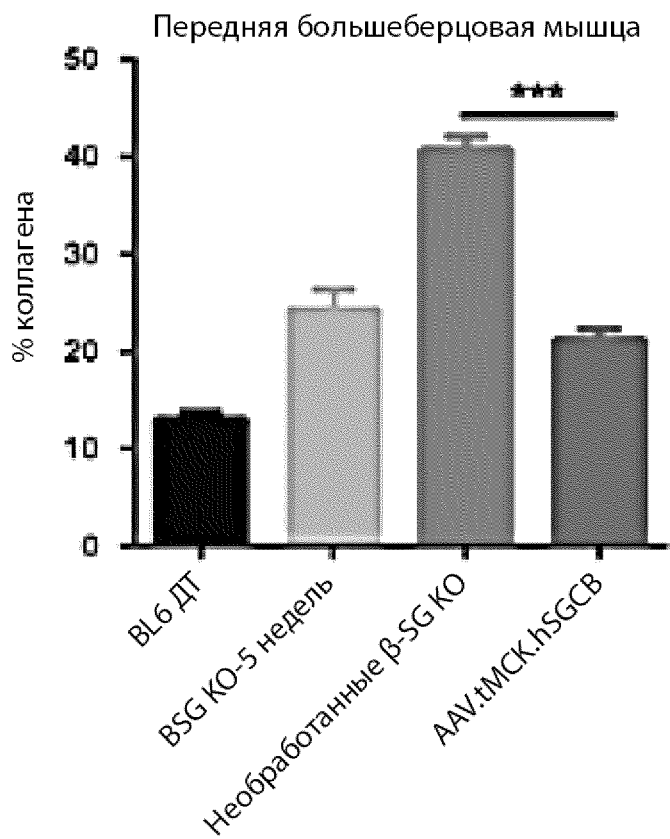
C57BL/6 ДТ

Необработанные β -SG KO

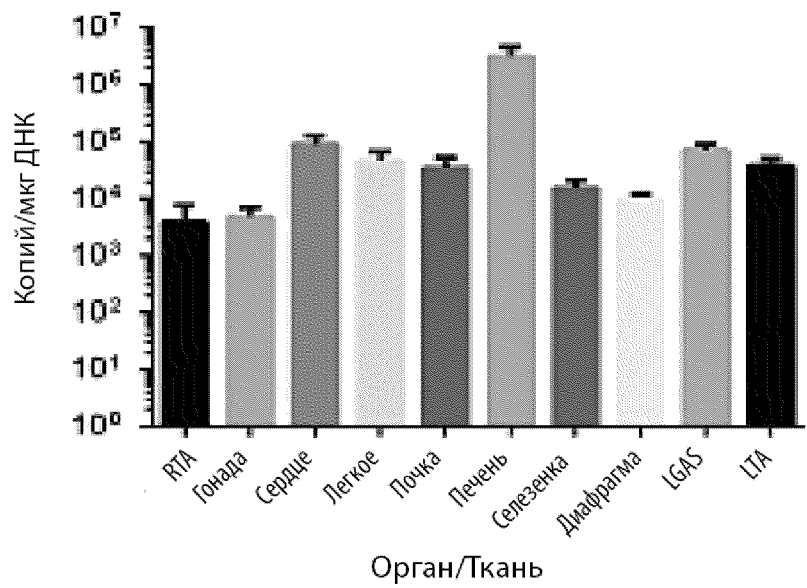
AAV.tMCK.hSGCB



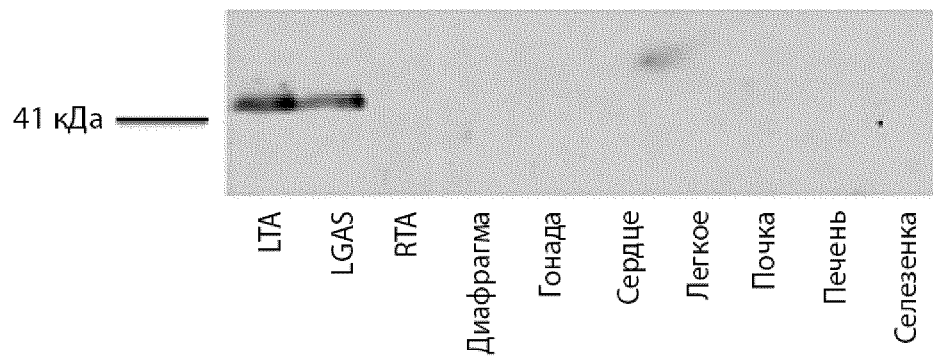
Фиг. 6В



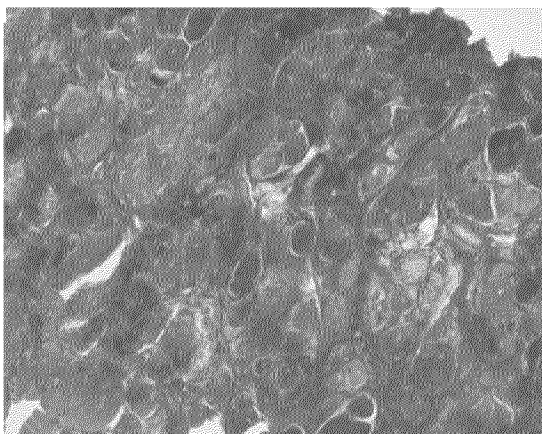
Фиг. 7А



Фиг. 7В

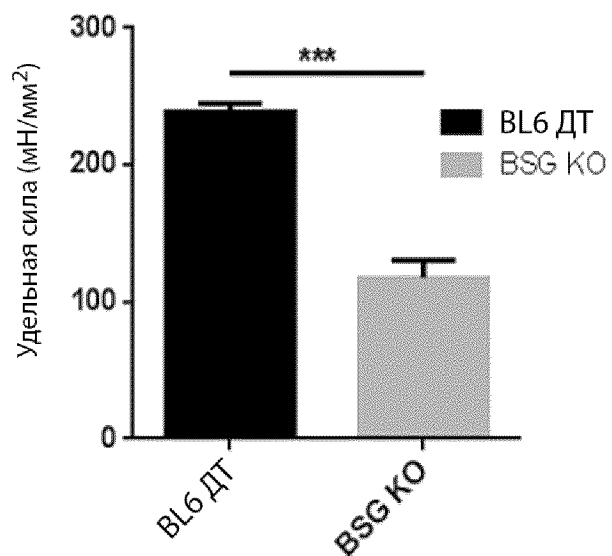


Фиг. 8А

