

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202190054** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2021.04.21

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.06.17

---

(54) **ДОСТАВКА СПЕЦИФИЧНОГО ДЛЯ МЫШЦ МИКРОДИСТРОФИНА С ПОМОЩЬЮ ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ**

---

(31) 62/686,668; 62/740,402; 62/752,841;  
62/823,649; 62/860,220

(32) 2018.06.18; 2018.10.02; 2018.10.30;  
2019.03.25; 2019.06.11

(33) US

(86) PCT/US2019/037489

(87) WO 2019/245973 2019.12.26

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

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

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

---

(57) Изобретение относится к векторам для генной терапии, таким как векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), обеспечивающим экспрессию миниатюризованного гена микродистрофина человека, и к способу применения этих векторов для обеспечения экспрессии микродистрофина в скелетных мышцах, включая диафрагму и сердечную мышцу, и для защиты мышечных волокон от повреждения, увеличения мышечной силы и уменьшения выраженности и/или предупреждения фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией.

---

**A1**

**202190054**

**202190054**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566349EA/032

### ДОСТАВКА СПЕЦИФИЧНОГО ДЛЯ МЫШЦ МИКРОДИСТРОФИНА С ПОМОЩЬЮ ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/686668, поданной 18 июня 2018 года; предварительной заявке на патент США № 62/740402, поданной 2 октября 2018 года; предварительной заявке на патент США № 62/752841, поданной 30 октября 2018 года; предварительной заявке на патент США № 62/823649, поданной 25 марта 2019 года и предварительной заявке на патент США № 62/860220, поданной 11 июня 2018 года каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ ПРИЗНАКОВ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ НА МАТЕРИАЛ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Настоящая заявка содержит в качестве отдельной части настоящего изобретения перечень последовательностей в машиночитаемой форме, который включен посредством ссылки во всей своей полноте и определен следующим образом: название файла: 53169ARTW\_Seqlisting.txt; размер: 60103 байта, создан: 17 июня, 2019 года.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В настоящем изобретении предусмотрены векторы для генной терапии, такие как векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), обеспечивающие экспрессию миниатюризированного гена микродистрофина человека, и способ применения этих векторов для обеспечения экспрессии микродистрофина в скелетных мышцах, включая диафрагму и сердечную мышцу, и для защиты мышечных волокон от повреждения, увеличения мышечной силы и уменьшения выраженности и/или предупреждения фиброза у субъектов, страдающих мышечной дистрофией.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Важность мышечной массы и силы для повседневной деятельности, такой как движение и дыхание, а также для метаболизма во всем организме неоспорима. Варианты дефицита мышечной функции приводят к видам мышечной дистрофии (MD), которые характеризуются слабостью и истощением мышечной ткани и оказывают серьезное влияние на качество жизни. Наиболее хорошо изученные MD возникают в результате мутаций в генах, кодирующих представителей белкового комплекса, ассоциированного с дистрофином (DAPC). Эти MD возникают по причине хрупкости мембраны, ассоциированной с потерей обеспечиваемой DAPC связи между сарколеммой и цитоскелетом. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) - одно из наиболее тяжелых мышечных заболеваний, которым страдает 1 из 5000 новорожденных мальчиков.

[0005] DMD обусловлена мутациями в гене DMD, приводящими к снижению уровней mRNA и отсутствию дистрофина, сарколеммального белка с молекулярной массой 427 кДа, связанного с белковым комплексом, ассоциированным с дистрофином

(DAPC). (Hoffman et al., Cell 51(6):919-28, 1987). DAPC состоит из множества белков в сарколемме мышц, которые образуют структурную связь между внеклеточным матриксом (ECM) и цитоскелетом посредством дистрофина, - белка, связывающего актин, и альфа-дистрогликана, - белка, связывающего ламинин. Эти структурные связи стабилизируют мембрану мышечной клетки во время сокращения и защищают от повреждений, вызванных сокращением. При потере дистрофина хрупкость мембран приводит в результате к разрывам сарколеммы и притоку кальция, запуская активируемые кальцием протеазы и сегментарный некроз волокон (Straub et al., Curr Opin. Neurol. 10(2): 168-75, 1997). Этот неконтролируемый цикл мышечной дегенерации и регенерации в конечном итоге истощает популяцию мышечных стволовых клеток (Sacco et al., Cell, 2010. 143(7): p. 1059-71; Wallace et al., Annu Rev Physiol, 2009. 71: p. 37-57), что приводит к прогрессирующей слабости мышечной ткани, эндомиоциальному воспалению и фиброзу рубцеванию.

[0006] Без стабилизации мембраны с помощью дистрофина или микродистрофина DMD будет реализовывать неконтролируемые циклы повреждения ткани и восстановления, в конечном итоге замещая утраченные мышечные волокна фиброзной рубцовой тканью посредством пролиферации соединительной ткани. Фиброз характеризуется чрезмерным отложением белков ECM-матрикса, включая коллаген и эластин. Белки ECM в основном образуются из цитокинов, таких как TGF $\beta$ , которые высвобождаются активированными фибробластами в ответ на стресс и воспаление. Хотя первичным патологическим признаком DMD является дегенерация и некроз миофибрилл, фиброз как патологическое последствие характеризуется такими же результатами. Избыточное продуцирование фиброзной ткани ограничивает регенерацию мышц и способствует прогрессированию слабости мышечной ткани у пациентов с DMD. В одном исследовании наличие фиброза при биопсии мышц при DMD на начальной стадии коррелировало в значительной степени с неблагоприятным исходом в отношении моторики при 10-летнем наблюдении (Desguerre et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2009. 68(7): p. 762-7). Эти результаты указывают на то, что фиброз является основным фактором, способствующим возникновению мышечной дисфункции при DMD, и подчеркивают необходимость раннего вмешательства до манифестации фиброза.

[0007] Существует необходимость в средствах лечения, которое бы обеспечивало увеличение мышечной силы и защиту от повреждений мышц у пациентов, страдающих DMD.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение направлено на векторы для генной терапии, например AAV, обеспечивающие экспрессию гена микродистрофина в скелетных мышцах, включая диафрагму и сердечную мышцу, для защиты мышечных волокон от повреждений, увеличения мышечной силы и уменьшения выраженности и/или предупреждения фиброза.

[0009] В настоящем изобретении предусмотрены виды терапии и подходы для

увеличения мышечной силы и/или увеличения мышечной массы с применением векторов для генной терапии для доставки микродистрофина для устранения дефекта гена, наблюдаемого при DMD. В примере 2 описано клиническое испытание системной доставки гена при мышечной дистрофии Дюшенна, в данном исследовании субъекты получали  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin. В клиническом исследовании, описанном в примере 3, представлен новый основополагающий клинический протокол, который включает схему рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования. В начале исследования пациенты были рандомизированы и получали либо  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin, либо растворы Рингера с лактатом.

[0010] В настоящем изобретении предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3, 8 или 9. В настоящем изобретении также предусмотрен rAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9, или нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8, или нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, и частицы rAAV, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9, или нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8, или нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

[0011] В другом аспект настоящего изобретения предусмотрены композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3, 8 или 9, rAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9, или нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8, или нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, и частицы rAAV, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9, или нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8, или нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3. Любой из раскрытых в данном документе способов можно осуществить с помощью этих композиций.

[0012] В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения мышечной дистрофии у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающие стадию введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) rAAV.MHCK7.microdystrophin, где rAAV вводят системным путем введения в дозе, составляющей от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{15}$  г. в./кг. Мышечная дистрофия может представлять собой мышечную дистрофию Дюшенна или мышечную дистрофию Беккера.

[0013] Например, вводимая доза rAAV составляет от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $2,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{15}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно





3,75×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 1,75×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 3,5×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 1,75×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 3,25×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 1,75×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 3,0×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 1,75×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 2,75×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 1,75×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 2,5×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 1,75×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 2,25×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 1,75×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 2,0×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 2,0×10<sup>14</sup> г. в./кг до 1,0×10<sup>15</sup>, или от приблизительно 2,0×10<sup>14</sup> г. в./кг до 6,0×10<sup>14</sup>, или от приблизительно 2,0×10<sup>14</sup> г. в./кг до 5,0×10<sup>14</sup>, или от приблизительно 2,0×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 4,0×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 2,0×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 3,75×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 2,0×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 3,5×10<sup>14</sup> г. в./кг, или от приблизительно 2,0×10<sup>14</sup> г. в./кг до приблизительно 3,25×10<sup>14</sup> г. в./кг.

[0014] В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению включают системное введение гAAV, где системный путь введения представляет собой внутривенный путь, и вводимая доза гAAV составляет приблизительно 2,0×10<sup>14</sup> г. в./кг. В другом варианте осуществления способы по настоящему изобретению включают системное введение гAAV, где системный путь введения представляет собой внутривенный путь, и вводимая доза гAAV составляет приблизительно 5,0×10<sup>12</sup> г. в./кг или приблизительно 6,0×10<sup>12</sup> г. в./кг, или приблизительно 7,0×10<sup>12</sup> г. в./кг, или приблизительно 8,0×10<sup>12</sup> г. в./кг, или приблизительно 9,0×10<sup>12</sup> г. в./кг, или приблизительно 1,0×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 1,25×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 1,5×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 1,75×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 2,25×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 2,5×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 2,75×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 3,0×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 3,25×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 3,5×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 3,75×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 4,0×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 5,0×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 6,0×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 7,0×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 8,0×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 9,0×10<sup>13</sup> г. в./кг, или приблизительно 1,0×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 1,25×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 1,5×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 1,75×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 2,25×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 2,5×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 2,75×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 3,0×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 3,25×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 3,5×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 3,75×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 4,0×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 5,0×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 6,0×10<sup>14</sup> г. в./кг, или приблизительно 1×10<sup>15</sup> г. в./кг. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin или AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0015] В любом из способов по настоящему изобретению вводимая доза гAAV может составлять от приблизительно 5 мл/кг до приблизительно 15 мл/кг, или от приблизительно 8 мл/кг до приблизительно 12 мл/кг, или от 8 мл/кг до приблизительно 10 мл/кг, или от 5 мл/кг до приблизительно 10 мл/кг или от приблизительно 10 мл/кг до 12 мл/кг, или от приблизительно 10 мл/кг до 15 мл/кг, или от 10 мл/кг до приблизительно 20 мл/кг. В конкретном варианте осуществления дозу гAAV вводят при приблизительно 10 мл/кг. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin или AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0016] В любом из способов по настоящему изобретению дозу гAAV можно вводить путем инъекции, инфузии или имплантации. Например, дозу гAAV вводят путем инфузии в течение примерно одного часа. Кроме того, дозу гAAV вводят внутривенным путем в периферическую вену конечности, такую как периферическая вена руки или периферическая вена ноги. В качестве альтернативы инфузию можно вводить в течение примерно 30 минут или примерно 1,5 часа, или примерно 2 часов, или примерно 2,5 часа, или примерно 3 часов. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MHCK7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0017] гAAV, вводимый любым из способов по настоящему изобретению, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1, последовательность промотора MHCK7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7. Кроме того гAAV, вводимый любым из способов по настоящему изобретению, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и последовательность промотора MHCK7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7. Например, гAAV может содержать конструкцию AAVrh74.MHCK7.microdystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления

AAVrh74.MHCK7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ IDNO: 6.

[0018] В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0019] В любом из способов по настоящему изобретению вводимый rAAV относится к серотипу AAVrh7.4.

[0020] В некоторых вариантах осуществления в способах по настоящему изобретению предусмотрено лечение мышечной дистрофии Дюшенна или мышечной дистрофии Беккера. Иллюстративный вариант осуществления представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна или мышечной дистрофии Беккера у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий стадию введения дозы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) rAAV.MHCK7.microdystrophin, где путь введения представляет собой внутривенную инфузию, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг в течение примерно одного часа, и при этом rAAV-вектор содержит конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MHCK7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9 или состоит из нуклеотидов 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидов 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидов 56-5022 из SEQ IDNO: 6. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0021] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен rAAV, содержащий нуклеотидную последовательность специфичного для мышц контролирующего элемента и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок микродистрофина. Например, нуклеотидная последовательность кодирует функциональный белок микродистрофин, где нуклеотид характеризуется, например, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, или 89%, более преимущественно по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, или 94% и еще более преимущественно по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, при этом белок сохраняет активность микродистрофина. Белок микродистрофин обеспечивает стабильность мышечной мембраны во время сокращения мышц, например микродистрофин действует в качестве амортизатора во время сокращения мышц. В одном

варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MHCK7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9 или состоит из нуклеотидов 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидов 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидов 56-5022 из SEQ IDNO: 6. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0022] В настоящем изобретении также предусмотрен гAAV, где нуклеотидная последовательность включает нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1 или последовательностями, комплементарными ей, и кодирует функциональный белок микродистрофин.

[0023] В одном варианте осуществления гAAV представляет собой нереплицирующийся рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV), называемый AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin, под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8, или нуклеотиды 56-5022 из SEQ IDNO: 6. Этот геном вектора содержит минимальные элементы, необходимые для экспрессии гена, в том числе инвертированные концевые повторы (ITR) AAV2, микродистрофин, интрон SV40 (SD/SA) и синтетический сигнал полиаденилирования (поли-A), все под контролем промотора/энхансера MHCK7. Схема генома вектора и кассеты экспрессии показана на фигуре 1. Серотип AAVrh74 можно применять для достижения эффективного переноса гена в скелетных и сердечной мышцах после внутривенного введения.

[0024] Термин «жесткие» используется для обозначения условий, которые обычно понимаются в области техники как жесткие. Жесткость гибридизации в основном определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих средств, таких как формамид. Примерами жестких условий для гибридизации и промывки являются 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия при 65-68°C или 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия и 50% формамид при 42°C. См. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-е изд., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, Нью-Йорк 1989). Также можно применять более жесткие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокая концентрация формамида или другого денатурирующего средства), однако это повлияет на скорость гибридизации. В случаях, когда речь идет о гибридизации дезоксиолигонуклеотидов, дополнительные примеры жестких условий гибридизации включают промывка в 6x SSC 0,05% пиррофосфате натрия при 37°C (для олигонуклеотидов из 14 оснований), 48°C (для олигонуклеотидов из 17 оснований), 55°C (для олигонуклеотидов из 20 оснований) и 60°C (для олигонуклеотидов из 23 оснований).

[0025] Другие средства можно включать в буферы для гибридизации и промывки с целью снижения неспецифической и/или фоновой гибридизации. Примерами являются

0,1% бычий сывороточный альбумин, 0,1% поливинилпирролидон, 0,1% пиродифосфат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, NaDodSO<sub>4</sub>, (SDS), фиколл, раствор Денхардта, обработанная ультразвуком ДНК из молока лососевых (или другая некоплементарная ДНК) и сульфат декстрана, хотя можно применять и другие подходящие средства. Концентрацию и типы этих добавок можно изменять без существенного влияния на жесткость условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно осуществляют при pH 6,8-7,4, однако при обычных условиях ионной силы скорость гибридизации почти не зависит от pH. См. Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, глава 4, IRL Press Limited (Оксфорд, Англия). Условия гибридизации могут быть скорректированы специалистом в данной области техники для согласования этих переменных и обеспечения возможности образования гибридов для ДНК с различной степенью родства последовательностей.

[0026] Термин «специфичный для мышц контролирующий элемент» относится к нуклеотидной последовательности, которая регулирует экспрессию кодирующей последовательности, специфичной для экспрессии в мышечной ткани. Данные контролирующие элементы включают энхансеры и промоторы. В настоящем изобретении предусмотрены конструкции, содержащие специфичные для мышц контролирующие элементы - промотор MCKN7, промотор MCK и энхансер MCK.

[0027] Термин «функционально связанный» относится к расположению нуклеотидной последовательности регуляторного элемента, например нуклеотидной последовательности промотора, обеспечивающему экспрессию указанной нуклеотидной последовательности с помощью указанного регуляторного элемента.