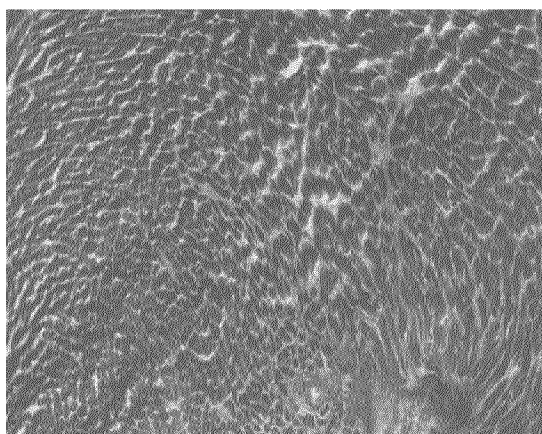


Фиг. 8В

Удельная сила

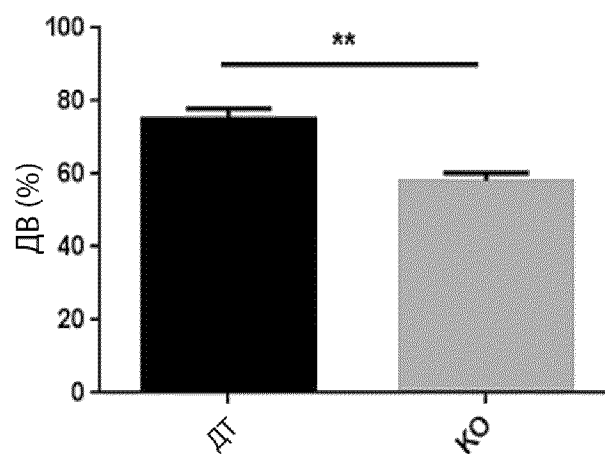


Фиг. 8С



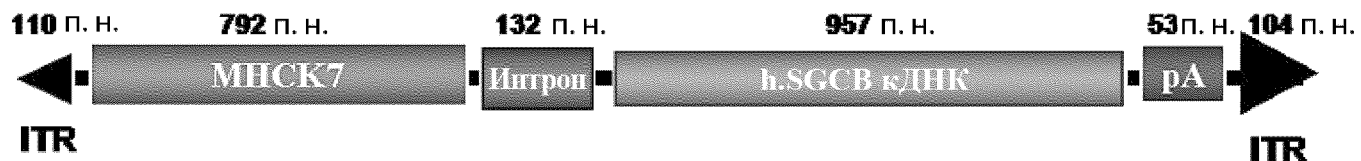
Фиг. 8D

Доля выброса



Фиг. 9

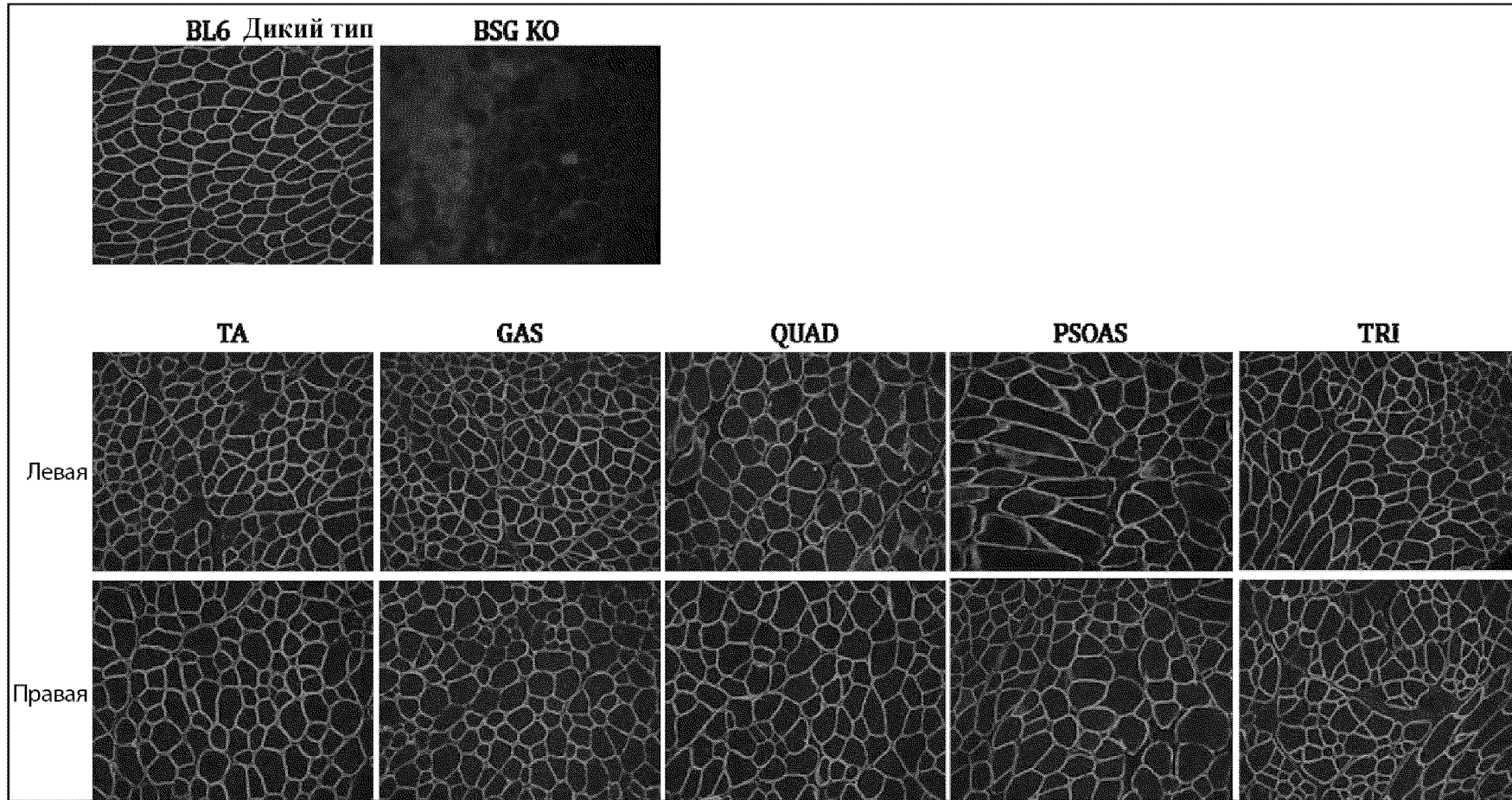
scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB



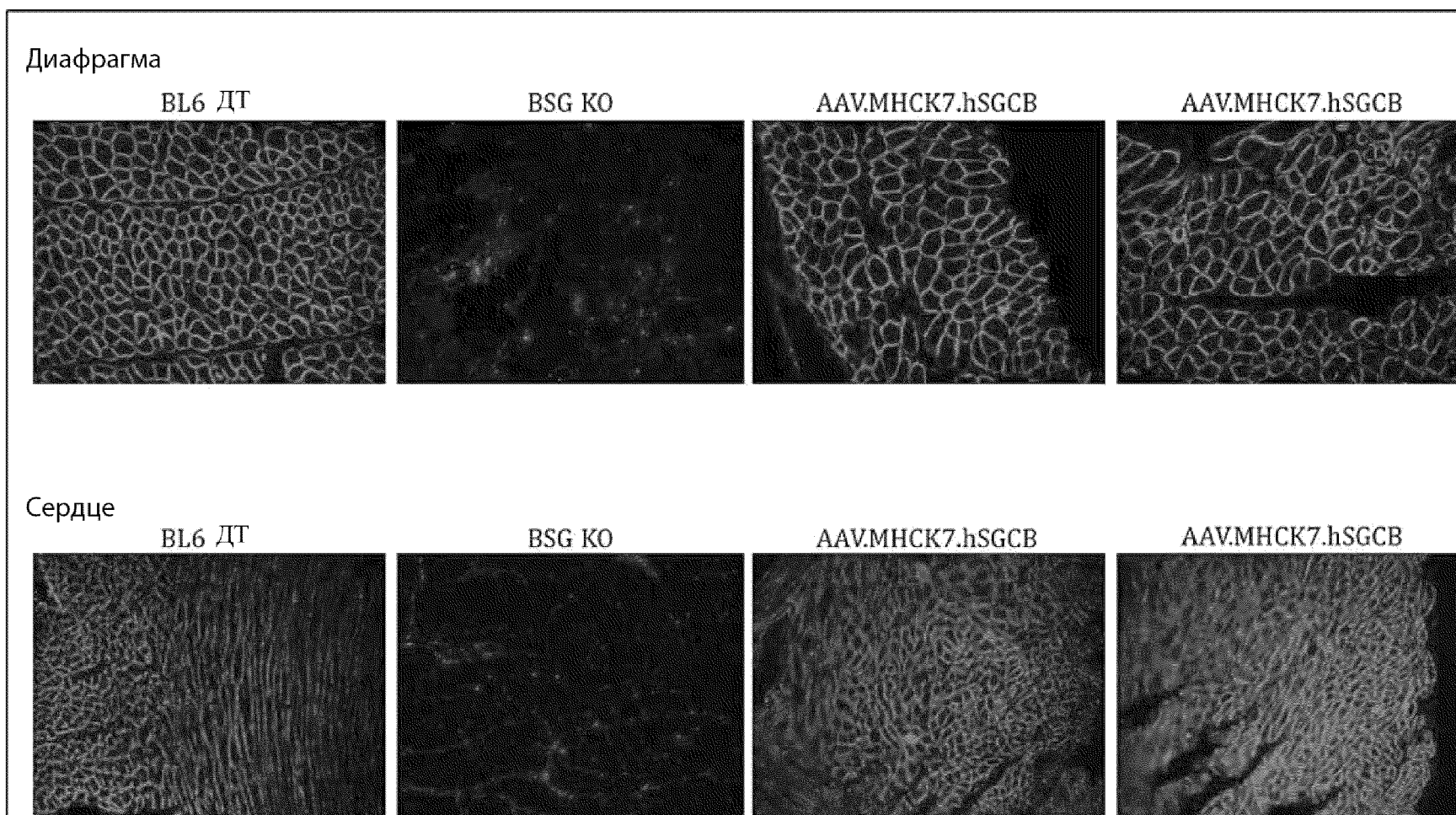
кассета scAAV.MHCK7.hSGCB

Фиг. 10

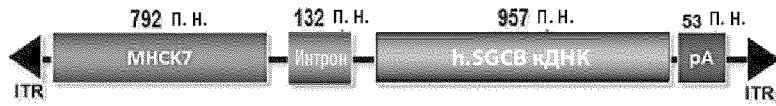
Введение scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB через хвостовую вену мышам SGCB^{-/-} приводит к почти 100% трансдукции мышечных волокон в каждой мышце



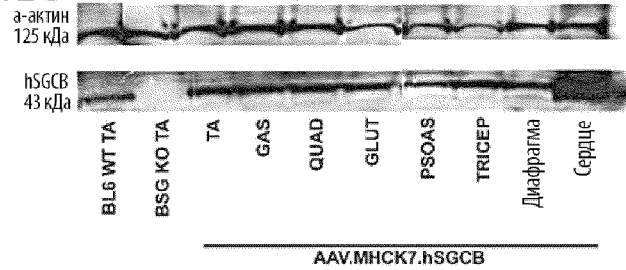
Фиг. 11



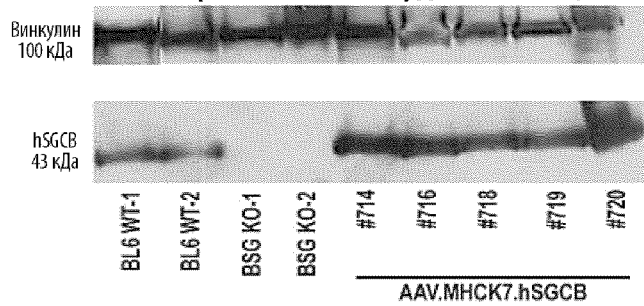
Фиг. 12А scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB



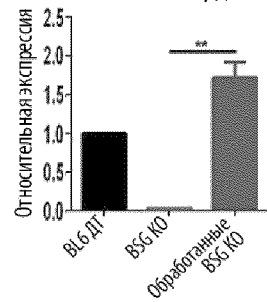
Фиг. 12С Экспрессия hSGCB в мышце



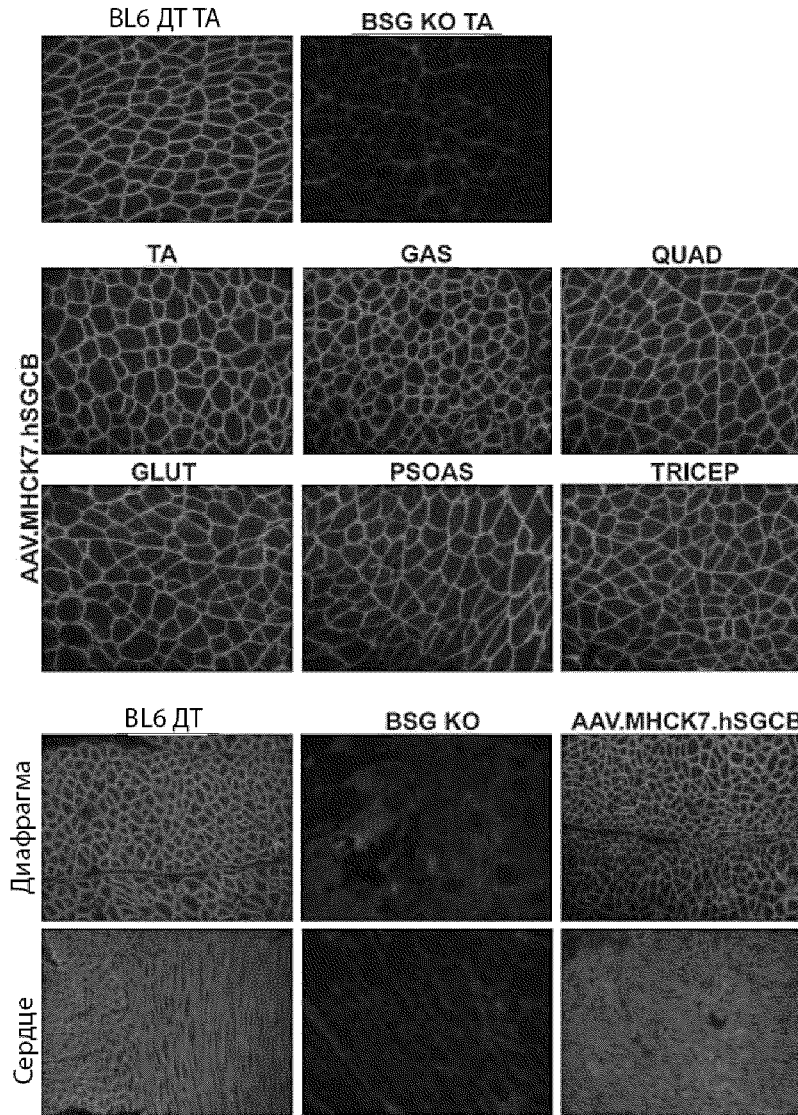
Фиг. 12D Экспрессия hSGCB в сердечной мышце