[0028] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен гAAV, где специфичный для мышц контролирующий элемент представляет собой элемент гена скелетного актина человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфический энхансерный связывающий фактор (MEF), мышечную креатинкиназу (MCK), усеченную MCK (tMCK), тяжелую цепь миозина (MHC), гибрид энхансера гена тяжелой цепи а-миозина/энхансера-промотора MCK (MHCK7), C5-12, энхансерный элемент гена креатинкиназы мышцы, контролирующие элементы, полученные из гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленно сокращающихся волокон сердечной мышцы и гена тропонина I медленно сокращающихся волокон, ядерные факторы, индуцируемые гипоксией, элементы, индуцируемые стероидами, а также глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

[0029] Например, специфичным для мышц контролирующим элементом является нуклеотидная последовательность промотора MHCK7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7, или специфичным для мышц контролирующим элементом является нуклеотидная последовательность MCK под SEQ ID NO: 4. Кроме того, в любом из гAAV-векторов по настоящему изобретению нуклеотидная последовательность специфичного для мышц контролирующего элемента, например нуклеотидная последовательность MHCK7 или MCK, функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок

микродистрофин. Например, нуклеотидная последовательность промотора МНСК7 (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7) функционально связана с кодирующей последовательностью микродистрофина человека (SEQ ID NO: 1), как показано в конструкции, представленной на фигуре 1, или фигуре 2 (SEQ ID NO: 3), или фигуре 13 (SEQ ID NO: 9). В другом примере промотор МСК (SEQ ID NO: 4) функционально связан с кодирующей последовательностью микродистрофина человека (SEQ ID NO: 1), как показано в конструкции, представленной на фигуре 5 или фигуре 6 (SEQ ID NO: 5). В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен гAAV-вектор, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 7. В настоящем изобретении также предусмотрен гAAV-вектор, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4.

[0030] В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена конструкция гAAV, содержащаяся в плазмиде, содержащей нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 8. Например, вектор AAVrh74.МНСК7.microdystrophin содержит нуклеотидную последовательность, ограниченную ITR и включающую их, под SEQ ID NO: 3 и показан на фигуре 2. гAAV-вектор содержит 5'-ITR, промотор МНСК7, химерную интронную последовательность, кодирующую последовательность гена микродистрофина человека, поли-А и 3'-ITR. В одном варианте осуществления вектор содержит нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO:3. Плазида, представленная под SEQ ID NO: 3, дополнительно содержит ген устойчивости к ампициллину и остов плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322.

[0031] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен гAAV, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 9. Например, конструкция, представляющая собой вектор AAVrh74.МНСК7.microdystrophin, содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 9 и показана на фигуре 13. Данная конструкция, представляющая собой гAAV-вектор, содержит промотор МНСК7, химерную интронную последовательность, кодирующую последовательность гена микродистрофина человека и поли-А. В одном варианте осуществления конструкция, представляющая собой гAAV-вектор, дополнительно содержит ITR, расположенный в 5'-направлении от промотора, и ITR, расположенный в 3'-направлении от поли-А. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.

[0032] В другом аспекте вектор AAVrh74.МНСК7.microdystrophin содержит нуклеотидную последовательность, ограниченную ITR и включающую их, под SEQ ID NO: 8 и показан на фигуре 15. гAAV-вектор содержит 5'-ITR, промотор МНСК7, химерную интронную последовательность, кодирующую последовательность гена микродистрофина человека, поли-А и 3'-ITR. В одном варианте осуществления вектор содержит нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO:9. Плазида, представленная под SEQ ID NO:3, дополнительно содержит ген устойчивости к канамицину и остов плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322.

[0033] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена плаزمид, содержащая конструкцию, представляющую собой вектор AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления плазмид содержит 5'-ITR, промотор MHCK7, химерную интронную последовательность, кодирующую последовательность гена микродистрофина человека, поли-А и 3'-ITR. В одном варианте осуществления плазмид содержит ген устойчивости к канамицину и необязательно содержит остов плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322. В конкретном варианте осуществления плазмид представлена под SEQ ID NO:8 и показана на фигурах 14 и 15.

[0034] В настоящем изобретении предусмотрен вектор, представляющий собой рекомбинантный AAV, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора MHCK7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:7. Данный гAAV-вектор представляет собой AAV серотипа AAVrh.74.

[0035] В настоящем изобретении также предусмотрен гAAV, включающий конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью, ограниченной ITR и включающей их, под SEQ ID NO: 3, нуклеотидной последовательностью, ограниченной ITR и включающей их, под SEQ ID NO: 8 или нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 9. Данный гAAV-вектор представляет собой AAV серотипа AAVrh.74.

[0036] гAAV-векторы по настоящему изобретению могут относиться к любому серотипу AAV, такому как серотип AAVrh.74, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 или AAV13.

[0037] В настоящем изобретении также предусмотрены фармацевтические композиции (или иногда называемые в данном документе просто «композициями»), содержащие любой из гAAV-векторов по настоящему изобретению.

[0038] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы получения частицы гAAV-вектора, включающие культивирование клетки, которая была трансфицирована любым гAAV-вектором по настоящему изобретению, и выделение частиц гAAV из супернатанта трансфицированных клеток. В настоящем изобретении также предусмотрены вирусные частицы, содержащие любой из векторов на основе рекомбинантного AAV по настоящему изобретению.

[0039] В любом из способов лечения мышечной дистрофии уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке субъекта увеличивается после введения гAAV. Уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке определяют путем измерения с помощью вестерн-блота уровня белка микродистрофина в биоптате мышц до и после введения гAAV. В частности уровень белка микродистрофина увеличивался на значение, составляющее от по меньшей мере приблизительно 70% до по меньшей мере приблизительно 80%, или от по меньшей мере приблизительно 70% до по меньшей мере приблизительно 90%, или от по меньшей мере приблизительно 80% до по меньшей мере



приблизительно 90%, после введения гAAV по сравнению с уровнем микродистрофина до введения гAAV. Например, уровень белка микродистрофина увеличивался на по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 71%, или по меньшей мере приблизительно 72%, или по меньшей мере приблизительно 73%, или по меньшей мере приблизительно 74%, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 76%, или по меньшей мере приблизительно 77%, или по меньшей мере приблизительно 78%, или по меньшей мере приблизительно 79%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 81%, или по меньшей мере приблизительно 82%, или по меньшей мере приблизительно 83%, или по меньшей мере приблизительно 84%, или по меньшей мере приблизительно 85% после введения гAAV по сравнению с уровнем микродистрофина до введения гAAV.

[0040] Кроме того, уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV. Уровень белка микродистрофина увеличивался на значение, составляющее от по меньшей мере приблизительно 70% до по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 70% до по меньшей мере приблизительно 90%, или по меньшей мере приблизительно 80% до по меньшей мере приблизительно 90%, после введения гAAV по сравнению с уровнем микродистрофина до введения гAAV. Например, уровень белка микродистрофина увеличивался на по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 71%, или по меньшей мере приблизительно 72%, или по меньшей мере приблизительно 73%, или по меньшей мере приблизительно 74%, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 76%, или по меньшей мере приблизительно 77%, или по меньшей мере приблизительно 78%, или по меньшей мере приблизительно 79%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 81%, или по меньшей мере приблизительно 82%, или по меньшей мере приблизительно 83%, или по меньшей мере приблизительно 84%, или по меньшей мере приблизительно 85% после введения гAAV по сравнению с уровнем микродистрофина до введения гAAV.

[0041] В любом из способов лечения мышечной дистрофии уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV. Например, уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на значение, составляющее от приблизительно 65% до приблизительно 90%, или от приблизительно 65% до приблизительно 95%, или от приблизительно 75% до приблизительно 90%, или от приблизительно 80% до приблизительно 90%, или от приблизительно 85% до приблизительно 95%, или от приблизительно 87% до приблизительно 95%, или от приблизительно 87% до приблизительно 90%, через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV. В частности, в любом из способов лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта

снижается на приблизительно 87% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV, или в любом из способов лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 72% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV, или в любом из способов лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 73% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV, или в любом из способов лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 78% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV, или в любом из способов лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 95% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV. В любом из способов лечения мышечной дистрофии количество волокон, положительных по микродистрофину, в мышечной ткани субъекта увеличивается после введения гAAV по сравнению с количеством волокон, положительных по микродистрофину, до введения гAAV. Например, количество волокон, положительных по микродистрофину, определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

[0042] В любом из способов лечения мышечной дистрофии введение гAAV обеспечивает повышение уровня экспрессии белков DAPC, таких как альфа-саркогликан или бета-саркогликан. Например, уровень альфа-саркогликана у субъекта после введения гAAV увеличивается по сравнению с уровнем альфа-саркогликана до введения гAAV. Кроме того, уровень бета-саркогликана у субъекта увеличивался после введения гAAV по сравнению с уровнем бета-саркогликана до введения гAAV. Уровень альфа-саркогликана или бета-саркогликана определяют путем измерения уровня белка альфа-саркогликана или бета-саркогликана с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

[0043] В любом из способов лечения мышечной дистрофии после введения гAAV прогрессирование заболевания у субъекта замедляется, что измеряют с помощью любого из следующего: теста с шестиминутной ходьбой, времени подъема, подъема на 4 ступеньки, подъема и спуска на 4 ступеньки, системы амбулаторной оценки North Star (NSAA), теста на время прохождения 10 метров, теста на время прохождения 100 метров, ручной динамометрии (ННД), теста со вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени и/или балла по шкале подтеста оценки крупной моторики (Бейли-III).

[0044] Например, в любом из способов у субъекта наблюдается улучшение балла NSAA на по меньшей мере 6 пунктов через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению с баллом NSAA до введения гAAV. Кроме того, в любом из способов у субъекта наблюдается улучшение времени подъема на по меньшей мере приблизительно

0,8 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению со временем подъема до введения гAAV. Кроме того, в любом из способов у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время подъема на 4 ступеньки на по меньшей мере приблизительно 1,2 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению с тестом на время подъема на 4 ступеньки до введения гAAV. Кроме того, в любом из способов у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время прохождения 100 м на по меньшей мере приблизительно 7 секунд через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению с тестом на время прохождения 100 м до введения гAAV.

[0045] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы обеспечения экспрессии гена микродистрофина в клетке пациента, включающие введение пациенту конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ ID NO: 6. Например, уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке пациента определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения конструкции гAAV.MHCK7.micro-dystrophin. Кроме того, уровень экспрессии гена микродистрофина измеряют у пациента путем определения кратности количества геномов вектора на ядро, где 1 геном вектора на ядро соответствует экспрессии микродистрофина на уровне приблизительно 50%, и более 1 копии на ядро соответствует уровню экспрессии микродистрофина. Например, в клетках имеется 1,2 копии вектора на ядро, или 1,3 копии вектора на ядро, или 1,4 копии вектора на ядро, или 1,5 копии вектора на ядро, или 1,6 копии вектора на ядро, или 1,7 копии вектора на ядро, или 1,8 копии вектора на ядро, или 1,9 копии вектора на ядро.

[0046] В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы уменьшения уровней СК в сыворотке крови у пациента, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение пациенту конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. Например, уровень СК в сыворотке крови у пациента снижается на значение, составляющее от по меньшей мере приблизительно 65% до приблизительно 90%, или от приблизительно 65% до приблизительно 95%, или от приблизительно 75% до приблизительно 90%, или от приблизительно 80% до приблизительно 90%, или от приблизительно 85% до приблизительно 95%, или от приблизительно 87% до приблизительно 95%, или от приблизительно 87% до приблизительно 90%, через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV. В частности, уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 87% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV, или в любом из способов лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке

крови у субъекта снижается на приблизительно 72% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV, или в любом из способов лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению, уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 73% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV, или в любом из способов лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 78% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV, или в любом из способов лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 95% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV.

[0047] В настоящем изобретении также предусмотрены способы увеличения количества волокон, положительных по микродистрофину, в мышечной ткани пациента, включающие введение пациенту конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. Например, количество волокон, положительных по микродистрофину, определяют путем измерения уровня белка дистрофина с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV. Кроме того, уровень экспрессии гена микродистрофина измеряют у пациента путем определения кратности количества геномов вектора на ядро, где 1 геном вектора на ядро соответствует экспрессии микродистрофина на уровне приблизительно 50%, и более 1 копии на ядро соответствует уровню экспрессии микродистрофина. Например, в клетках имеется 1,2 копии вектора на ядро, или 1,3 копии вектора на ядро, или 1,4 копии вектора на ядро, или 1,5 копии вектора на ядро, или 1,6 копии вектора на ядро, или 1,7 копии вектора на ядро, или 1,8 копии вектора на ядро, или 1,9 копии вектора на ядро.

[0048] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы увеличения уровня экспрессии альфа-саркогликана у пациента, нуждающегося в этом, включающие введение пациенту конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. Например, уровень альфа-саркогликана определяют путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

[0049] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены способы увеличения уровня экспрессии бета-саркогликана у пациента, нуждающегося в этом, включающие введение пациенту конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. Например, уровень бета-саркогликана определяют путем измерения уровня белка бета-

саркогликана с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

[0050] В настоящем изобретении также предусмотрены способы лечения пациента с мышечной дистрофией Дюшенна, мышечной дистрофией Беккера, включающие введение пациенту конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6, таким образом, чтобы прогрессирование заболевания у пациента замедлялось, что измеряют с помощью любого из следующего: теста с шестиминутной ходьбой, времени подъема, подъема на 4 ступеньки, подъема и спуска на 4 ступеньки, системы амбулаторной оценки North Star (NSAA), теста на время прохождения 10 метров, теста на время прохождения 100 метров, ручной динамометрии (ННД), теста с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени и/или балла по шкале подтеста оценки крупной моторики (Бейли-III).

[0051] Например, в любом из способов у субъекта наблюдается улучшение балла NSAA на по меньшей мере 6 пунктов через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению с баллом NSAA до введения гAAV. Кроме того, в любом из способов у субъекта наблюдается улучшение времени подъема на по меньшей мере приблизительно 0,8 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению со временем подъема до введения гAAV. Кроме того, в любом из способов у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время подъема на 4 ступеньки на по меньшей мере приблизительно 1,2 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению с тестом на время подъема на 4 ступеньки до введения гAAV. Кроме того, в любом из способов у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время прохождения 100 м на по меньшей мере приблизительно 7 секунд через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению с тестом на время прохождения 100 м до введения гAAV.

[0052] «Фиброз» относится к избыточному или нерегулируемому отложению внеклеточного матрикса (ECM) и аномальным процессам восстановления в тканях после повреждения, включая скелетную мышцу, сердечную мышцу, печень, легкие, почки и поджелудочную железу. Компоненты ECM, которые откладываются, включают фибронектин и коллаген, например коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3.

[0053] В настоящем изобретении также предусмотрены способы уменьшения выраженности или предупреждения фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающие введение терапевтически эффективного количества гAAV, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора MHCK7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7; или гAAV-вектора, содержащего конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления

AAVrh74.МНСК7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.МНСК7.microdystrophin из нуклеотидов 55-5021 из SEQ ID NO: 3. В другом варианте осуществления AAVrh74.МНСК7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.МНСК7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9. В другом варианте осуществления AAVrh74.МНСК7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.МНСК7.microdystrophin из нуклеотидов 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидов 56-5066 из SEQ ID NO: 6. В дополнительном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.МСК.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.МСК.microdystrophin представляет собой AAVrh74.МСК.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0054] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения фиброза у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение терапевтически эффективного количества нуклеотидной последовательности, кодирующей микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и нуклеотидной последовательности промотора МНСК7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:7; или гAAV-вектора, содержащего конструкцию AAV74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. Например, любой из гAAV по настоящему изобретению можно вводить субъектам, страдающим мышечной дистрофией, для предупреждения фиброза, например гAAV по настоящему изобретению, обеспечивающий экспрессию белка микродистрофина человека, вводят до того, как у субъекта наблюдается фиброз. Кроме того, гAAV по настоящему изобретению, обеспечивающий экспрессию гена микродистрофина человека, можно вводить субъекту, для которого существует риск развития фиброза, например, который страдает мышечной дистрофией или у которого она диагностирована, например DMD. гAAV по настоящему изобретению можно вводить субъекту, страдающему мышечной дистрофией, с целью предупреждения нового этапа развития фиброза у таких субъектов.

[0055] В настоящем изобретении рассматривается введение гAAV до того, как у субъекта наблюдается фиброз. Кроме того, гAAV можно вводить субъекту, для которого существует риск развития фиброза, например, который страдает мышечной дистрофией или у которого она диагностирована, например DMD. гAAV можно вводить субъекту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже развился фиброз, для предупреждения нового этапа развития фиброза у таких субъектов.