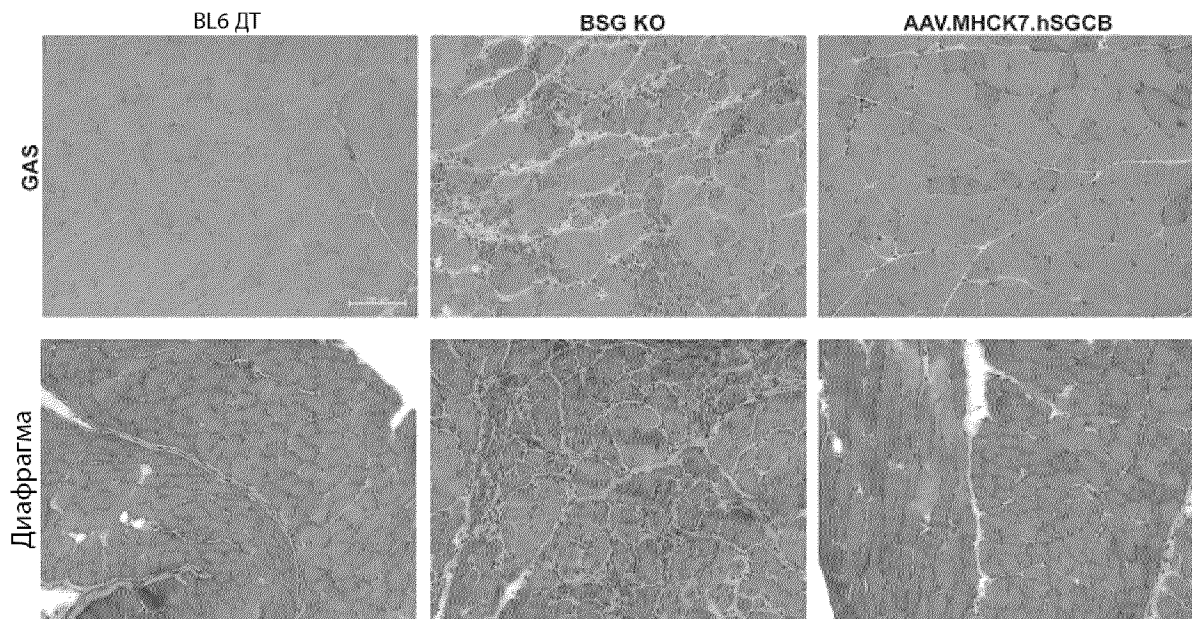
Экспрессия белка SGCB в сердечной мышце



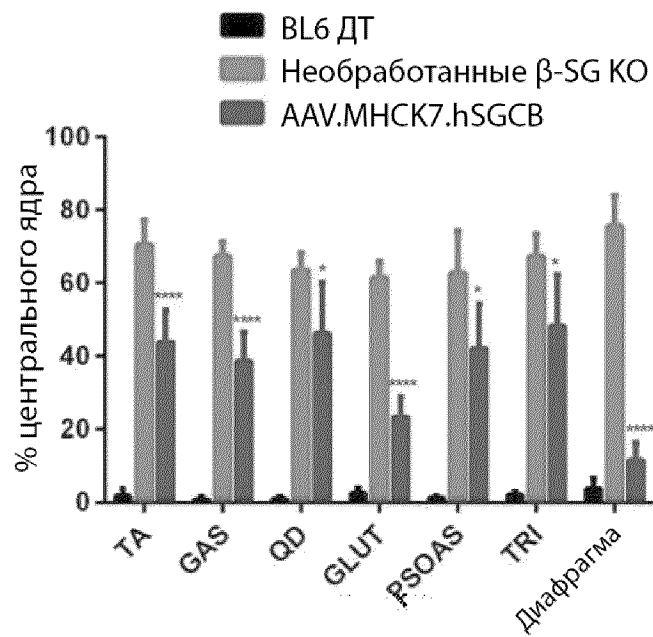
Фиг. 12В



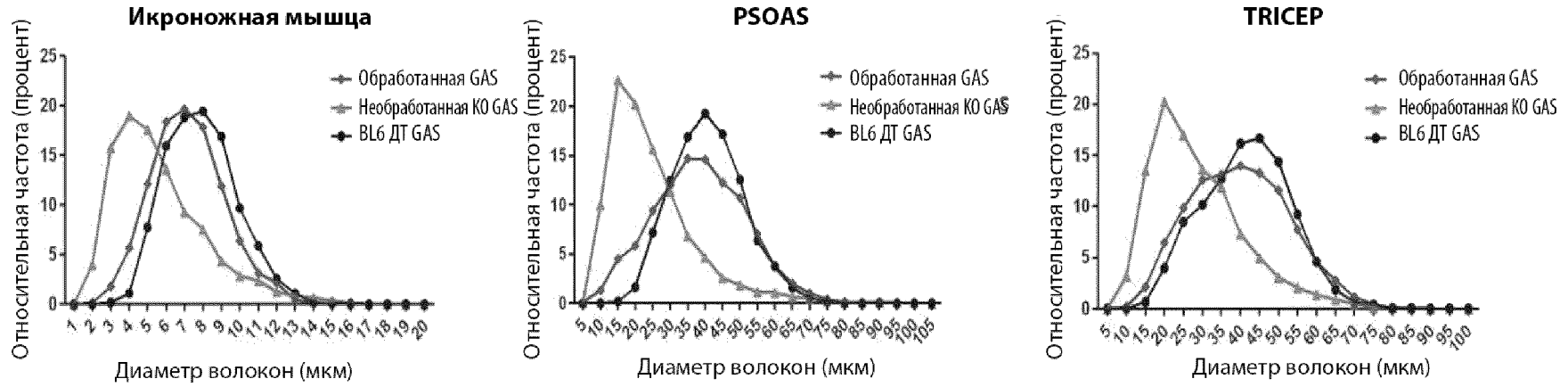
Фиг. 13А



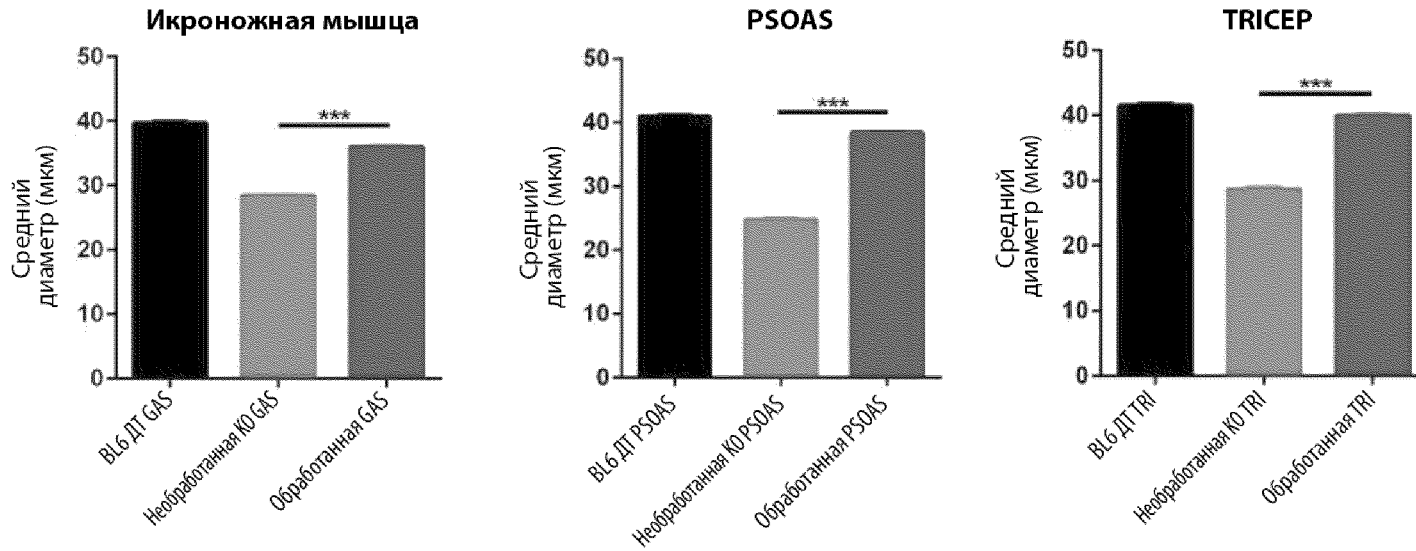
Фиг. 13В



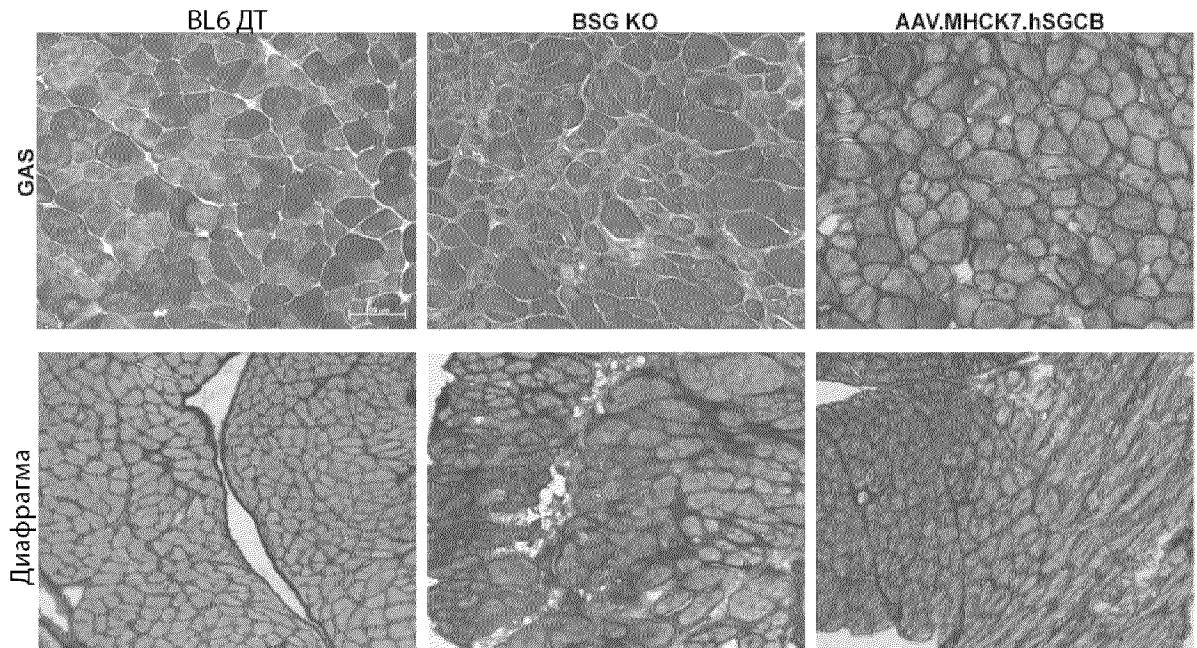
Фиг. 13С



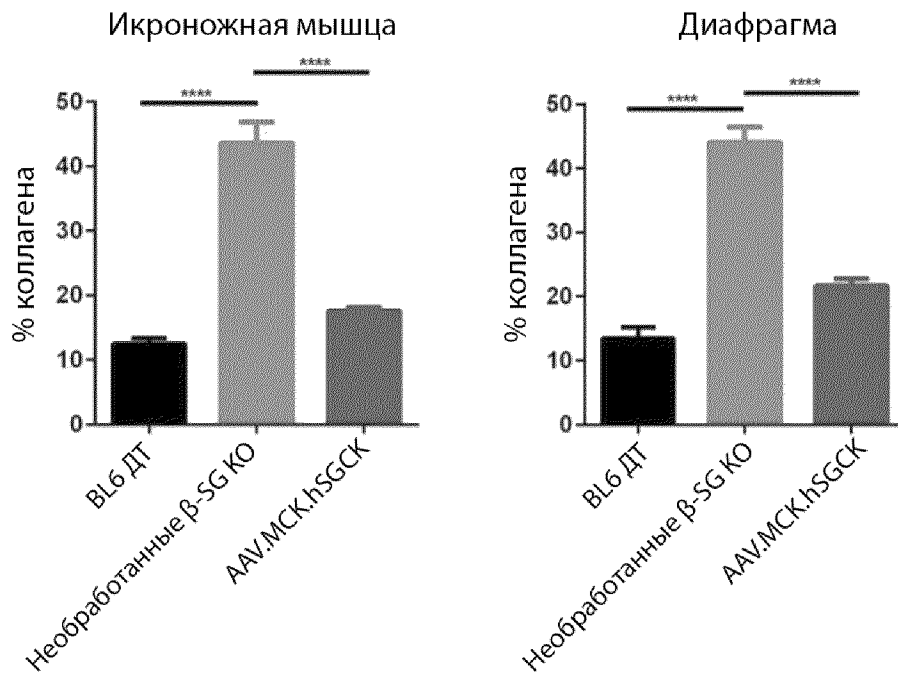
Фиг. 13D



Фиг. 14А

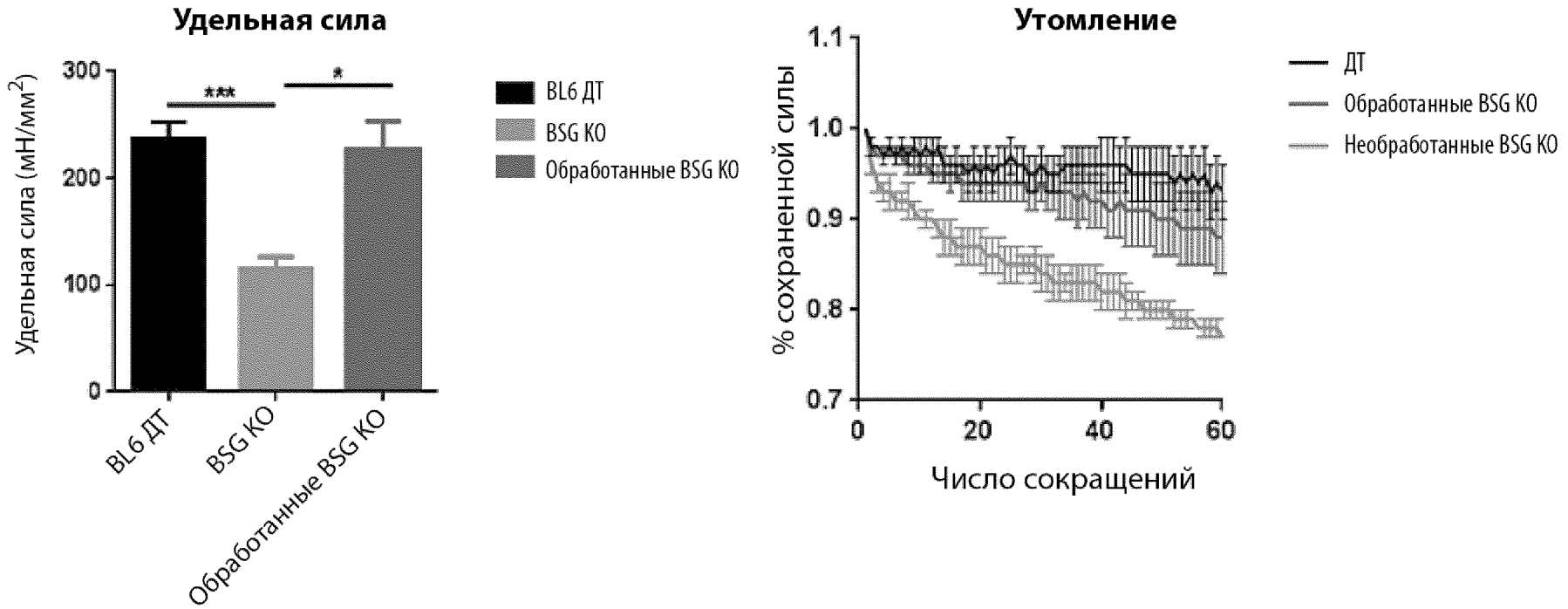


Фиг. 14В



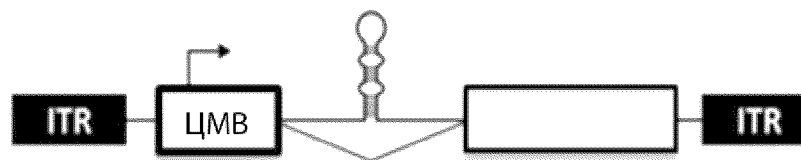
Фиг. 15

МНСК7.hSGCB 6 месяцев ВВ1е12гв



scAAVrh.74.CMV.miR29c

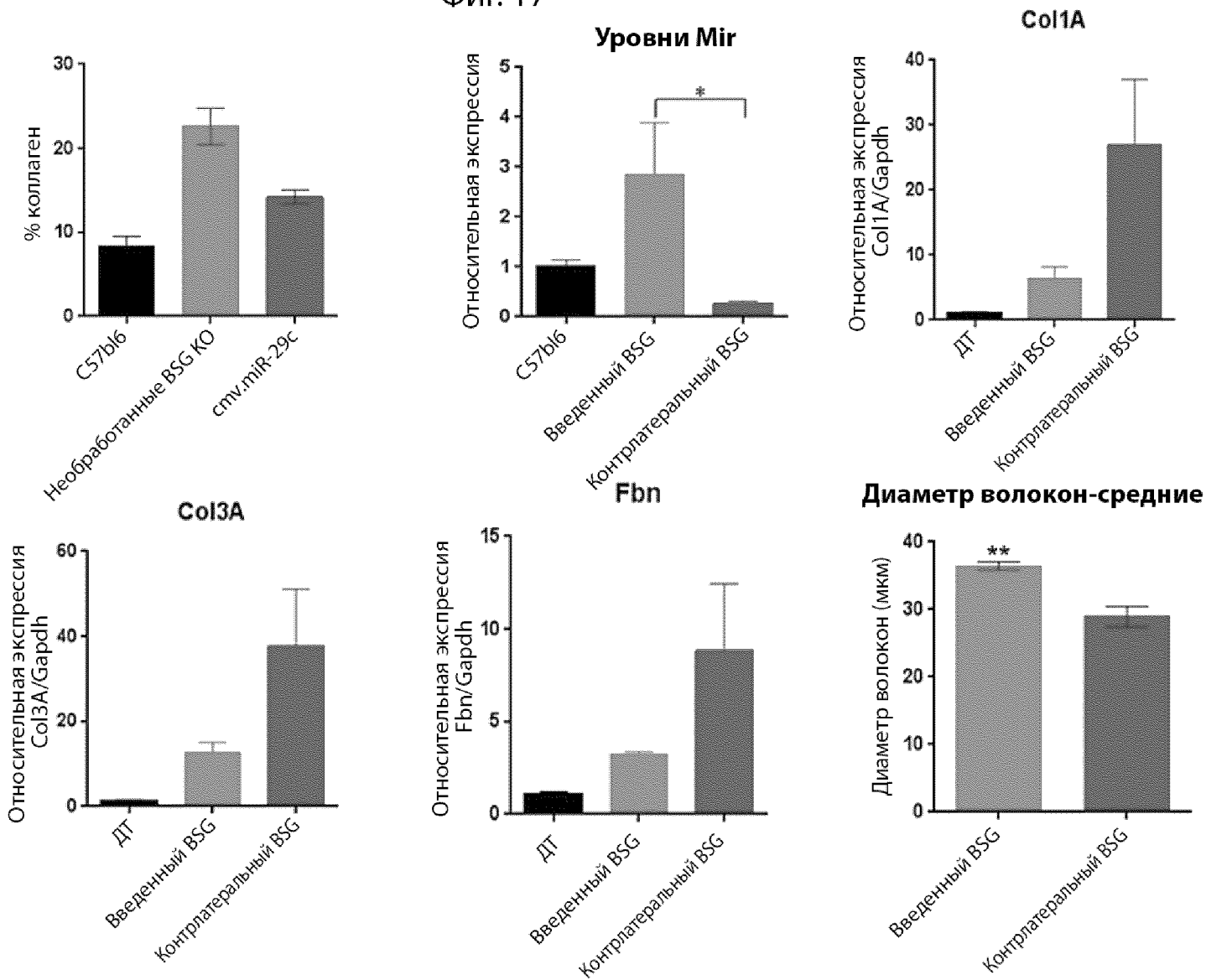
Фиг. 16



SEQ ID: 9: miR29C в основе miR-30

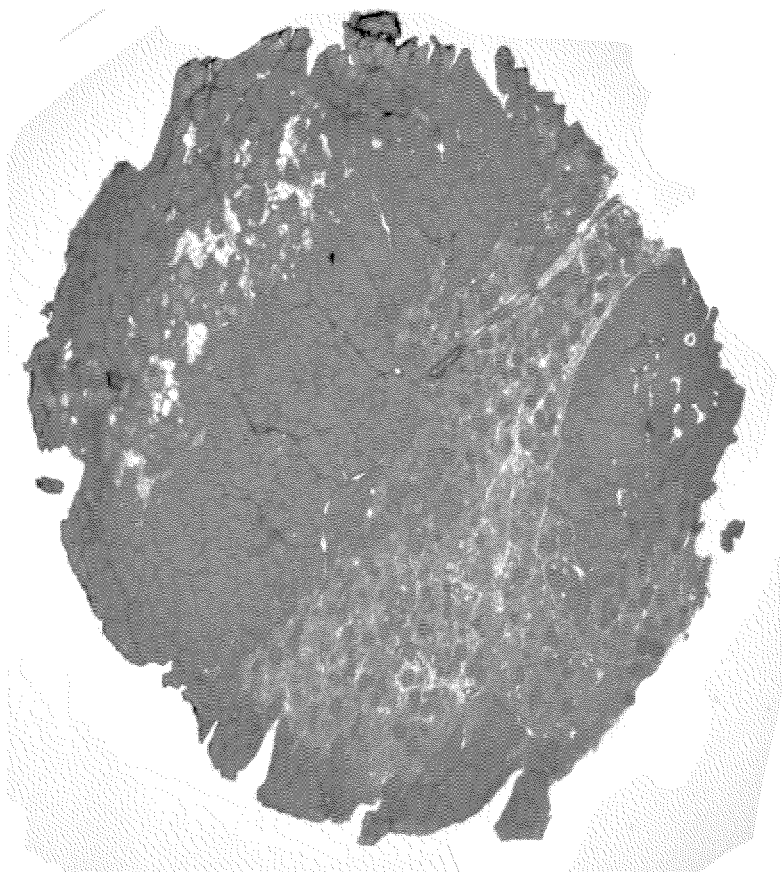
GGCCGGCC*gtttgaatgaggcttcagtactttacagaat*CGTTGCCTGCACATCTTGGAACACTTGCTGGGATTAC
TTCTTCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCAACC
GATTTCAAATGGTGCTAGAGTGAAGCCACAGATGTCTAGCACCATTGAAATCGGTTATGCCTA
CTGCCTCGGAATTCAAGGGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT
GCTATCTCTTGATACATTGGCCGGCC