[0056] В настоящем изобретении также предусмотрены способы увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающие введение терапевтически эффективного количества нуклеотидной последовательности, кодирующей микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и нуклеотидной последовательности промотора МНСК7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7; или гAAV, включающего конструкцию AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID

NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6.

[0057] В настоящем изобретении рассматривается введение гAAV-векторов субъектам, у которых диагностировали DMD, до того, как у субъекта наблюдается фиброз, или до снижения мышечной силы, или до снижения мышечной массы.

[0058] В настоящем изобретении также рассматривается введение нуклеотидной последовательности, кодирующей микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и нуклеотидной последовательности промотора МНСК7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:7; или гAAV, включающего конструкцию AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6, субъекту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже развился фиброз, с целью предупреждения нового этапа развития фиброза у таких субъектов или для снижения выраженности фиброза у таких субъектов. В настоящем изобретении также предусмотрено введение нуклеотидной последовательности, кодирующей микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и нуклеотидной последовательности промотора МНСК7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:7; или гAAV-вектора, содержащего конструкцию AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6, субъекту, страдающему мышечной дистрофией, у которого уже снизилась мышечная сила или снизилась мышечная масса, с целью защиты мышцы от дополнительного повреждения.

[0059] В любом из способов по настоящему изобретению субъект может страдать мышечной дистрофией, такой как DMD, или любой другой дистрофин-ассоциированной мышечной дистрофией.

[0060] В других вариантах осуществления любого из способов по настоящему изобретению, описанных в данном документе, уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV на уровень в процентах, выбранный из группы, состоящей из следующих:

- a) по меньшей мере 78% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- b) по меньшей мере 46, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 или 85% через 270 дней после введения;
- c) по меньшей мере 72, 73, 74 или 95% через 180 дней после введения;
- d) по меньшей мере 87, 88, 93 или 95% через 90 дней после введения;
- e) по меньшей мере 70% через 270 дней после введения;
- f) от 70 до 95% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- g) по меньшей мере 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения; и
- h) по меньшей мере 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90,

180 или 270 дней после введения.

[0061] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции для лечения мышечной дистрофии у субъекта-человека, нуждающегося в этом, где композиция содержит дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) rAAV.МНСК7.microdystrophin, где композиция составлена для системного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $1 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $4 \times 10^{14}$  г. в./кг. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.МНСК7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.МНСК7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.МНСК7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.МСК.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.МСК.microdystrophin представляет собой AAVrh74.МСК.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0062] Например, композиция по настоящему изобретению содержит дозу rAAV, составляющую от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $2,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{15}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $3,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $5,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $6,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{15}$  г. в./кг, или от  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $3,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $5,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $6,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{15}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $6,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $5,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $4,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{15}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до





NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ IDNO: 6. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0063] В одном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению составлены для внутривенного введения и содержат дозу гAAV, составляющую приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг. В другом варианте осуществления композиции по настоящему изобретению составлены для внутривенного введения и содержат дозу гAAV, составляющую приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг, или приблизительно  $6,0 \times 10^{12}$  г. в./кг, или приблизительно  $7,0 \times 10^{12}$  г. в./кг, или приблизительно  $8,0 \times 10^{12}$  г. в./кг, или приблизительно  $9,0 \times 10^{12}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,25 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,75 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,25 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,5 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,75 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,25 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,5 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,75 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $4,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $6,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $7,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $8,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $9,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,25 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,25 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,5 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,75 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,25 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,5 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,75 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $4,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $5,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $6,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $1 \times 10^{15}$ . В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MHCK7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ IDNO: 6. В другом варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0064] В любой из композиций по настоящему изобретению дозу гAAV доставляют из расчета от приблизительно 5 мл/кг до приблизительно 15 мл/кг, или от приблизительно 8 мл/кг до приблизительно 12 мл/кг, или от 8 мл/кг до приблизительно 10 мл/кг, или от 5 мл/кг до приблизительно 10 мл/кг, или от приблизительно 10 мл/кг до 12 мл/кг, или от приблизительно 10 мл/кг до 15 мл/кг, или от 10 мл/кг до приблизительно 20 мл/кг. В конкретном варианте осуществления композиция содержит дозу гAAV, которую доставляют из расчета приблизительно 10 мл/кг. В одном варианте осуществления гAAV

представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MHCK7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ IDNO: 6. В другом варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0065] Композиции по настоящему изобретению составлены для введения путем инъекции, инфузии или имплантации. Например, композиции составлены для введения путем инфузии в течение примерно одного часа. Кроме того, композиции по настоящему изобретению составлены для внутривенного введения в периферическую вену конечности, такую как периферическая вена руки или периферическая вена ноги. В качестве альтернативы инфузию можно вводить в течение примерно 30 минут или примерно 1,5 часа, или примерно 2 часов, или примерно 2,5 часа, или примерно 3 часов.

[0066] Любые из композиций по настоящему изобретению содержат rAAV, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и последовательность промотора MHCK7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:7, или rAAV-вектор, содержащий конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6.

[0067] В частности, композиции по настоящему изобретению предназначены для лечения мышечной дистрофии Дюшенна или мышечной дистрофии Беккера. Например, в настоящем изобретении предусмотрены композиции для лечения мышечной дистрофии Дюшенна или мышечной дистрофии Беккера у субъекта-человека, нуждающегося в этом, где композиция содержит дозу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) rAAV.MHCK7.microdystrophin, где композиция составлена для введения путем внутривенной инфузии в течение примерно одного часа, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг, и где rAAV включает конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6.

[0068] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая rAAV для уменьшения выраженности фиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая rAAV-векторы для предупреждения фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

[0069] В настоящем изобретении также предусмотрены композиции, содержащие rAAV для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией. В дополнительном варианте осуществления в настоящем

изобретении предусмотрены композиции, содержащие любой из rAAV по настоящему изобретению для лечения мышечной дистрофии.

[0070] В других вариантах осуществления любых из композиций по настоящему изобретению после введения указанной композиции субъекту-человеку, нуждающемуся в лечении мышечной дистрофии, уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции на уровень в процентах, выбранный из группы, состоящей из следующих:

- a) по меньшей мере 78% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- b) по меньшей мере 46, 55, 70 или 85% через 270 дней после введения;
- c) по меньшей мере 72, 73, 74 или 95% через 180 дней после введения;
- d) по меньшей мере 87, 99, 93 или 95% через 90 дней после введения;
- e) по меньшей мере 70% через 270 дней после введения;
- f) от 70 до 95% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- g) по меньшей мере 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения; и
- h) 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения.

[0071] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение дозы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) rAAV.МНСК7.microdystrophin для получения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии у субъекта-человека, нуждающегося в этом, где лекарственный препарат составлен для системного пути введения, и доза rAAV составляет от приблизительно  $1 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $4 \times 10^{14}$  г. в./кг. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.МНСК7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.МНСК7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.МНСК7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.МСК7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.МСК7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.МСК7.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0072] Например, лекарственный препарат содержит дозу rAAV, составляющую от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $2,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{15}$  г. в./кг, или от  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг до



$3,75 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $3,5 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $3,25 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $3,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $2,75 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $2,5 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $2,25 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до  $1,0 \times 10^{15}$ , или от приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до  $6,0 \times 10^{14}$ , или от приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до  $5,0 \times 10^{14}$ , или от приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $4,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $3,75 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $3,5 \times 10^{14}$  г. в./кг, или от приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $3,25 \times 10^{14}$  г. в./кг. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MHCK7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления гAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0073] В одном варианте осуществления лекарственные препараты по настоящему изобретению составлены для системного введения дозы гAAV, где системный путь введения представляет собой внутривенный путь введения, и вводимая доза гAAV составляет приблизительно  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг. В другом варианте осуществления лекарственный препарат по настоящему изобретению составлен для системного введения дозы гAAV, где системный путь введения представляет собой внутривенный путь введения, и доза гAAV составляет приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  г. в./кг или приблизительно  $6,0 \times 10^{12}$  г. в./кг, или приблизительно  $7,0 \times 10^{12}$  г. в./кг, или приблизительно  $8,0 \times 10^{12}$  г. в./кг, или приблизительно  $9,0 \times 10^{12}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,25 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,75 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,25 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,5 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,75 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,25 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,5 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,75 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $4,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $5,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $6,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $7,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $8,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $9,0 \times 10^{13}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,25 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,5 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,25 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,5 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $2,75 \times 10^{14}$  г. в./кг, или

приблизительно  $3,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,25 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,5 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $3,75 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $4,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $5,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $6,0 \times 10^{14}$  г. в./кг, или приблизительно  $1 \times 10^{15}$  г. в./кг. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MHCK7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0074] В любом из путей применения по настоящему изобретению лекарственный препарат содержит дозу rAAV из расчета от приблизительно 5 мл/кг до приблизительно 15 мл/кг, или от приблизительно 8 мл/кг до приблизительно 12 мл/кг, или от 8 мл/кг до приблизительно 10 мл/кг, или от 5 мл/кг до приблизительно 10 мл/кг или от приблизительно 10 мл/кг до 12 мл/кг, или от приблизительно 10 мл/кг до 15 мл/кг, или от 10 мл/кг до приблизительно 20 мл/кг. В конкретном варианте осуществления доза rAAV составляет приблизительно 10 мл/кг. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MHCK7.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MHCK7.microdystrophin под SEQ ID NO: 9, нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотиды 56-5022 из SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления rAAV представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin. В одном варианте осуществления AAVrh74.MCK.microdystrophin представляет собой AAVrh74.MCK.microdystrophin из нуклеотидов 56-4820 из SEQ ID NO: 5.

[0075] В любом из путей применения по настоящему изобретению лекарственный препарат составлен для введения путем инъекции, инфузии или имплантации. Например, лекарственный препарат составлен для введения путем инфузии в течение примерно одного часа. Кроме того, лекарственный препарат составлен для внутривенного введения в периферическую вену конечности, такую как периферическая вена руки или периферическая вена ноги. В качестве альтернативы инфузию можно вводить в течение примерно 30 минут или примерно 1,5 часа, или примерно 2 часов, или примерно 2,5 часа, или примерно 3 часов.

[0076] В любом из путей применения по настоящему изобретению лекарственный препарат содержит rAAV, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и последовательность промотора MHCK7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7, или конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ ID NO: 6.

[0077] Конкретное применение настоящего изобретения предназначено для получения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии Дюшенна или мышечной дистрофии Беккера. Например, в настоящем изобретении предусмотрено применение дозы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) rAAV.МНСК7.microdystrophin для получения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии Дюшенна или мышечной дистрофии Беккера у человека-субъекта, нуждающегося в этом, где лекарственный препарат составлен для введения путем внутривенной инфузии в течение примерно одного часа, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг, и при этом rAAV включает конструкцию AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ ID NO: 6.

[0078] В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение rAAV для получения лекарственного препарата для уменьшения выраженности фиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Например, субъект, нуждающийся в этом, может страдать мышечной дистрофией, такой как DMD, или любой другой формой мышечной дистрофией, ассоциированной с дистрофином.

[0079] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение rAAV для получения лекарственного препарата для предупреждения фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

[0080] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрено применение rAAV для получения лекарственного препарата для увеличения мышечной силы и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

[0081] В настоящем изобретении также предусмотрено применение rAAV для получения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии.

[0082] В настоящем изобретении предусмотрено применение rAAV-вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, под SEQ ID NO: 1 и нуклеотидную последовательность промотора МНСК7 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7, для получения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии, или rAAV-вектора, содержащего конструкцию AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ ID NO: 6, для лечения мышечной дистрофии.

[0083] В других вариантах осуществления любого из путей применения настоящего изобретения, уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается после введения rAAV субъекту по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения rAAV на уровень в процентах, выбранный из группы, состоящей из следующих:

- a) по меньшей мере 78% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- b) по меньшей мере 46, 55, 70 или 95% через 270 дней после введения;
- c) по меньшей мере 72, 73, 74 или 95% через 180 дней после введения;



- d) по меньшей мере 87, 88, 93 или 95% через 90 дней после введения;
- e) по меньшей мере 70% через 270 дней после введения;
- f) от 70 до 95% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- g) по меньшей мере 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения; и
- h) 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения.

[0084] В любой из композиций для лечения мышечной дистрофии или любом пути применения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке субъекта увеличивался после введения композиции или лекарственного препарата. Уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью вестерн-блота в биоптатах мышц до и после введения композиции или лекарственного препарата. В частности, уровень белка микродистрофина увеличивается на значение, составляющее от по меньшей мере приблизительно 70% до по меньшей мере приблизительно 80%, или от по меньшей мере приблизительно 70% до по меньшей мере приблизительно 90%, или от по меньшей мере приблизительно 80% до по меньшей мере приблизительно 90%, после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем микродистрофина до введения композиции или лекарственного препарата. Например, уровень белка микродистрофина увеличивается на по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 71%, или по меньшей мере приблизительно 72%, или по меньшей мере приблизительно 73%, или по меньшей мере приблизительно 74%, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 76%, или по меньшей мере приблизительно 77%, или по меньшей мере приблизительно 78%, или по меньшей мере приблизительно 79%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 81%, или по меньшей мере приблизительно 82%, или по меньшей мере приблизительно 83%, или по меньшей мере приблизительно 84%, или по меньшей мере приблизительно 85% после введения композиции по сравнению с уровнем микродистрофина до введения композиции или лекарственного препарата.

[0085] Кроме того, уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения композиции или лекарственного препарата. Уровень белка микродистрофина увеличивается на значение, составляющее от по меньшей мере приблизительно 70% до по меньшей мере приблизительно 80%, или от по меньшей мере приблизительно 70% до по меньшей мере приблизительно 90%, или от по меньшей мере приблизительно 80% до по меньшей мере приблизительно 90%, после введения gAAV по сравнению с уровнем микродистрофина до введения композиции или лекарственного препарата. Например, уровень белка микродистрофина увеличивается на по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 71%, или по меньшей мере приблизительно 72%, или по меньшей мере приблизительно 73%, или по

меньшей мере приблизительно 74%, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 76%, или по меньшей мере приблизительно 77%, или по меньшей мере приблизительно 78%, или по меньшей мере приблизительно 79%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 81%, или по меньшей мере приблизительно 82%, или по меньшей мере приблизительно 83%, или по меньшей мере приблизительно 84%, или по меньшей мере приблизительно 85% после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем микродистрофина до введения композиции или лекарственного препарата.

[0086] В любой из композиций для лечения мышечной дистрофии уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата. Например, уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на значение, составляющее от приблизительно 65% до приблизительно 90%, или от приблизительно 65% до приблизительно 95%, или от приблизительно 75% до приблизительно 90%, или от приблизительно 80% до приблизительно 90%, или от приблизительно 85% до приблизительно 95%, или от приблизительно 87% до приблизительно 95%, или от приблизительно 87% до приблизительно 90%, через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата. В частности, в случае любой из композиций для лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 87% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата, либо в случае любой из композиций для лечения мышечной дистрофии или любого из путей применения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 72% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата, либо в случае любой из композиций для лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 73% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата, или в случае любой из композиций для лечения мышечной дистрофии или любого из путей применения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 78% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции, либо в случае любой из композиций для лечения мышечной дистрофии или любого из путей применения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии по настоящему изобретению уровень СК в сыворотке крови у субъекта

снижается на приблизительно 95% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата. В случае любой из композиций для лечения мышечной дистрофии или любого из путей применения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии количество волокон, положительных по микродистрофину, в мышечной ткани субъекта увеличивается после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с количеством волокон, положительных по микродистрофину, до введения композиции или лекарственного препарата. Например, количество волокон, положительных по микродистрофину, определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения композиции или лекарственного препарата.

[0087] В случае любой из композиций для лечения мышечной дистрофии или любого из путей применения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии введение композиции или лекарственного препарата обеспечивает повышение уровня экспрессии белков DAPC, таких как альфа-саркогликан или бета-саркогликан. Например, уровень альфа-саркогликана у субъекта увеличивается после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем альфа-саркогликана до введения композиции или лекарственного препарата. Кроме того, уровень бета-саркогликана у субъекта увеличивается после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем бета-саркогликана до введения композиции или лекарственного препарата. Уровень альфа-саркогликана или бета-саркогликан определяют путем измерения уровня белка альфа-саркогликана или бета-саркогликана с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения композиции или лекарственного препарата.