Фиг. 17



Фиг. 18

Необработанные SGCB-/-

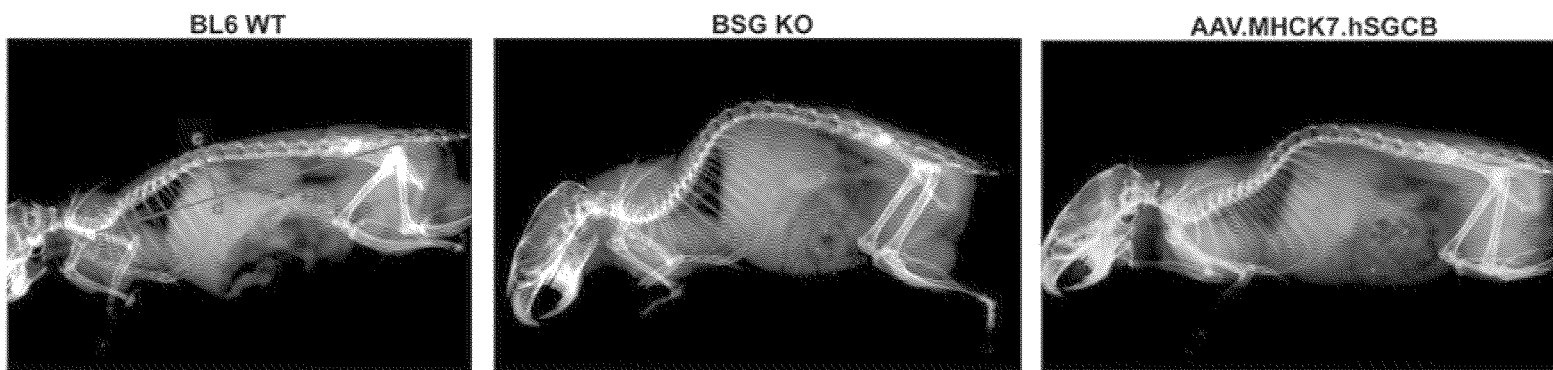


Обработанные AAVrh.74.CMV.miR29c SGCB-/-



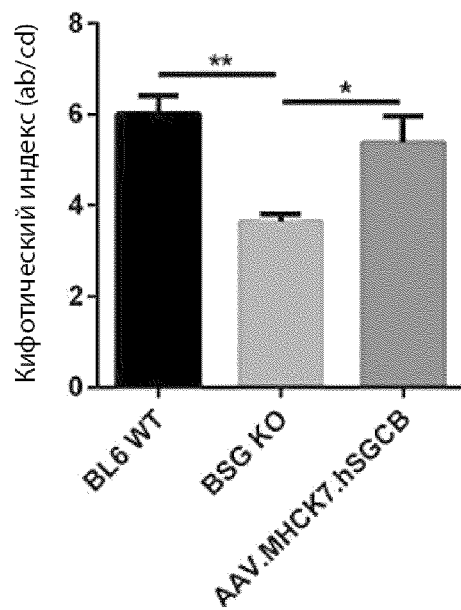
ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