[0088] В любой из композиций для лечения мышечной дистрофии или любом из путей применения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии прогрессирование заболевания у субъекта замедляется после введения композиции или лекарственного препарата, что измеряют с помощью любого из следующего: теста с шестиминутной ходьбой, времени подъема, подъема на 4 ступеньки, подъема и спуска на 4 ступеньки, системы амбулаторной оценки North Star (NSAA), теста на время прохождения 10 метров, теста на время прохождения 100 метров, ручной динамометрии (HND), теста с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени и/или балла по шкале подтеста оценки крупной моторики (Бейли-III).

[0089] Например, после введения любой из композиций для лечения мышечной дистрофии или при применении любого из путей применения лекарственного препарата для лечения мышечной дистрофии у субъекта наблюдается улучшение балла NSAA на по меньшей мере 6 пунктов через по меньшей мере 270 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с баллом NSAA до введения rAAV. Дополнительно в любом из способов у субъекта наблюдается улучшение времени подъема

на по меньшей мере 0,8 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению со временем подъема до введения композиции или лекарственного препарата. Кроме того в любом из способов или путей применения по настоящему изобретению у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время подъема на 4 ступеньки на по меньшей мере 1,2 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с тестом на время подъема на 4 ступеньки до введения композиции или лекарственного препарата. Кроме того в любом из способов или путей применения по настоящему изобретению у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время прохождения 100 м на по меньшей мере 7 секунд через по меньшей мере 270 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с тестом на время прохождения 100 м до введения композиции или лекарственного препарата.

[0090] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции для обеспечения экспрессии гена микродистрофина в клетке пациента, содержащие конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ ID NO: 6. В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение дозы конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ ID NO: 6 для получения лекарственного препарата для экспрессии гена микродистрофина в клетке пациента. Например, уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке пациента определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения конструкции rAAV.MHCK7.micro-dystrophin. Кроме того, уровень экспрессии гена микродистрофина измеряют у пациента путем определения кратности количества геномов вектора на ядро, где 1 геном вектора на ядро соответствует экспрессии микродистрофина на уровне приблизительно 50%, и более 1 копии на ядро соответствует уровню экспрессии микродистрофина. Например, в клетках имеется 1,2 копии вектора на ядро, или 1,3 копии вектора на ядро, или 1,4 копии вектора на ядро, или 1,5 копии вектора на ядро, или 1,6 копии вектора на ядро, или 1,7 копии вектора на ядро, или 1,8 копии вектора на ядро, или 1,9 копии вектора на ядро.

[0091] В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции для уменьшения уровней СК в сыворотке крови у пациента, нуждающегося в этом, при этом композиция содержит конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрено применение дозы конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с

нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6 для получения лекарственного препарата для уменьшения уровней СК в сыворотке крови у пациента, нуждающегося в этом. Например, уровень СК в сыворотке крови у пациента снижается на значение, составляющее от по меньшей мере приблизительно 65% до приблизительно 90%, или от приблизительно 65% до приблизительно 95%, или от приблизительно 75% до приблизительно 90%, или от приблизительно 80% до приблизительно 90%, или от приблизительно 85% до приблизительно 95%, или от приблизительно 87% до приблизительно 95%, или от приблизительно 87% до приблизительно 90%, через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата. В частности, уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на приблизительно 87% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата, или снижается на приблизительно 72% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата, или снижается на приблизительно 73% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата, или снижается на приблизительно 78% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата, или снижается на приблизительно 95% через 60 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции или лекарственного препарата.

[0092] В настоящем изобретении также предусмотрены композиции для увеличения количества волокон, положительных по микродистрофину, в мышечной ткани пациента, содержащие конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрено применение дозы конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8, или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6 для получения лекарственного препарата увеличения количества волокон, положительных по микродистрофину, в мышечной ткани пациента. Например, количество волокон, положительных по микродистрофину, определяют путем измерения уровня белка дистрофина с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения композиции или лекарственного препарата. Кроме того, уровень экспрессии гена микродистрофина измеряют у пациента путем определения кратности количества геномов вектора на ядро,

где 1 геном вектора на ядро соответствует экспрессии микродистрофина на уровне приблизительно 50%, и более 1 копии на ядро соответствует уровню экспрессии микродистрофина. Например, в клетках имеется 1,2 копии вектора на ядро, или 1,3 копии вектора на ядро, или 1,4 копии вектора на ядро, или 1,5 копии вектора на ядро, или 1,6 копии вектора на ядро, или 1,7 копии вектора на ядро, или 1,8 копии вектора на ядро, или 1,9 копии вектора на ядро.

[0093] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции для увеличения уровня экспрессии альфа-саркогликана у пациента, нуждающегося в этом, содержащие конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. В настоящем изобретении также предусмотрено применение дозы конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6 для получения лекарственного препарата для увеличения уровня экспрессии альфа-саркогликана у пациента, нуждающегося в этом. Например, уровень альфа-саркогликана определяют путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения композиции или лекарственного препарата.

[0094] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены композиции для увеличения уровня экспрессии бета-саркогликана у пациента, нуждающегося в этом, содержащие конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6. В настоящем изобретении также предусмотрено применение конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6 для получения лекарственного препарата для увеличения уровня экспрессии бета-саркогликана у пациента, нуждающегося в этом. Например, уровень бета-саркогликана определяют путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью вестерн-блота или иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения композиции или лекарственного препарата.

[0095] В настоящем изобретении также предусмотрено применение дозы конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 9, нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3, нуклеотидами 1-4977 из SEQ ID NO: 8 или нуклеотидами 56-5022 из SEQ IDNO: 6 для получения лекарственного препарата для лечения пациента с мышечной дистрофией Дюшенна или мышечной дистрофией Беккера, таким образом, чтобы введение лекарственного препарата привело к замедлению прогрессирования заболевания у пациента, что измеряют с помощью любого из следующего: теста с шестиминутной ходьбой, времени подъема, подъема на 4

ступеньки, подъема и спуска на 4 ступеньки, системы амбулаторной оценки North Star (NSAA), теста на время прохождения 10 метров, теста на время прохождения 100 метров, ручной динамометрии (ННД), теста с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени и/или балла по шкале подтеста оценки крупной моторики (Бейли-III).

[0096] Например, у субъекта наблюдается улучшение балла NSAA на по меньшей мере 6 пунктов через по меньшей мере 270 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с баллом NSAA до введения композиции или лекарственного препарата. Дополнительно у субъекта наблюдается улучшение времени подъема на по меньшей мере 0,8 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению со временем подъема до введения композиции или лекарственного препарата. Кроме того, у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время подъема на 4 ступеньки на по меньшей мере 1,2 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с тестом на время подъема на 4 ступеньки до введения композиции или лекарственного препарата. Кроме того, у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время прохождения 100 м на по меньшей мере 7 секунд через по меньшей мере 270 дней после введения композиции или лекарственного препарата по сравнению с тестом на время прохождения 100 м до введения композиции или лекарственного препарата.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0097] На **фигуре 1** проиллюстрирована конструкция rAAV.MHCK7.micro-dystrophin. В данной конструкции cDNA-кассета экспрессии фланкирована последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV2. Конструкция характеризуется наличием делеции в стержневом домене внутри рамки считывания (R4-R23), при этом шарнирные участки 1, 2 и 4 (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> и H<sub>4</sub>) и богатый цистеином домен все еще продуцируют белок с молекулярной массой 138 кДа. Экспрессию белка микродистрофина (3579 п. о.) регулируют с помощью промотора MHCK7 (795 п. о.). Интрон и 5'-UTR получены из плазмиды pCMVβ (Clontech). Кассета микродистрофина содержала консенсусную последовательность Козак непосредственно напротив стартового кодона ATG и небольшой, размером 53 п. о., синтетический сигнал поли-А для терминации mRNA. Кассета микродистрофина человека содержит домены (R4-R23/Δ71-78), как ранее описано в Harper et al. (Nature Medicine 8, 253-261 (2002)).

[0098] На **фигуре 2** представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 3) AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin.

[0099] На **фигуре 3** представлена карта плазмиды-помощника для AAV - pNLREP2-Caprh74.

[00100] На **фигуре 4** представлена плазида-помощник для аденовируса pHELP.

[00101] На **фигуре 5** проиллюстрирована конструкция плазмиды, содержащей rAAV.MCK.micro-dystrophin.

[00102] На **фигуре 6** представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ

ID NO: 5) rAAVrh74.MCK.micro-dystrophin.

[00103] На **фигуре 7** продемонстрирован уровень экспрессии гена микродистрофина в мышечных волокнах из биоптата икроножной мышцы, измеренный с помощью иммуноцитохимического анализа.

[00104] На **фигурах 8А-8С** представлены результаты вестерн-блота, демонстрирующие уровень экспрессии белка микродистрофина при правильной молекулярной массе. Что касается фиг. 8С, образцы от субъекта 4 (\*) разбавляли 1:4 (с получением линейного диапазона), поскольку в первоначальном анализе было превышено значение ULDQ (>80%), и для получения окончательного значения средние значения были умножены на поправочный коэффициент разбавления по сравнению с нормальным. Средний уровень экспрессии микродистрофина в сравнении с нормой составлял 182,7% по способу 1 и 222,0% по способу 2.

[00105] На **фигурах 9А-9С** продемонстрировано, что введение rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin обеспечивает повышение уровня экспрессии белков DAPC, альфа-саркогликана и бета-саркогликана.

[00106] На **фигуре 10** продемонстрировано стойкое резкое снижение уровня креатинкиназы (СКК) при введении rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin.

[00107] На **фигуре 11** представлено среднее изменение СК от исходного уровня до дня 270. Эти данные продемонстрировали, что уровень СК значительно снижается со временем после введения rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin.

[00108] На **фигуре 12** представлено среднее изменение уровня NSAA и среднее изменение уровня СК от исходного уровня до дня 270. Эти данные продемонстрировали, что уровень NSAA значительно увеличивался с течением времени после введения rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin.

[00109] На **фигуре 13** представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 9) AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin.

[00110] На **фигуре 14** проиллюстрирована конструкция плазмиды, содержащей AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin.

[00111] На **фигуре 15** представлена последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 8) плазмиды, содержащей конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin, которая содержит ген устойчивости к канамицину.

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

[00112] В настоящем изобретении предусмотрены векторы для генной терапии, например rAAV-векторы, обеспечивающие сверхэкспрессию микродистрофина человека, и способы снижения выраженности и предупреждения фиброза у пациентов с мышечной дистрофией. В биоптатах мышц, отобранных в наиболее раннем возрасте при диагнозе DMD, выявляют заметную пролиферацию соединительной ткани. Мышечный фиброз вреден по многим причинам. Он снижает нормальный транзит питательных веществ эндомизия через барьеры соединительной ткани, уменьшает кровоток и лишает мышцы питательных компонентов сосудистого происхождения, и, что касается



функциональности, способствует преждевременной потере способности передвигаться из-за контрактур конечностей. Со временем проблемы с лечением многократно увеличиваются по причине выраженного фиброза мышц. Это можно наблюдать в биоптатах мышц, сравнивая уровень пролиферации соединительной ткани в последовательные моменты времени. Процесс продолжает обостряться, что приводит к потере способности передвигаться, и бесконтрольно ускоряется, особенно у пациентов, зависимых от инвалидных колясок.

[00113] Без раннего лечения, включающего параллельный подход для уменьшения выраженности фиброза, маловероятно, что когда-либо удастся полностью реализовать преимущества видов терапии на основе пропускания экзонов, сквозного прочитывания стоп-кодонов или замещения генов. Даже стратегии на основе малых молекул или замещения белков могут потерпеть неудачу без подхода, обеспечивающего уменьшение уровня мышечного фиброза. Предыдущей работой на мышцах mdx, достигших определенного возраста, с имеющимся фиброзом, получавших AAV.micro-dystrophin, продемонстрировано, что авторам настоящего изобретения не удалось достичь полного функционального восстановления (Liu, M., et al., *Mol Ther* 11, 245-256 (2005)). Также известно, что прогрессирование кардиомиопатии, обусловленной DMD, сопровождается рубцеванием и фиброзом стенки желудочка.

[00114] Используемый в данном документе термин «AAV» является стандартной аббревиатурой для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой парвовирус с одноцепочечной ДНК, который растет только в клетках, в которых определенные функциональные элементы обеспечиваются коинфицирующим вирусом-помощником. В настоящее время описано тринадцать серотипов AAV. Общую информацию и обзоры по AAV можно найти, например, в Carter, 1989, *Handbook of Parvoviruses*, том. 1, ст. 169-228, и Berns, 1990, *Virology*, ст. 1743-1764, Raven Press, (Нью-Йорк). Однако вполне ожидаемо, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы являются довольно близкородственными, как структурно, так и функционально, даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, ст. 165-174 в *Parvoviruses and Human Disease*, под ред. J. R. Pattison; и Rose, *Comprehensive Virology* 3:1-61 (1974)). Например, все серотипы AAV, по-видимому, проявляют очень похожие свойства репликации, опосредованные гомологичными генами гер; и все несут три родственных капсидных белка, таких как капсидные белки, экспрессируемые в AAV2. Предположение о степени родства дополнительно можно делать на основе гетеродуплексного анализа, который выявляет обширную перекрестную гибридизацию между серотипами по длине генома; и наличие аналогичных самоотжигающихся сегментов на концах, которые соответствуют «последовательностям инвертированных концевых повторов» (ITR). Подобные паттерны инфекционности также дают основание предположить, что функциональные элементы репликации в каждом серотипе находятся под сходным регуляторным контрольным элементом.

[00115] «Вектор на основе AAV», как используется в данном документе, относится к вектору, содержащему один или несколько представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевых повторов (ITR) AAV. Такие векторы AAV могут реплицироваться и упаковываться в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была трансфицирована вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов гер и сар.

[00116] «Вирион AAV» или «вирусная частица AAV», или «векторная частица на основе AAV» относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсулированного полинуклеотидного вектора на основе AAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т. е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, подлежащий доставке в клетку млекопитающего), ее обычно называют «векторной частицей на основе AAV» или просто «вектором на основе». Таким образом, получение векторной частицы на основе AAV обязательно предусматривает получение вектора на основе AAV, поскольку такой вектор содержится в векторной частице AAV.

### AAV

[00117] Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой парвовирус, дефектный по репликации, однонитевой ДНК-геном которого имеет длину приблизительно 4,7 т. о., включая инвертированные концевые повторы (ITR) длиной 145 нуклеотидов. Существует несколько серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV известны. Например, нуклеотидная последовательность серотипа 2 AAV (AAV2) представлена в Srivastava et al., J Virol, 45: 555-564 (1983) с исправлениями из Ruffing et al., J Gen Virol, 75: 3385-3392 (1994). В качестве других примеров, полный геном AAV-1 представлен под номером доступа в GenBank NC\_002077; полный геном AAV-3 представлен под номером доступа в GenBank NC\_1829; полный геном AAV-4 представлен под номером доступа в GenBank NC\_001829; геном AAV-5 представлен под номером доступа в GenBank AF085716; полный геном AAV-6 представлен под номером доступа в GenBank NC\_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 представлены под номерами доступа в GenBank AX753246 и AX753249, соответственно (см. также патенты США №№ 7282199 и 7790449 относительно AAV-8); геном AAV-9 представлен в Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 представлен в Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 представлен в Virology, 330(2): 375-383 (2004). Клонирование серотипа AAVrh.74 описано в Rodino-Klapac., et al. Journal of translational medicine 5, 45 (2007). Цис-действующие последовательности, управляющие репликацией вирусной ДНК (гер), инкапсулированием/упаковкой и интеграцией в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR AAV. Три промотора AAV (называемые p5, p19 и p40 по их относительным местоположениям на карте) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены гер и сар. Два промотора гер (p5 и p19) в сочетании с дифференциальным сплайсингом одного интрона AAV (например, в нуклеотидах 2107 и 2227 AAV2) приводят к продуцированию четырех белков гер (гер 78,

гер 68, гер 52 и гер 40) из гена гер. Белки гер обладают несколькими ферментативными свойствами, которые в конечном счете отвечают за репликацию вирусного генома. Ген сар экспрессируется под управлением промотора р40, и он кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты начала трансляции отвечают за продуцирование трех родственных капсидных белков. Один консенсусный сайт полиаденилирования расположен в положении 95 на карте генома AAV. Обзор жизненного цикла и генетических особенностей AAV представлен в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

[00118] AAV обладает уникальными признаками, которые делают его привлекательным в качестве вектора для доставки чужеродной ДНК в клетки, например при генной терапии. Инфицирование клеток в культуре с помощью AAV является нецитопатическим, а естественное инфицирование людей и других животных является скрытым и бессимптомным. Более того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что обеспечивает возможность нацеливания на многие различные ткани *in vivo*. Более того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и неделящиеся клетки и может персистировать по сути на протяжении всей жизни этих клеток в качестве транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Провирусный геном AAV является инфекционным в виде клонируемой ДНК в плаزمиде, что делает возможным конструирование рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, управляющие репликацией AAV, инкапсулированием и интеграцией генома, содержатся в области, ограниченной ITR генома AAV, некоторая или вся внутренняя часть генома, составляющая примерно 4,3 т. о. (кодирующая белки репликации и структурные капсидные белки, гер-сар), может быть заменена чужеродной ДНК, такой как генная кассета, содержащая промотор, ДНК, представляющую интерес, и сигнал полиаденилирования. Белки гер и сар могут предоставляться в *транс-положении*. Еще одним важным признаком AAV является то, что он является чрезвычайно стабильным и стойким вирусом. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56°C до 65°C в течение нескольких часов), что делает хранение AAV на холоде менее критичным. AAV можно даже лиофилизировать. Наконец, клетки, инфицированные AAV, не являются устойчивыми к повторному инфицированию.

[00119] Множественные исследования продемонстрировали долговременную (> 1,5 года) опосредованную рекомбинантным AAV экспрессию белка в мышце. См., Clark et al., *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14082-14087 (1996); и Xiao et al., *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996). См. также, Chao et al., *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) и Chao et al., *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Более того, поскольку мышцы сильно васкуляризованы, рекомбинантная трансдукция AAV приводила к появлению трансгенного продукта в системном кровотоке после внутримышечной инъекции, как описано в Herzog et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5804-5809 (1997) и Murphy et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13921-13926 (1997). Более того, Lewis et al., *J Virol*, 76: 8769-8775 (2002) продемонстрировали, что скелетные миофибриллы обладают необходимыми

клеточными факторами для правильного гликозилирования, фолдинга и секреции антител, что указывает на то, что мышцы способны к стабильной экспрессии терапевтических секретируемых белков.

[00120] Геномы рекомбинантных AAV по настоящему изобретению предусматривают молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и один или несколько ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах гAAV могут представлять собой ДНК из AAV любого серотипа, для которого можно получить рекомбинантный вирус, в том числе без ограничения из серотипов AAV AAVrh.74, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13. Получение псевдотипированного гAAV раскрыто, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов гAAV, например гAAV с мутациями капсидных белков. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Как отмечено в разделе «Предпосылки создания изобретения» выше, нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны из уровня техники. Для обеспечения специфической для скелетных мышц экспрессии можно использовать AAV1, AAV6, AAV8 или AAVrh.74.

[00121] ДНК-плазмиды по настоящему изобретению содержат геномы гAAV по настоящему изобретению. ДНК-плазмиды переносят в клетки, перmissive в отношении инфицирования вирусом-помощником AAV (например, аденовирусом, аденовирусом с удаленным E1 или вирусом герпеса), для сборки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Методики получения частиц гAAV, в рамках которых геном AAV, подлежащий упаковке, гены гер и сар и функциональные элементы вируса-помощника доставляются в клетку, являются стандартными в данной области техники. Для получения гAAV требуется, чтобы в одной клетке (называемой в данном документе упаковывающей клеткой) присутствовали следующие компоненты: геном гAAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV (*m. e.* не находящиеся в нем), и функциональные элементы вируса-помощника. Гены гер и сар AAV могут быть получены из любого серотипа AAV, для которого можно получить рекомбинантный вирус, и могут быть получены из серотипа AAV, отличного от серотипа, из которого получены ITR генома гAAV, в том числе без ограничения из серотипов AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAVrh.74, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13. Получение псевдотипированного гAAV раскрыто, например, в WO 01/83692, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00122] Способ получения упаковывающей клетки заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для продуцирования частицы AAV. Например, в геном клетки интегрируют плазмиду (или несколько плазмид), содержащую геном гAAV, в котором отсутствуют гены гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV, и селективируемый маркер, такой как ген устойчивости к неомицину. Геномы AAV вводили в бактериальные плазмиды с

помощью процедур, таких как образование GC-хвостов (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) или путем прямого лигирования тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Затем упаковывающую клеточную линию инфицируют вирусом-помощником, таким как аденовирус. Преимущества этого способа заключаются в том, что клетки могут быть подвергнуты отбору и подходят для крупномасштабного получения гAAV. В других примерах подходящих способов используют аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки.

[00123] Обзор общих принципов получения гAAV представлен, например, в Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Различные подходы описаны в Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al., J. Virol., 63:3822-3828 (1989); 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. Vaccine 13:1244-1250 (1995); Paul et al. Human Gene Therapy 4:609-615 (1993); Clark et al. Gene Therapy 3:1124-1132 (1996); патенте США № 5786211; патенте США № 5871982; и патенте США № 6258595. Вышеупомянутые документы настоящим включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте с особым акцентом на тех разделах документов, которые относятся к получению гAAV.

[00124] Таким образом, настоящее изобретение относится к упаковывающим клеткам, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном варианте осуществления упаковывающие клетки могут быть стабильно трансформированными раковыми клетками, такими как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная 293 линия). В другом варианте осуществления упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такие как клетки 293 с низким числом пересевов (клетки почки человеческого плода, трансформированные с помощью аденовируса E1), клетки MRC-5 (фибробласты человеческого плода), клетки WI-38 (фибробласты человеческого плода), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода макака-резуса).

[00125] Рекомбинантный AAV (*m. e.* инфекционные инкапсулированные частицы гAAV) по настоящему изобретению содержит геном гAAV. В иллюстративных вариантах осуществления геномы обоих гAAV лишены ДНК гер и сар AAV, то есть ДНК гер или сар AAV между ITR геномов отсутствует. Примеры гAAV, которые могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать молекулы нуклеиновой кислоты по

настоящему изобретению, изложены в международной заявке на патент № PCT/US2012/047999 (WO 2013/016352), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00126] В иллюстративном варианте осуществления, вектор, представляющий собой рекомбинантный AAV, получали с помощью способа с применением тройной трансфекции (Xiao et al., J Virol **72**, 2224-2232 (1998) с применением плазмид для вектора на основе AAV, представляющего собой rAAV.MHCK7.micro-dystrophin, - pNLRep2-Caprh74 и pHelp, при этом rAAV содержит кассету экспрессии гена микродистрофина, фланкированную последовательностями инвертированного концевой повтора (ITR) AAV2. Именно эта последовательность инкапсулируется в вирионы AAVrh74. Плазида содержит последовательность микродистрофина и энхансера MHCK7 и элементы основного промотора специфичного для мышц промотора для управления экспрессией гена. Кассета экспрессии также содержит интрон SV40 (SD/SA) для обеспечения экспрессии генов на высоком уровне, а сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста используют для эффективной терминации транскрипции.

[00127] pNLREP2-Caprh74 представляет собой плазмиду-помощник для AAV, которая кодирует 4 белка гер AAV2 дикого типа и 3 капсидных белка VP AAV дикого типа из серотипа rh74. Схематическая карта плазмиды pNLREP2-Caprh74 показана на фигуре 3.

[00128] Плазида-помощник для аденовируса pHELP имеет длину 11635 п. о. и была получена от Applied Viromics. Плазида содержит участки генома аденовируса, которые важны для репликации AAV, а именно РНК E2A, E4ORF6 и VA (функциональные элементы E1 аденовируса обеспечиваются клетками 293). Последовательности аденовируса, присутствующие в этой плазмиде, составляют только ~40% генома аденовируса и не содержат *цис*-элементов, критических для репликации, таких как концевые повторы аденовируса. Следовательно, в такой системе продуцирования не ожидается образования инфекционного аденовируса. Схематическая карта плазмиды pHELP показана на фигуре 4.

[00129] rAAV может быть очищен стандартными в данной области техники способами, такими как колоночная хроматография или градиенты хлорида цезия. Способы очистки rAAV-векторов от вируса-помощника известны из уровня техники и включают способы, раскрытые, например, в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); патенте США № 6566118 и WO 98/09657.

[00130] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении рассматриваются композиции, содержащие rAAV по настоящему изобретению. Композиции по настоящему изобретению содержат rAAV и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и вспомогательные средства. Приемлемые носители, разбавители и вспомогательные средства являются нетоксичными для получающих их пациентов и

предпочтительно являются инертными в используемых дозировках и концентрациях, и они включают буферы и поверхностно-активные вещества, такие как плуроники.

[00131] Титры гAAV, подлежащего введению в способах по настоящему изобретению, будут варьировать в зависимости, например, от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивидуума и типа(типов) клеток, в отношении которого(которых) осуществляют нацеливание, и они могут быть определены с помощью способов, стандартных в данной области техники. Титры гAAV могут находиться в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1 \times 10^9$ , приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1 \times 10^{13}$  до приблизительно  $1 \times 10^{14}$  или больше частиц, устойчивых к ДНКазе (DRP), на мл. Дозировки также могут быть выражены в единицах геномов вируса (г. в.). В одном иллюстративном способе определения титра генома инкапсулированного вектора применяется количественная PCR, например, как в способах, описанных в (Pozsgai et al., Mol. Ther. 25(4): 855-869, 2017).

[00132] В настоящем изобретении рассматриваются способы трансдукции клетки-мишени с помощью гAAV, *in vivo* или *in vitro*. Способы *in vivo* включают стадию введения эффективной дозы или эффективных многократных доз композиции, содержащей гAAV по настоящему изобретению, животному (в том числе человеку), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития нарушения/заболевания, то введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития нарушения/заболевания, то введение является терапевтическим. В вариантах осуществления по настоящему изобретению эффективная доза представляет собой дозу, которая обеспечивает уменьшение интенсивности (устранение или ослабление) по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с нарушением/болезненным состоянием, лечение которого осуществляется, которая обеспечивает замедление или предупреждение прогрессирования до нарушения/болезненного состояния, которая обеспечивает замедление или предупреждение прогрессирования нарушения/болезненного состояния, которая обеспечивает уменьшение степени выраженности заболевания, которая приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или которая обеспечивает увеличение времени выживаемости. Примером заболевания, для которого рассматривается предотвращение или лечение с помощью способов по настоящему изобретению, является DMD.

[00133] Также в изобретении рассматриваются виды комбинированной терапии. Комбинация, как используется в данном документе, включает как одновременное лечение, так и последовательное лечение. В частности, рассматриваются комбинации способов по настоящему изобретению со стандартными видами медицинского лечения (*например*, кортикостероидами), а также комбинации с новыми видами терапии.

[00134] Введение эффективной дозы композиций можно осуществлять с помощью путей, стандартных в данной области техники, включающих без ограничения внутримышечный, парентеральный, внутривенный, пероральный, трансбуккальный,

интраназальный, легочный, внутрочерепной, внутрикостный, внутриглазной, ректальный или вагинальный пути. Путь(пути) введения и серотип(серотипы) компонентов AAV в rAAV (в частности, ITR и капсидного белка AAV) по настоящему изобретению могут быть выбраны и/или подобраны специалистом в данной области техники с учетом инфекции и/или болезненного состояния, лечение которого осуществляют, и клеток-/ткани(тканей)-мишени(мишеней), в которых будет экспрессироваться белок микродистрофин.

[00135] В настоящем изобретении предусмотрены локальное введение и системное введение эффективной дозы rAAV и композиций по настоящему изобретению. Например, системное введение представляет собой введение в систему кровообращения, вследствие чего воздействие оказывается на весь организм. Системное введение включает энтеральное введение, такое как всасывание через желудочно-кишечный тракт, и парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации.

[00136] В частности, фактическое введение rAAV по настоящему изобретению может быть осуществлено путем применения любого физического способа, который обеспечивает транспортировку рекомбинантного вектора rAAV в ткань-мишень животного. Введение в соответствии с настоящим изобретением включает без ограничения инъекцию в мышцу и инъекцию в кровоток. Было продемонстрировано, что простого повторного суспендирования rAAV в забуференном фосфатом солевом растворе достаточно для получения среды-носителя, применимой для экспрессии в мышечной ткани, и не существует каких-либо известных ограничений в отношении носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с rAAV (хотя при использовании rAAV в обычном порядке следует 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 мышечная ткань. См., например, WO 02/053703, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных составов или в виде составов для местного применения, которые подлежат доставке в мышцы путем чрескожного транспорта. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для чрескожного транспорта были разработаны ранее и могут применяться при практическом осуществлении настоящего изобретения. rAAV можно применять совместно с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обращения.

[00137] В одном варианте осуществления настоящего изобретения AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin, описанный в данном документе, составлен в буфере, содержащем 20 mM Tris (pH 8,0), 1 mM хлорида магния ( $MgCl_2$ ), 200 mM хлорида натрия (NaCl) и 0,001% полоксамера 188.

[00138] Доза rAAV, подлежащая введению в способах, раскрытых в данном документе, будет варьировать в зависимости, например, от конкретного rAAV, способа введения, цели лечения, индивидуума и типа(типов) клеток, в отношении



которого(которых) осуществляют нацеливание, и может быть определена с помощью способов, стандартных в данной области техники. Титры каждого вводимого гAAV могут находиться в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1 \times 10^9$ , приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1 \times 10^{13}$ , приблизительно  $1 \times 10^{14}$ , приблизительно  $2 \times 10^{14}$  или до приблизительно  $1 \times 10^{15}$  или больше частиц, устойчивых к ДНКазе (DRP), на мл. Дозировки также могут быть выражены в единицах геномов вируса (г. в.) (*m. e.*  $1 \times 10^7$  г. в.,  $1 \times 10^8$  г. в.,  $1 \times 10^9$  г. в.,  $1 \times 10^{10}$  г. в.,  $1 \times 10^{11}$  г. в.,  $1 \times 10^{12}$  г. в.,  $1 \times 10^{13}$  г. в.,  $1 \times 10^{14}$  г. в.,  $2 \times 10^{14}$  г. в.,  $1 \times 10^{15}$  г. в. соответственно). Дозировки также могут быть выражены в единицах геномов вируса (г. в.) на килограмм (кг) веса тела (*m. e.*,  $1 \times 10^{10}$  г. в./кг,  $1 \times 10^{11}$  г. в./кг,  $1 \times 10^{12}$  г. в./кг,  $1 \times 10^{13}$  г. в./кг,  $1 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $1,25 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $1,5 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $1,75 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $2,0 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $2,25 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $2,5 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $2,75 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $3,0 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $3,25 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $3,5 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $3,75 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $4,0 \times 10^{14}$  г. в./кг,  $1 \times 10^{15}$  г. в./кг соответственно). Способы титрования AAV описаны в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039 (1999).

[00139] В частности, фактическое введение гAAV по настоящему изобретению может быть осуществлено путем применения любого физического способа, который обеспечивает транспортировку рекомбинантного вектора гAAV в ткань-мишень животного. Введение в соответствии с настоящим изобретением включает без ограничения инъекцию в мышцу и инъекцию в кровоток. Было продемонстрировано, что простого повторного суспендирования гAAV в забуференном фосфатом солевом растворе достаточно для получения среды-носителя, применимой для экспрессии в мышечной ткани, и не существует каких-либо известных ограничений в отношении носителей или других компонентов, которые можно вводить совместно с гAAV (хотя при использовании гAAV в обычном порядке следует избегать композиций, которые разрушают ДНК). Капсидные белки гAAV могут быть модифицированы таким образом, чтобы гAAV был нацелен на конкретную ткань-мишень, представляющую интерес, такую как мышечная ткань. См., например, WO 02/053703, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъекционных составов или в виде составов для местного применения, которые подлежат доставке в мышцы путем чрескожного транспорта. Многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для чрескожного транспорта были разработаны ранее и могут применяться при практическом осуществлении настоящего изобретения. гAAV можно применять совместно с любым фармацевтически приемлемым носителем для простоты введения и обращения.