Фиг. 19А

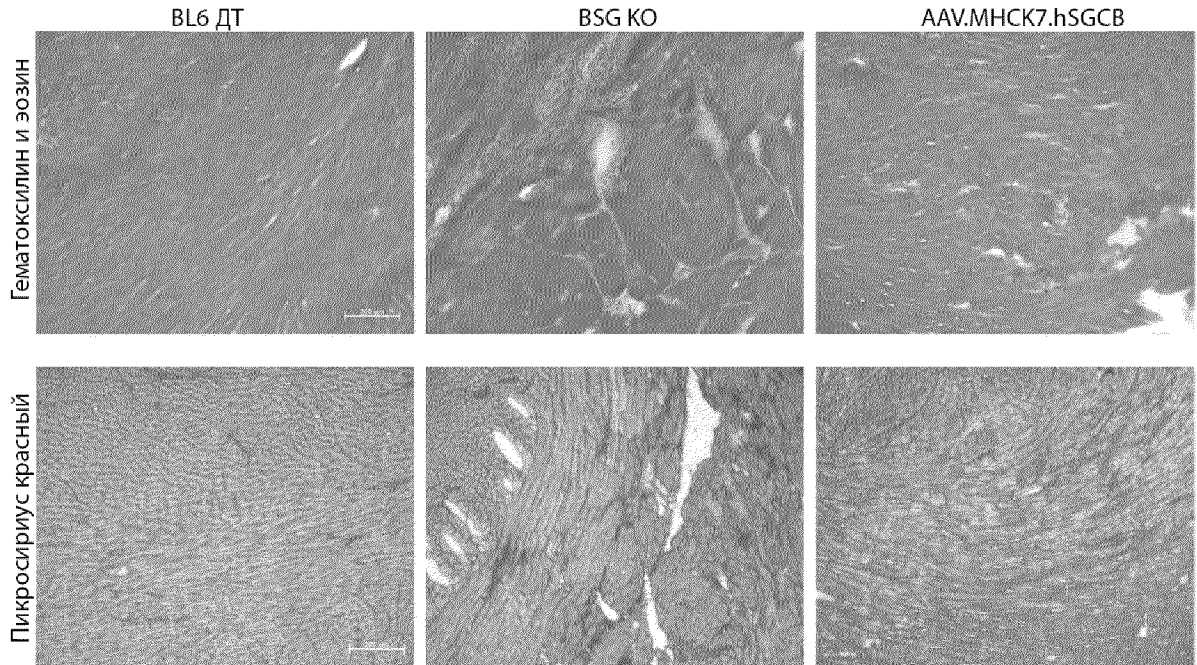


Фиг. 19В

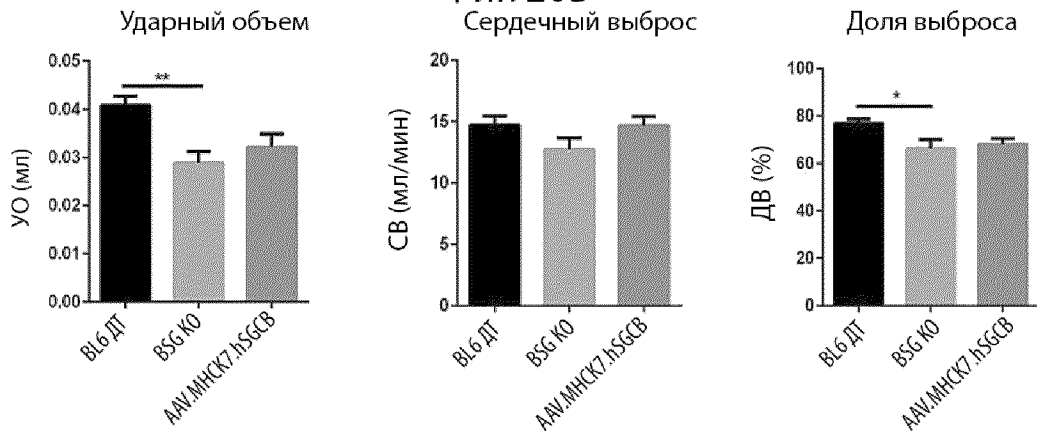
Кифосколиоз



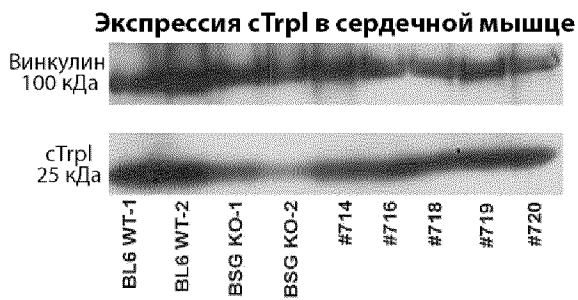
Фиг. 20А



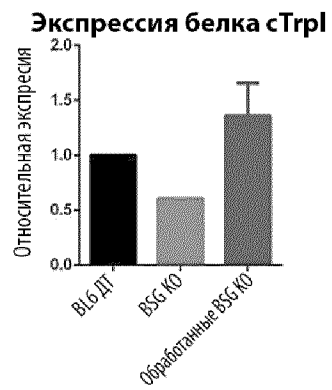
Фиг. 20В



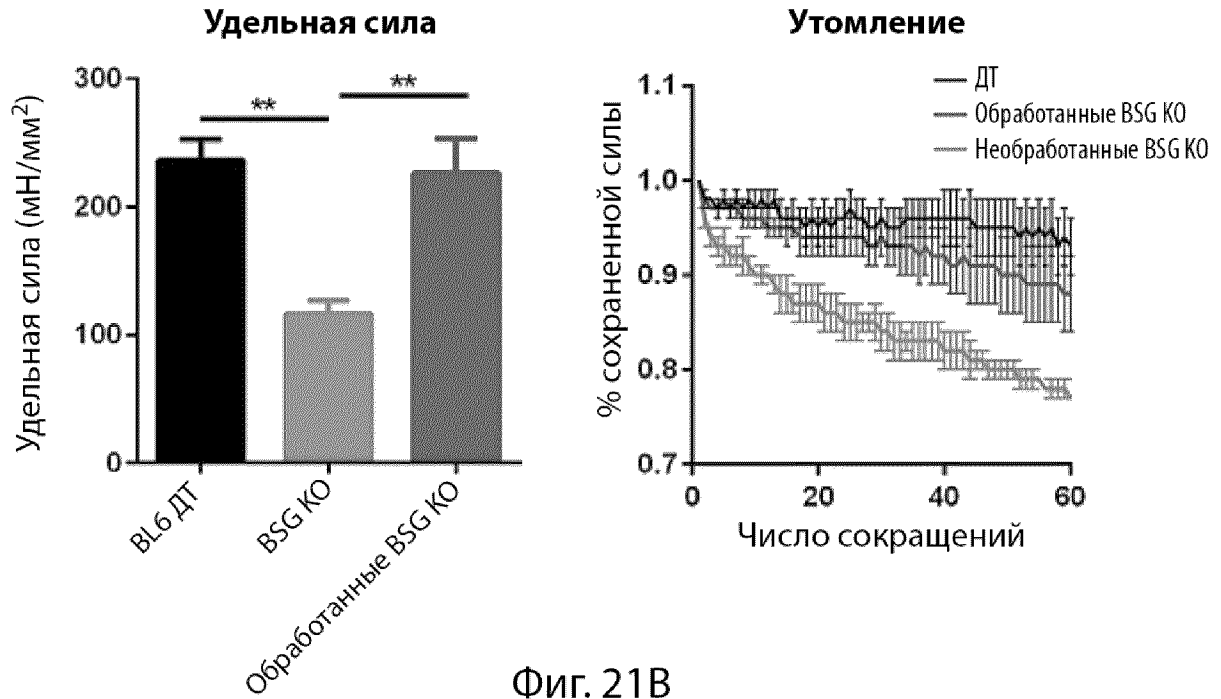
Фиг. 20С



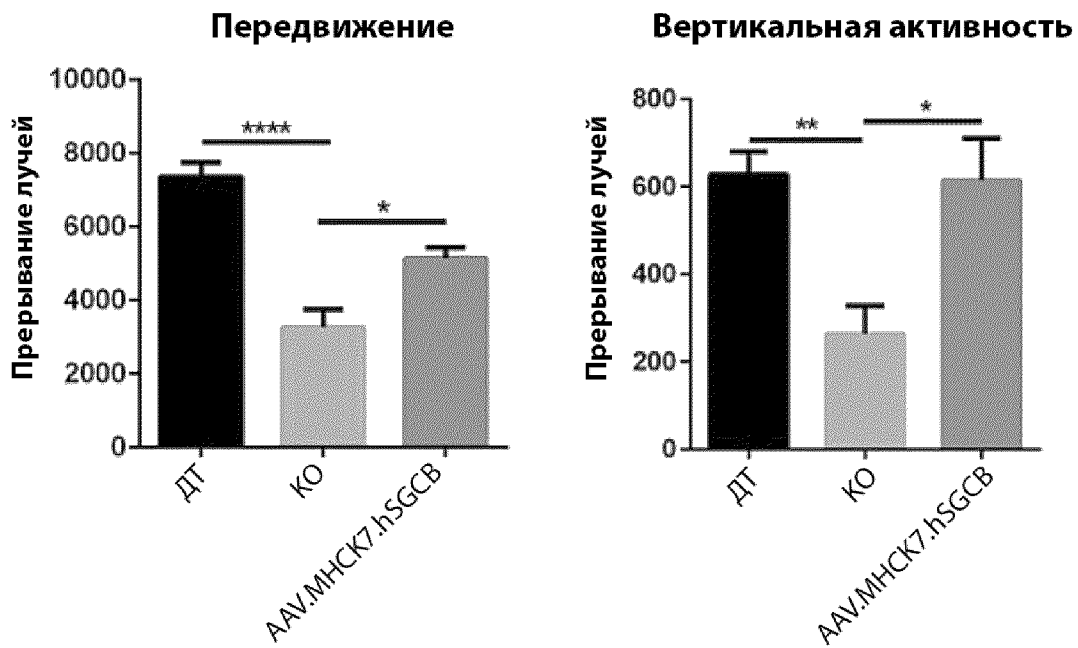
Фиг. 20D



Фиг. 21А

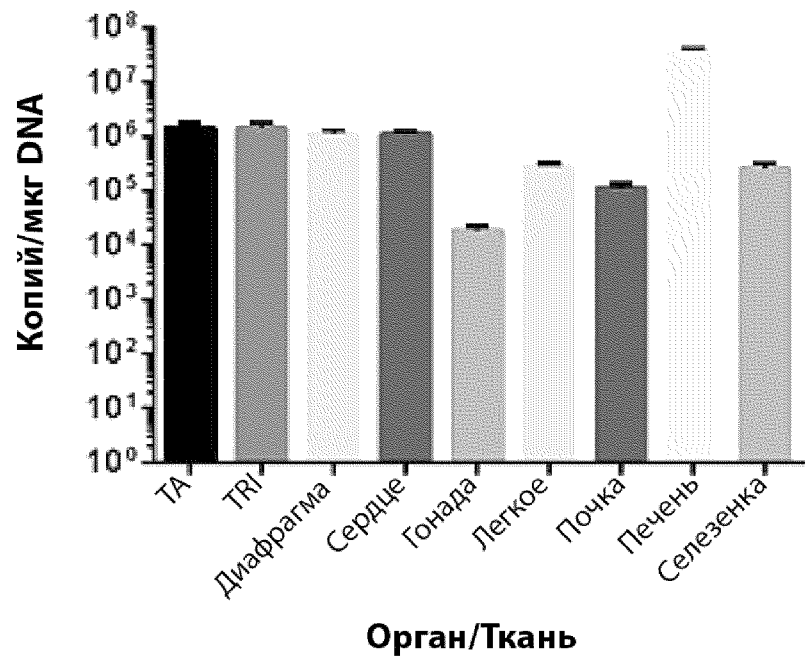


Фиг. 21В



Фиг. 22А

Биораспределение введенного внутривенно
AAV.MHCK7.hSGCB кПЦР



Фиг. 22В

Биораспределение экспрессии hSGCB