[00140] Для целей внутримышечной инъекции можно использовать растворы во вспомогательном средстве, таком как кунжутное или арахисовое масло, или в водном пропиленгликоле, а также стерильные водные растворы. Такие водные растворы могут быть при необходимости забуферены, и жидкому разбавителю сначала придают изотонические свойства с помощью физиологического раствора или глюкозы. Растворы

гAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли можно получать в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсию гAAV также можно получать в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предупреждения роста микроорганизмов. В связи с этим все используемые стерильные водные среды можно легко получить посредством стандартных методик, хорошо известных специалистам в данной области техники.

[00141] Фармацевтические носители, разбавители или вспомогательные вещества, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть текучей в степени, достаточной для обеспечения легкого введения с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и ее необходимо предохранять от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель также может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащая степень текучести может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предупреждение воздействия микроорганизмов может обеспечиваться с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические средства, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может обеспечиваться благодаря использованию средств, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[00142] Стерильные инъекционные растворы получают путем включения гAAV в требуемом количестве в соответствующий растворитель, при необходимости с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, с последующей стерилизующей фильтрацией. Обычно дисперсии получают путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются методики вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые обеспечивают получение порошка из активного ингредиента плюс любого дополнительного необходимого ингредиента из их предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

[00143] Трансдукцию посредством гAAV также можно осуществлять *in vitro*. В

одном варианте осуществления необходимые мышечные клетки-мишени извлекают из организма субъекта, трансдуцируют посредством гAAV и вводят обратно субъекту. В качестве альтернативы, можно использовать сингенные или ксеногенные мышечные клетки, если эти клетки не вызывают неприемлемый иммунный ответ у субъекта.

[00144] Подходящие способы выполнения трансдукции и введения трансдуцированных клеток обратно субъекту известны из уровня техники. В одном варианте осуществления клетки могут быть подвергнуты трансдукции *in vitro* путем объединения гAAV с мышечными клетками, *например*, в подходящей среде, и скрининга в отношении тех клеток, которые содержат ДНК, представляющую интерес, с помощью традиционных методик, таких как Саузерн-блот и/или ПЦР, или путем применения селективируемых маркеров. Трансдуцированные клетки можно затем составлять в виде фармацевтических композиций, и композицию можно вводить субъекту с помощью различных методик, как, например, путем внутримышечной, внутривенной, подкожной и внутрибрюшинной инъекции или путем инъекции в гладкую и сердечную мышцу с помощью, *например*, катетера.

[00145] Трансдукция клеток посредством гAAV по настоящему изобретению приводит к устойчивой экспрессии белка микродистрофина. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены способы введения/доставки гAAV, который обеспечивает экспрессию белка микродистрофина, животному, предпочтительно человеку. Эти способы включают трансдукцию тканей (в том числе без ограничения тканей, таких как мышечная ткань, органов, таких как печень и головной мозг, и желез, таких как слюнные железы) посредством одного или более гAAV по настоящему изобретению. Трансдукцию можно осуществлять с помощью генных кассет, содержащих тканеспецифичные контролирующие элементы. Например, в одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы трансдукции мышечных клеток и мышечных тканей, управляемой специфичными для мышц контролируемыми элементами, включая без ограничения таковые, которые происходят из семейств генов актина и миозина, например из семейства генов *myoD* (см. Weintraub et al., *Science*, 251: 761-766 (1991)), миоцит-специфический энхансерный связывающий фактор MEF-2 (Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)), контролирующие элементы, полученные из гена скелетного актина человека (Muscata et al., *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)), элементы последовательности гена мышечной креатинкиназы (см. Johnson et al., *Mol Cell Biol*, 9:3393-3399 (1989)) и энхансерный элемент гена креатинкиназы мышцы (mCK), контролирующие элементы, полученные из гена тропонина С быстро сокращающихся волокон скелетных мышц, гена тропонина С медленно сокращающихся волокон сердечной мышцы и гена тропонина I медленно сокращающихся волокон; ядерные факторы, индуцируемые гипоксией (Semenza et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5680-5684 (1991)), стероид-индуцируемые элементы, а также промоторы, содержащие глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (см. Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993)), и другие контролирующие элементы.

[00146] Мышечная ткань является привлекательной мишенью для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и легко доступна. В настоящем изобретении рассматривается устойчивая экспрессия микродистрофина в трансдуцированных мышечных волокнах.

[00147] Под «мышечной клеткой» или «мышечной тканью» подразумевается клетка или группа клеток, происходящих из мышцы любого вида (например, скелетной мышцы и гладкой мышцы, *например*, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или ткани сердца). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными, как, например, миообласты, миоциты, мышечные трубочки, кардиомиоциты и кардиомиообласты.

[00148] Термин «трансдукция» используют для обозначения введения/доставки кодирующей области микродистрофина в клетку-реципиент либо *in vivo*, либо *in vitro*, посредством дефектного по репликации гAAV по настоящему изобретению, что приводит к экспрессии микродистрофина клеткой-реципиентом.

[00149] Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены способы введения эффективной дозы (или доз, вводимых по существу одновременно, или доз, вводимых с интервалами) гAAV, кодирующего микродистрофин, субъекту, нуждающемуся в этом.

[00150] Следующие ПРИМЕРЫ представлены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения. Описанные числовые диапазоны включают каждое целое значение в каждом диапазоне и включают наименьшее и наибольшее указанные целые числа.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1**

#### **Образование конструкции на основе AAVrh74.MHCK7.microdystrophin**

[00151] Плазмида, содержащая AAVrh74.MHCK7.microdystrophin, содержит cDNA-кассету экспрессии микродистрофина человека, фланкированную последовательностями AAV2 инвертированного концевого повтора (ITR) (см. фиг. 1). Конструкция микродистрофина характеризуется наличием делеции в стержневом домене внутри рамки считывания (R4-R23), при этом шарнирные участки 1, 2 и 4 и богатый цистеином домен все еще продуцируют белок с молекулярной массой 138 кДа. Экспрессию белка микродистрофина (3579 п. о.) регулировали с помощью промотора MHCK7 (792 п. о.). Плазмида была сконструирована из плазмиды, содержащей гAAV.MCK.micro-dystrophin, с помощью удаления промотора MCK и вставки промотора MHCK7. После основного промотора присутствует эндогенный экзон 1 MCK мышцы (нетранслируемый) размером 53 п. о. для обеспечения эффективной инициации транскрипции, после которого следуют сигналы сплайсинга поздних 16S/19S SV40 (150 п. о.) и малая 5'-UTR (61 п. о.). Интрон и 5'-UTR получены из плазмиды pCMVβ (Clontech). Кассета микродистрофина содержала консенсусную последовательность Козак непосредственно напротив старт-кодона ATG и небольшой, размером 53 п. о., синтетический сигнал поли-А для терминации mRNA. Кассета микродистрофина человека содержала домены (R4-R23/Δ71-78), как ранее

описано в Harper et al. (Nature Medicine **8**, 253-261 (2002)). Комплементарная ДНК была подвергнута оптимизации кодонов для применения у человека и синтезирована GenScript (Пискатауэй, Нью-Джерси) (Mol Ther **18**, 109-117 (2010)). Единственные вирусные последовательности, включенные в этот вектор, представляли собой инвертированные концевые повторы AAV2, которые необходимы как для репликации вирусной ДНК, так и для ее упаковки. Кассета микродистрофина содержит небольшой, размером 53 п. о., синтетический сигнал поли-А для терминации mRNA.

[00152] В предыдущих исследованиях осуществили валидацию экспрессии в сердечной мышце при применении промотора МНСК7 (Salva et al. Mol Ther **15**, 320-329 (2007)) и обеспечиваемую AAVrh74 экспрессию в скелетных мышцах, мышцах диафрагмы и сердечной мышце (Sondergaard et al. Annals of clinical and Transl Neurology **2**, 256-270 (2015)). Последовательность конструкции, представленной на фиг. 1, была инкапсулирована в вирионы AAVrh.74. Молекулярный клон серотипа AAVrh.74 был клонирован из лимфатического узла макака резуса и рассмотрен в Rodino-Klapac et al. Journal of Translational medicine **5**, 45 (2007).

В **таблице 1** показаны молекулярные признаки плазмиды, содержащей AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin (SEQ ID NO: 3)

Таблица1. Молекулярные признаки плазмиды, содержащей rAAV.МНСК7.micro-dystrophin				
ТИП	НАЧАЛО	КОНЕЦ	НАЗВАНИЕ	ОПИСАНИЕ
ОБЛАСТЬ	55	182	5'-ITR	Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа
ОБЛАСТЬ	244	1035	МНСК7	Комплекс тяжелой цепи миозина мышцы - слитый энхансер/промотор креатинкиназы мышц с E-боксом
ОБЛАСТЬ	1045	1194	Химерный интрон	5'-донорный сайт из гена $\beta$ -глобина человека и точка ветвления и 3'-сайт акцептора сплайсинга из вариабельной области тяжелой цепи IgG
ГЕН	1205	4783	cDNA huDys	cDNA микродистрофина человека
ОБЛАСТЬ	4786	4838	поли-А	Синтетический поли-А
ОБЛАСТЬ	4894	5021	3'-ITR	Инвертированный концевой повтор AAV2 дикого типа
ГЕН	6760	7619	AmpR	ген $\beta$ -лактамазы
ОБЛАСТЬ	7823	8442	Ori	Точка начала репликации плазмиды

**Образование конструкции AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin из плазмиды, кодирующей ген устойчивости к канамицину (Kan)**

[00153] Клонирование МНСК7.μDys.KAN было достигнуто путем выделения фрагмента МНСК7.μDys из плазмиды, содержащей МНСК7.μDys.AMP, и главной цепи канамицина и их отжига с применением технологического процесса клонирования NEBuilder. Фрагмент МНСК7.μDys выделяли с помощью расщепления рестрикционным ферментом по SnaBI. Расщепление проводили в реакционной смеси общим объемом 50 мкл с 1x буфером CutSmart (NEB) и 1 мкл SnaBI при 37°C в течение 1 часа. Полученный фрагмент выделяли с помощью электрофореза, проводимого при напряжении 105 вольт в течение 1,5 часа, с применением 1% агарозного геля. Полосу, соответствующую вставке МНСК7.μDys, вырезали и очищали с применением набора для очистки от геля (Macherey-Nagel). Полученный фрагмент характеризовался концентрацией ДНК 10 нг/мкл. Фрагмент остова Kan выделяли путем расщепления рестрикционным ферментом по XbaI в реакционной смеси общим объемом 50 мкл с 1x буфером CutSmart (NEB) и 1 мкл XbaI при 37°C в течение 1 часа. Полученный фрагмент выделяли с помощью электрофореза, проводимого при напряжении 105 вольт в течение 1,5 часа, с применением 1% агарозного геля. Полосу, соответствующую остову Kan, вырезали и очищали с применением набора для очистки от геля (Macherey-Nagel). Полученный фрагмент характеризовался концентрацией ДНК 8,1 нг/мкл. Два фрагмента отжигали с применением технологического процесса клонирования NEBuilder, с помощью которого можно осуществлять объединение двух фрагментов с перекрывающимися последовательностями. Реакцию клонирования с помощью NEBuilder проводили согласно протоколу производителя при 50°C в течение 15 минут с применением соотношения МНСК7.μDys и остова канамицина 1:1 в 1x мастер-миксе для сборки ДНК высокой точности NEBuilder в реакционной смеси общим объемом 20 мкл. Полученный клон трансформировали в устойчивые компетентные клетки *E. coli* (C3040) NEB® путем добавления к клеткам 2,5 мкл клонируемого продукта, с последующим выдерживанием на льду в течение 30 минут, затем при 42°C в течение 30 секунд и дополнительно на льду в течение 5 минут. После трансформации к клеткам добавляли 950 мкл среды для разрастания и обеспечивали рост при 30°C в течение 1,5 часа с обеспечением встряхивания при 225 об./мин. После разрастания 450 мкл таких клеток высевали на чашку, содержащую агаровую среду LB с 50 мкг/мл канамицина, и инкубировали в течение ночи при 30°C в сухом инкубаторе. Из данной чашки выбирали колонию и выращивали в течение ночи в LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина. ДНК выделяли из 3 мл данной культуры с применением набора QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen). Данную ДНК использовали для подтверждения клонируемого продукта. Клонированный продукт подтверждали с помощью расщепления рестрикционным ферментом по PmeI, MscI и SmaI с последующим гель-электрофорезом. Клонированный продукт дополнительно подтверждали посредством секвенирования. Полученная плазида представлена под SEQ ID NO:8 и показана на фигурах 14 и 15. Последовательность конструкции на фиг. 13, которая соответствует приведенной под SEQ ID NO:9, и нуклеотиды 1-4977, приведенные под SEQ ID NO: 8, были инкапсулированы в вирионы AAVrh.74, как описано выше.

## Пример 2

### Клиническое испытание системной доставки гена при мышечной дистрофии Дюшенна

[00154] Это контролируемое испытание с однократной дозой с применением rAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin под SEQ ID NO: 3, нуклеотидов 55-5021, для субъектов с DMD. В когорту А включают шесть субъектов в возрасте от 3 месяцев до 3 лет и в когорту В включают шесть субъектов в возрасте от 4 лет до 7 лет. Всем субъектам введут внутривенно вектор, кодирующий микродистрофин ( $2 \times 10^{14}$  г. в./кг в 10 мл/кг). rAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin составлен в буфере, содержащем 20 мМ Tris (pH 8,0), 1 мМ хлорида магния ( $MgCl_2$ ), 200 мМ хлорида натрия (NaCl) и 0,001% полоксамера 188.

[00155] В исследовании rAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin вводили путем инфузии в периферическую вену руки таким образом, что он мог проникнуть во все мышцы в теле. Шесть субъектов с DMD в возрасте от 3 месяцев до 3 лет в когорте А и шесть субъектов с DMD в возрасте от 4 лет до 7 лет в когорте В были включены в исследование. Всем субъектам вводили внутривенно вектор, кодирующий микродистрофин ( $2 \times 10^{14}$  г. в./кг в 10 мл/кг). Титр инкапсулированного генома вектора во вводимой дозе определяли с применением количественной ПЦР с применением системы выявления Prism 7500 Taqman (PE Applied Biosystems) с праймерами, направленными против промотора МНСК7, при сравнении со стандартом, представляющим собой суперспиральную ДНК-плазмиду (Pozsgai et al. Mol. Ther. 25(4): 855- 869, 2017).

[00156] Субъекты получали инфузии в течение 1 часа в педиатрическом отделении интенсивной терапии (PICU) при Общенациональном детском госпитале. Перед генной терапией проводили биопсию мышц при скрининговом визите. Субъекты будут подвергаться второй биопсии мышц для определения того, обеспечил ли ген восполнение дефицита белка дистрофина через 90 дней после доставки. После переноса генов осуществляли тщательный мониторинг пациентов в отношении любых побочных эффектов лечения. Данный мониторинг включал тесты крови и мочи, а также физический осмотр во время скрининговых визитов в дни 0, 1, 7, 14, 30, 60, 90 и 180 и месяцы 9, 12, 18, 24, 30 и 36, чтобы удостовериться в отсутствии побочных эффектов, обусловленных инъекцией гена.

[00157] Субъекты из когорты А (n=6) были в возрасте от 3 месяцев до 3 лет и получали внутривенно вектор rAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin ( $2 \times 10^{14}$  г. в./кг в 10 мл/кг). За один день до переноса гена субъекты в когорте А начинали прием 1 мг/кг преднизона или дефлазакорта и продолжали прием в течение 30 дней при мониторинге иммунного ответа. При отрицательном результате в день 30 прием стероидов снижали в течение 1 недели. Если Т-клеточный ответ на AAV или микродистр. составлял  $>125$  SFC/106 PBMC, прием стероидов продолжали до падения уровней ниже данного порогового значения.

[00158] Субъекты из когорты В (n=6) были в возрасте от 4 лет до 7 лет и получали внутривенно вектор rAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin ( $2 \times 10^{14}$  г. в./кг в 10 мл/кг). Этим

субъектам продолжали давать стабильную дозу кортикостероидов в течение испытания, но ее могли повышать на короткое время, если Т-клеточный ответ на AAV или микродистрофин составлял  $>125$  SFC/106 PBMC.

### **Критерии отбора**

[00159] Далее приведены критерии включения в исследование.

Возраст для включения в исследование: когорта А: возраст от 3 месяцев до 7 лет; и когорта В: возраст от 4 до 7 лет включительно.

Выявление в результате определения молекулярных свойств гена DMD сдвига рамки (делеции или дупликации) или мутации, обуславливающей появление преждевременного стоп-кодона, в пределах экзонов 18-58.

Повышение уровня СК  $>1000$  Ед./л.

Для субъектов когорты А: результаты ниже среднего по шкале оценки моторики Бейли-III для крупной моторики, определенные как балл по шкале, составляющий  $\leq 9$ .

Для когорты В: результаты ниже среднего в тесте на время прохождения 100 метров, определенные как  $< 80\%$  от прогнозируемого значения.

Мужчины любой этнической группы.

Способность сотрудничать для теста оценки моторики.

Для субъектов когорты А: отсутствие предшествующего лечения кортикостероидами.

Для субъектов когорты В: эквивалент стабильной дозы кортикостероидов, принимаемых перорально, в течение по меньшей мере 12 недель до скрининга, и предполагается, что доза остается неизменной (за исключением модификаций для учета изменений в весе) в течение исследования.

[00160] Далее приведены критерии исключения из исследования.

Наличие активной вирусной инфекции исходя из клинических наблюдений.

Признаки кардиомиопатии, включая эхокардиограмму с фракцией выброса ниже 40%.

Серологические доказательства наличия ВИЧ-инфекции или инфекции гепатита В или С.

Диагностированное (или в отношении которого осуществляют лечение в данный момент) аутоиммунное заболевание.

Отклонения значений лабораторных исследований от нормы, которые считаются клинически значимыми.

Сопутствующее заболевание или необходимость длительного лечения с помощью лекарственных средств, которые, по мнению главного исследователя, создают ненужные риски при переносе генов.

Субъекты с титрами антител к AAVrh74 или AAV8  $> 1:400$ , определенными с помощью иммунологического анализа ELISA.

Медицинское состояние или уважительное обстоятельство, которые, по мнению исследователя, могут стать причиной неспособности субъекта выполнить требуемые



согласно протоколу тесты или процедуры или оказать отрицательное влияние на самочувствие субъекта, безопасность субъекта или клиническую интерпретируемость.

Тяжелая инфекция (например, пневмония, пиелонефрит или менингит) в течение 4 недель перед визитом для переноса гена (включение в исследование может быть отложено).

Прием любых экспериментальных лекарственных препаратов (отличных от кортикостероидов) или лекарственных препаратов, обеспечивающих пропускание экзона (включая ExonDys 51®), в рамках эксперимента или при других обстоятельствах в последние 6 месяцев до скрининга для данного исследования.

Прохождение любого типа генной терапии, клеточной терапии (например, трансплантации стволовых клеток) или терапии на основе CRISPR/Cas9.

Семья не хочет раскрывать информацию об участии пациента в исследовании участковому терапевту и другим субъектам предоставления медицинских услуг.

### **Критерии эффективности**

[00161] Первичный критерий эффективности представлял собой показатель безопасности, рассчитывающийся на основе числа участников с нежелательными явлениями (интервал времени: 3 года). Осуществляли мониторинг побочных эффектов и оценку их тяжести и связи с предметом исследования.

[00162] Далее приведены вторичные критерии эффективности.

[00163] Балл по шкале подтеста оценки крупной моторики (Бейли-III) (интервал времени: скрининг, день 30-3 года). С помощью балла по шкале оценки крупной моторики измеряла развитие моторики. Балл по шкале подтеста оценки крупной моторики (Бейли-III) присваивали для когорты А при каждом визите в рамках последующего наблюдения, начиная с дня 30 на протяжении 3 лет. Для каждого субъекта возрастом 43-47 месяцев включительно на момент скрининга сравнивали рассчитанную оценку по шкале с нормативными данными для детей возрастом 42 месяца. В шкале Бейли-III предоставлены нормативные данные для детей, возрастом 1-42 месяца.

[00164] Оценки терапии по физическим показателям: тест на время прохождения 100 метров (100 м) (интервал времени: скрининг, день 30-3 года). Для когорты В первичным критерием эффективности в отношении моторики являлся тест на 100 м. Тест на время прохождения 100 метров являлся исследуемым критерием эффективности, который для когорты А начинали применять, как только ребенок достигал возраста 3 года.

[00165] Оценки терапии по физическим показателям: система амбулаторной оценки North Star (NSAA) (интервал времени: скрининг, день 30-3 года). система амбулаторной оценки North Star (NSAA) представляла собой исследуемый критерий эффективности, который для когорты А начинали применять, как только ребенок достигал четырехлетнего возраста, и для когорты В. С помощью NSAA измеряют качество самостоятельного передвижения у мальчиков с мышечной дистрофией Дюшенна.

[00166] Оценки терапии по физическим показателям: тест со вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени, модифицированному для детей (TUG) (интервал времени:

скрининг, день 30-3 года): Исследуемые критерии эффективности для когорты В включали тест с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени, модифицированный для детей (TUG).

[00167] Оценки терапии по физическим показателям: подъем и спуск на 4 ступеньки (интервал времени: скрининг, день 30-3 года): Исследуемые критерии эффективности для когорты В будут включать подъем и спуск на 4 ступеньки.

[00168] Оценки терапии по физическим показателям: ручная динамометрия (ННД) (интервал времени: скрининг, день 30-3 года): Исследуемые критерии эффективности для когорты В включали ручную динамометрию (ННД) для мышц-разгибателей колен, и мышц-сгибателей колен, и мышц-разгибателей локтей, и мышц-сгибателей локтей.

[00169] Количественное определение экспрессии гена микродистрофина с помощью иммунофлуоресценции (интервал времени: скрининг, день 90). Было проведено количественное определение уровней экспрессии гена микродистрофина с помощью иммунофлуоресценции и сравнение в биоптатах мышц до и после.

[00170] Количественное определение экспрессии гена микродистрофина с помощью вестерн-блота (интервал времени: скрининг, день 90). Было проведено количественное определение уровней экспрессии гена микродистрофина с помощью вестерн-блот-анализа и сравнение в биоптатах мышц до и после.

[00171] Снижение уровня СК после генной терапии (интервал времени: 3 года). Снижение уровней СК в циркулирующей крови.

[00172] Магнитная резонансная томография сердца (через 1 год).

### **Экспрессия гена микродистрофина**

[00173] Анализировали и количественно оценивали изменение от исходного уровня экспрессии микродистрофина посредством измерения интенсивности иммунофлуоресценции (IF) волокон. Как показано на фигуре 7, для субъекта 1 (5 лет) продемонстрирована экспрессия белка микродистрофина на уровне 78% в мышечных волокнах биоптата икроножной мышцы после введения rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin, для субъекта 2 (4 года) продемонстрирована экспрессия белка микродистрофина на уровне 73,5% в мышечных волокнах биоптата икроножной мышцы после введения rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin, и для субъекта 3 (6 лет) продемонстрирована экспрессия белка микродистрофина на уровне 77,0% в мышечных волокнах биоптата икроножной мышцы после введения rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin. Для субъекта 4 (4 года) была продемонстрирована экспрессия микродистрофина на уровне 96,2% в мышечных волокнах биоптата икроножной мышцы после введения rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin. Для всех пациентов была показана устойчивая экспрессия трансдуцированного микродистрофина, который должным образом локализовался в саркомере мышцы, как было измерено с помощью иммуногистохимического анализа. Средний уровень экспрессии гена, измеренный с помощью определения процентной доли волокон, положительных по микродистрофину, составлял 76,2%, и среднее значение интенсивности для волокон составляло 74,5% по

сравнению с нормальным контролем.

Субъект	Среднее значение интенсивности	Процентная доля волокон, положительных по дистрофину
1	82,0%	78,0%
2	59,0%	73,5%
3	83,0%	77,0%
4	160,0%	96,2%
Среднее значение	96,0%	81,2%

[00174] Изменение уровня экспрессии гена микродистрофина от исходного уровня до дня 60 также оценивали с помощью количественной оценки уровня экспрессии белка микродистрофина, измеренного с помощью вестерн-блота в биоптате мышечной ткани. Как показано на фигурах 8А и 8В, с помощью вестерн-блот-анализа определили уровень экспрессии белка микродистрофина у субъекта 1 (5 лет), субъекта 2 (4 года) и субъекта 3 (6 лет). На фигуре 8С представлено определение с помощью вестерн-блот-анализа уровня экспрессии белка микродистрофина у субъекта 4 (4 года). Для всех биоптатах после лечения были показаны устойчивые уровни микродистрофина, измеренные с помощью вестерн-блота, при этом среднее значение для субъектов 1-4, составляло 74,3 по сравнению с нормой при применении способа 1, и 95,8% по сравнению с нормой в соответствии со способом 2, который позволяет делать поправку на жировую и фиброзную ткань.

[00175] Для каждого субъекта измеряли количество копий генома вектора на ядро мышечных волокон. Как показано в таблице 2, количество копий генома вектора на ядро составляло более 1 для каждого из субъектов после введения rAAVrh74.MHCK7.microdystrophin. Одна копия вектора указывает на то, что уровень экспрессии гена микродистрофина составляет примерно 50%. В результате измерения у субъектов 1-3 было получено среднее значение 1,6 копии вектора на ядро клетки, что согласуется с наблюдаемыми высокими уровнями экспрессии микродистрофина. Когда были включены значения для субъекта 4, среднее значение количества копий вектора/мкг ДНК составило  $>10^5$ , при этом среднее значение количества копий вектора на ядро клетки составило 3,3.

**Таблица 2**

Субъект	Количество копий вектора/мкг ДНК	Количество копий на ядро
1	$>10^5$	1,7
2	$>10^5$	1,3
3	$>10^5$	1,9

[00176] Уровни белка альфа-саркогликана и бета-саркогликана в биоптатах мышечной ткани измеряли с помощью иммуногистохимического анализа до и после введения rAAVrh74.MHCK7.microdystrophin. Введение rAAVrh74.MHCK7 также приводило к активации белков DAPC у субъектов. Как показано на фигуре 9, уровень экспрессии альфа-саркогликана и бета-саркогликана в ткани биоптата мышц был повышен по сравнению с уровнем этих белков в биоптатах мышц до введения rAAVrh74.MHCK7 у субъекта 1 (фиг. 9А), субъекта 2 (фиг. 9В) и субъекта 3 (фиг. 9С).

### Уровни СК в сыворотке циркулирующей крови

[00177] Образцы крови получали каждые 30 дней после введения внутривенно инфузии вектора гAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin ( $2 \times 10^{14}$  г. в./кг в 10 мл/кг). Уровни СК измеряли при каждом визите и сравнивали с исходным уровнем, измеренным до введения гAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin (визит в день 0). Исходные уровни СК в сыворотке крови (единиц/литр) приведены в таблице 3 ниже. Как показано на фигуре 10, уровень СК в сыворотке циркулирующей крови снизился на приблизительно 87% через 2 месяца после введения гAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin. Для всех субъектов было показано значительное снижение уровней креатинкиназы (СК) в сыворотке крови, при этом среднее значение снижения уровня СК составляло более 87% через 2 месяца после лечения (n=3). СК представляет собой фермент, ассоциированный с повреждением мышц, и у пациентов с DMD равномерно распространены высокие уровни СК. Действительно, в значительной степени повышенный уровень СК часто применяют в качестве инструмента для предварительной диагностики DMD, после которой затем проводят подтверждающее генетическое испытание.

[00178] В таблице 4 и фигуре 10 представлены уровни СК для каждого субъекта. На фигуре 11 представлены средние значения уровней СК в зависимости от времени и продемонстрировано, что средние значения уровней СК в значительной степени снижаются с течением времени после введения гAAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin. Среднее значение исходного уровня СК, составляющее 27,064 Ед./л (среднее значение для таблицы 3) снижается на приблизительно 63% до среднего значения, составляющего 9,982 Ед./л (среднее значение, день 270, таблица 4).

**Таблица 3**

Субъект	Возраст (лет)	Уровни СК на исходном уровне, единиц/литр (Ед./л)
1	5	<b>206912062069191</b>
2	4	23414
3	6	34942
4	4	29210

**Таблица 4: Изменение уровней СК от исходного уровня до дня 270**

Субъект	Исходный уровень	День 30	День 60	День 90	День 180	День 270	День 360
1	20691	-	2984	2444	18476	6317	-
2	23414	10427	4283	41920	6209	10494	-
3	34942	10430	2966	2546	9650	18855	6410
4	29210	7215	908	1382	2580	4262	-

### Оценка эффективности

[00179] В дополнение к уровням микродистрофина и СК, эффективность измеряли с помощью следующих функциональных тестов: подъем с пола на время, подъем на 4 ступеньки, система амбулаторной оценки North Star (NSAA), тест на время подъема, тест на подъем на 4 ступеньки, тест на время прохождения 10 метров (10 м) и тест на время прохождения 100 метров (100 м). Данные представлены в таблицах 5 и 6 ниже, и эти

данные демонстрируют стабильное долговременное улучшение через 9 месяцев после введения rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin. Улучшение в отношении NSAA с течением времени также представлено на фигуре 12.

**Таблица 5. Изменение значения NSAA от исходного уровня до дня 270**

Субъект	Исходный уровень	День 30	День 60	День 90	День 180	День 270	Изменение от исходного уровня
1	18	22	24	23	25	26	8
2	19	21	23	25	27	27	8
3	26	28	28	30	30	28	2
4	19	20	20	25	25	27	8
Среднее значение улучшения	20,5	22,75	23,75	25,75	26,75	27	6,5

**Таблица 6. Изменение от исходного уровня до дня 270**

Субъект	Оценка	NSAA	Время подъема	Подъем на 4 ступеньки	100 м (сек.)	10 м
1	Исходный уровень	18	3,7	3,4	49,3	5,1
	День 270	26	3,0	2,3	43,2	4,3
2	Исходный уровень	19	3,0	3,8	49,9	4,3
	День 180	27	3,7	2,6	48,6	3,9
	День 270	27	3,3	2,7	50,3	
3	Исходный уровень	26	3,9	1,9	59,3	4,7
	День 180	30	3,4	1,8	48,4	4,1
	День 270	28	2,8	1,9	50,7	
4	Исходный уровень	19	4,1	4,8	67,2	5,4
	День 90	25	2,3	2,2	50,7	4,4
	День 270	27	2,4	2,2	49,7	
Среднее значение	Изменение от исходного уровня	Улучшение на 6,5 баллов	Улучшение на 0,8 сек.	Улучшение на 1,2 сек.	Улучшение на 7,95 сек.	Улучшение на 14%

### **Оценка безопасности**

[00180] В исследовании не наблюдали серьезных нежелательных явлений (SAE). Три субъекта имели повышенный уровень гамма-глутамилтрансферазы (GGT), который был устранен с помощью повышения уровня стероидов в течение недели и вернулся к исходному уровню. Не было обнаружено других клинически значимых результатов лабораторных исследований. Пациенты испытывали временную тошноту в основном во время первой недели терапии, совпадающую с введением повышенной дозы стероидов. Это не коррелировало с повышением уровней фермента печени или каким-либо другим

отклонением.

### **Пример 3**

#### **Фаза I/IIa рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического испытания системной доставки гена**

[00181] Это рандомизированное двойное слепое испытание с однократной дозой с применением rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin для субъектов с DMD. Исследование включает двадцать четыре субъекта в возрасте от 4 до 7 лет. Субъекты рандомизированы для лечения или приема плацебо во время включения в исследование. Двенадцати субъектам внутривенно вводили вектор rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin ( $2 \times 10^{14}$  г. в./кг в примерно 10 мл/кг) и двенадцати субъектам вводили 10 мл/кг плацебо (растворы Рингера с лактатом). Субъекты, получающие плацебо, будут подключены к лечению, которое будут осуществлять таким же образом, как и для 12 ранее подвергавшихся лечению субъектов, через один год после того, как последнему субъекту, подвергавшемуся лечению, будет введена доза. Субъекты получают инфузии rAAV, несущего микродистрофин, или растворы Рингера с лактатом в течение примерно 1 часа. Пункционную биопсию мышц из икроножных мышц осуществляют до и после лечения (день 90).

[00182] Основной целью данного исследования является оценка безопасности внутривенного введения rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin для субъектов с DMD через периферическую вену конечности. Конечные точки безопасности оценивают с помощью изменений в общем анализе крови, химическом составе сыворотки, анализе мочи, иммунологическом ответе на rAAVrh74 и микродистрофин и зарегистрированной истории болезни и наблюдений за симптомами. Экспрессия гена дистрофина служит в качестве первичного критерия эффективности, наряду с безопасностью. Количественное определение осуществляют с применением валидированных анализов на основе иммунофлуоресценции и иммуноблоттинга. Снижение уровней СК после генной терапии служит в качестве вторичного критерия эффективности. Эффективность измеряют с помощью следующих функциональных тестов: подъем на время, подъем на 4 ступеньки, система амбулаторной оценки North Star (NSAA), тест на время прохождения 10 метров (10 м), тест на время прохождения 100 метров (100 м). Исследуемые показатели включают ручную динамометрию (ННД) для мышц-разгибателей колен, и мышц-сгибателей колен, и мышц-разгибателей локтей, и мышц-сгибателей локтей.

[00183] Далее приведены критерии включения в исследование.

Возраст включения в исследование: от 4 до 7 лет включительно.

Выявление в результате определения молекулярных свойств гена DMD сдвига рамки (делеции или дупликации) или мутации, обуславливающей появление преждевременного стоп-кодона, в пределах экзонов 18-58.

Признаки симптоматической мышечной дистрофии: повышение уровня СК  $>1000$  Ед./л и показатель ниже среднего процента прогнозируемого времени в тесте на прохождение 100 метров.

Удовлетворяют требованиям мужчины любой этнической группы.

Способность сотрудничать для теста оценки моторики.

Эквивалент стабильной дозы кортикостероидов, принимаемых перорально, в течение по меньшей мере 12 недель до скрининга, и предполагается, что доза остается неизменной (за исключением возможных модификаций для учета изменений в весе) в течение исследования.

[00184] Далее приведены критерии исключения из исследования.

Наличие активной вирусной инфекции исходя из клинических наблюдений.

Признаки кардиомиопатии, включая эхокардиограмму с фракцией выброса ниже 40%.

Серологические доказательства наличия ВИЧ-инфекции или инфекции гепатита В или С.

Диагностированное (или в отношении которого осуществляют лечение в данный момент) аутоиммунное заболевание.

Отклонения значений лабораторных исследований от нормы, которые считаются клинически значимыми ( $GGT > 3XULN$ , билирубин  $\geq 3,0$  мг/дл, креатинин  $\geq 1,8$  мг/дл, гемоглобин  $< 8$  или  $> 18$  г/дл;  $WBC > 18500$  на куб. мм), тромбоциты  $\leq 50,000$ .

Сопутствующее заболевание или необходимость длительного лечения с помощью лекарственных средств, которые, по мнению главного исследователя, создают ненужные риски при переносе генов.

Субъекты с титрами антител к AAVrh74 или AAV8  $> 1:400$ , определенными с помощью иммунологического анализа ELISA. Если титр в конечной точке является положительным при скрининге, то испытание могут повторить перед исключением.

Наличие медицинского состояния или уважительного обстоятельства, которые, по мнению исследователя, могут стать причиной неспособности субъекта выполнить требующиеся согласно протоколу тесты или процедуры или оказать отрицательное влияние на самочувствие субъекта, безопасность субъекта или клиническую интерпретируемость.

Тяжелая инфекция (например, пневмония, пиелонефрит или менингит) в течение 4 недель перед визитом для переноса гена (включение в исследование может быть отложено).

Прием любых экспериментальных лекарственных препаратов (отличных от кортикостероидов) или лекарственных препаратов, обеспечивающих пропускание экзона (включая ExonDys 51®) в рамках эксперимента или при других обстоятельствах в последние 6 месяцев до скрининга для данного исследования.

Прохождение любого типа генной терапии, клеточной терапии (например, трансплантации стволовых клеток) или терапии на основе CRISPR/Cas9.

Семья не хочет раскрывать информацию об участии пациента в исследовании участковому терапевту и другим субъектам предоставления медицинских услуг.

### **Оценка эффективности**

[00185] Экспрессия гена дистрофина служит в качестве первичного критерия эффективности, наряду с безопасностью. Количественное определение осуществляют с применением валидированных анализов на основе иммунофлуоресценции и иммуноблоттинга. Снижение уровней СК после генной терапии служит в качестве вторичного критерия эффективности. Кроме того, эффективность измеряют с помощью следующих функциональных тестов: подъем с пола на время, подъем на 4 ступеньки, система амбулаторной оценки North Star (NSAA), тест на время прохождения 10 метров (10 м), тест на время прохождения 100 метров (100 м). Исследуемые показатели включают ручную динамометрию (ННД) для мышц-разгибателей колен, и мышц-сгибателей колен, и мышц-разгибателей локтей, и мышц-сгибателей локтей.

[00186] Применяют биопсию мышц под ультразвуковым контролем для количественной оценки экспрессии трансгена в день 90 по сравнению с исходным уровнем. Биопсии осуществляют на той же мышце, на которой и исходную биопсию, но на противоположной ноге. Через один год после того, как всем субъектам были введены дозы, участники, получающие плацебо в перекрестном режиме, возобновят график исследования при визите 1. Субъекты, получающие плацебо, не будут подвергаться следующим процедурам при втором скрининге исходного уровня: МРТ сердца и биопсия мышц. Субъекты, получающие плацебо, подвергаются биопсии мышц в день 90 (всего 3 биопсии мышц). Замороженные срезы окрашиваются на дистрофин с применением метода непрямой иммунофлуоресценции (IF). Проводят полное сканирование предметных стекол и интенсивность для микродистрофина и процент положительных волокон количественно определяют с применением валидированного сканирования изображений и алгоритма анализа MuscleMap™. Морфометрию мышц осуществляют с маскированием данных, включая гистограммы размеров волокон. Замаскированные замороженные срезы биоптатов мышц применяют для осуществления количественного анализа белка на микродистрофин с применением валидированного способа на основе вестерн-блота.

[00187] Пункционные биоптаты мышц икроножной мышцы (если это не является противопоказанием для конкретного субъекта по мнению главного исследователя, в случае чего главный исследователь выбирает альтернативную мышцу для биопсии) применяют для количественной оценки экспрессии микродистрофина.

#### **Анализ для определения эффективности**

[00188] Первичная конечная точка эффективности представляет собой изменение от исходного уровня до дня 90 количественного показателя экспрессии белка микродистрофина, измеренного с помощью вестерн-блота биоптата мышечной ткани. Различия в группах лечения в отношении конечной точки первичной эффективности оценивают с помощью модели ковариационного анализа (ANCOVA) с видом лечения в качестве фиксированного фактора и значением исходного уровня в качестве ковариаты. Тест суммы рангов Уилкоксона проводят в качестве дополнительного анализа. Аналогично анализируют изменение от исходного уровня экспрессии микродистрофина посредством измерения интенсивности иммунофлуоресценции (IF) волокон.



[00189] Дополнительные конечные точки эффективности включают изменение от исходного уровня до каждой запланированной оценки, такой как подъем с пола на время, подъем на 4 ступеньки, тест на время прохождения 10 метров (10 м), тест на время прохождения 100 метров (100 м) и изменение уровня СК. Исследуемые показатели включают ННД для мышц-разгибателей колен, и мышц-сгибателей колен, и мышц-разгибателей локтей, и мышц-сгибателей локтей. Различия в группах лечения оценивают с помощью модели ANCOVA с видом лечения в качестве фиксированного фактора и значением исходного уровня в качестве ковариаты. Тест суммы рангов Уилкоксона проводят в качестве дополнительного анализа.

#### **Пример 4**

Испытания и исследования, описанные в примерах 2 и 3 выше, в качестве альтернативы осуществляют с применением конструкции rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin, представленной под SEQ ID NO: 9; представленной под SEQ ID NO: 8, с нуклеотидами 1-4977; или представленную под SEQ ID NO: 6; с нуклеотидами 56-5022.

#### **Пример 5**

##### **Получение конструкции pAAV.MCK.micro-dystrophin**

[0001] Плазмида, содержащая pAAV.MCK.micro-dystrophin, была сконструирована с помощью вставки кассеты, экспрессирующей MCK, управляющей кодон-оптимизированной последовательностью cDNA микродистрофина человека, в клонирующий вектор AAV psub201 (Samulski et al., J. Virol. 61(10):3096-3101). Специфичный в отношении мышц регуляторный элемент был включен в конструкцию для управления специфичной в отношении мышц экспрессией гена. Данный регуляторный элемент содержал основной энхансер MCK мышцы (206 п. о.), слитый с 351 п. о. основного промотора MCK (проксимально). После основного промотора конструкция содержит эндогенный экзон 1 MCK мышцы (нетранслируемый) размером 53 п. о. для эффективной инициации транскрипции, после которого следуют сигналы сплайсинга поздних 16S/19S SV40 (97 п. о.) и малая 5'-UTR (61 п. о.). Интрон и 5'-UTR получены из плазмиды pCMV $\beta$  (Clontech). Кассета микродистрофина содержит консенсусную последовательность Козак непосредственно напротив старт-кодона ATG и небольшой, размером 53 п. о., синтетический сигнал поли-А для терминации mRNA. Кассета микродистрофина человека, содержит домены (R4-R23/ $\Delta$ 71-78), как ранее описано в Harper et al. Nat. Med. 8(3):253-61, 2002.

[0002] Плазмида pAAV.MCK.micro-dystrophin содержит cDNA-кассету экспрессии микродистрофина человека, фланкированную последовательностями инвертированного концевого повтора (ITR) AAV2 (см. фиг. 5). Именно эта последовательность была инкапсулирована в вирионы AAVrh.74. Молекулярный клон серотипа AAVrh.74 был клонирован из лимфатического узла макака резуса и описан в Rodino-Klapac et al. Journal of Tran. Med. 45 (2007).

#### **ССЫЛКИ НА ЛИТЕРАТУРУ**

1. Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr. & Kunkel, L.M. Dystrophin: the protein product of

the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919-928 (1987).

2. Straub, V. & Campbell, K.P. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* **10**, 168-175 (1997).

3. Sacco, A., et al. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* **143**, 1059-1071 (2010).

4. Wallace, G.Q. & McNally, E.M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* **71**, 37-57 (2009).

5. Zhou, L. & Lu, H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 771-776 (2010).

6. Desguerre, I., et al. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 762-773 (2009).

7. DiPrimio, N., McPhee, S.W. & Samulski, R.J. Adeno-associated virus for the treatment of muscle diseases: toward clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 553-560 (2010).

8. Mendell, J.R., et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol* **68**, 629-638 (2010).

9. Mendell, J.R., et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* **66**, 290-297 (2009).

10. Mendell, J.R., et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **23**, 192-201 (2015).

11. Carnwath, J.W. & Shotton, D.M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* **80**, 39-54 (1987).

12. Coulton, G.R., Morgan, J.E., Partridge, T.A. & Sloper, J.C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **14**, 53-70 (1988).

13. Cullen, M.J. & Jaros, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* **77**, 69-81 (1988).

14. Dupont-Versteegden, E.E. & McCarter, R.J. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* **15**, 1105-1110 (1992).

15. Stedman, H.H., et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **352**, 536-539 (1991).

16. Deconinck, A.E., et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 717-727 (1997).

17. Grady, R.M., et al. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 729-738 (1997).

18. Love, D.R., et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to

dystrophin. *Nature* **339**, 55-58 (1989).

19. Tinsley, J.M., et al. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591-593 (1992).

20. Tinsley, J., et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* **4**, 1441-1444 (1998).

21. Squire, S., et al. Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet* **11**, 3333-3344 (2002).

22. Rafael, J.A., Tinsley, J.M., Potter, A.C., Deconinck, A.E. & Davies, K.E. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* **19**, 79-82 (1998).

23. Zhou, L., et al. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J Neurol Sci* **264**, 106-111 (2008).

24. Gutpell, K.M., Hrinivich, W.T. & Hoffman, L.M. Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn+/- Mouse Validates Its Suitability as a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PloS one* **10**, e0117306 (2015).

25. Rodino-Klapac, L.R., et al. Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Human molecular genetics* **22**, 4929-4937 (2013).

26. Nevo, Y., et al. The Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), decreases fibrosis and improves muscle strength in dy/dy mouse model of muscular dystrophy. *PloS one* **6**, e18049 (2011).

27. Rodino-Klapac, L.R., 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* **5**, 45 (2007).

28. Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Ittleman, F., Blanchard, E.M. & Alpert, N.R. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* **65**, 1441-1449 (1989).

29. Rodino-Klapac, L.R., et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 109-117 (2010).

30. Grose, W.E., et al. Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. *PloS one* **7**, e39233 (2012).

31. Liu, M., et al. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* **11**, 245-256 (2005).

32. Harper, S.Q., et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nature medicine* **8**, 253-261 (2002).

33. Rodino-Klapac, L.R., et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* **18**, 109-117 (2010).

34. Salva, M.Z., et al. Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. *Mol Ther* **15**, 320-329 (2007).

35. Sondergaard, P.C., et al. AAV.Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Annals of clinical and translational neurology* **2**, 256-270 (2015).

36. De, B.P., et al. High levels of persistent expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10 adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses. *Mol Ther* **13**, 67-76 (2006).

37. Rodino-Klapac, L.R., 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. *Journal of translational medicine* **5**, 45 (2007).

38. Bulfield et al., X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; **81**(4): 1189-1192.

39. Sicinski et al., The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. 1989 **30**;244(4912):1578-80

### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> РЕСЕРЧ ИНСТИТЬЮТ ЭТ НЭШНВАЙД ЧИЛДРЕНС ХОСПИТАЛ

<120> ДОСТАВКА СПЕЦИФИЧНОГО ДЛЯ МЫШЦ МИКРОДИСТРОФИНА С ПОМОЩЬЮ ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

<130> 28335/53169

<160> 9

<170> версия PatentIn 3,5

<210> 1

<211> 3579

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca gaagaagact 60
tttaccaaagt gggatgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat cgagaatctg 120
ttttccgacc tgcaggatgg gagacggcgt ctggatctgc tggaaggact gactggccag 180
aagctgcccc aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaactg gaacaaagct 240
ctgagagtgc tgcagaacaa caactggat ctggtgaata ttggcagtac tgatctctg 300
gacgggaacc acaaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca ctggcagggtg 360
aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga gaagatcctg 420
ctgtcttggg tgcggcagag caccgcgaac tatccccagg tgaactgat taacttcaact 480
acatcctgga gcgacgggct ggcctgaat gctctgattc acagccacag gctgatctg 540
ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga acatgccttc 600
aatatcgtc ggtaccagct ggggatcga aaactgctgg acccagagga tgtggacact 660
acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gctgttcca ggtgctgcca 720
cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaatgc tgccccgccc ccccaaagtg 780
actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca gattaccgtg 840

```

agcctggctc agggatfatga ggcaccagt agtccaaaac cacggttcaa gtctacgct 900  
 tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gacctacta gatccccctt tccatcccag 960  
 cacctggagg cccagagga caagagcttt gggfccagcc tgatggaaag cgaggtgaat 1020  
 ctggatcggg accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag tgctgaagac 1080  
 aactgcagg cccagggcga aattccaat gacgtggaag tggtaagga tcagtccac 1140  
 acacacgagg gctatfatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg caatacctg 1200  
 cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacagga aacagaagtg 1260  
 caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgc tgagagtggc tagtatggag 1320  
 aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact gaaagagctg 1380  
 aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga gccactggga 1440  
 cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca ggaggatctg 1500  
 gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatfatgg tgggtgggt ggacgaatct 1560  
 agtggagatc acgccaccgc cgcctggag gaacagctga aggtgctggg ggaccgggtg 1620  
 gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat cctgctgaaa 1680  
 tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtctt ggctgagcga gaaagaggac 1740  
 gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct gcttagcctg 1800  
 cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat gggcaaacctg 1860  
 tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac ccagaagaca 1920  
 gaagcctggc tggataactt tccccctgc tgggacaacc tggtcagaa actggagaaa 1980  
 agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaaccagc ctagectgac ccagacaacc 2040  
 gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tctggtgaa acatgccag 2100  
 gaagagctgc cacctccacc tcccagaag aagagaacct tggagcggct gcaggagctg 2160  
 caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat taaggggtct 2220  
 tggcagcctg tggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga aaaggtgaag 2280  
 gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaactgta gtcattgaa cgatctggct 2340  
 agacagctga caaactggg catccagctg agccataca atctgagcac actggaggac 2400  
 ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg gcagctgcat 2460  
 gaggcccatc gcgactcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc cgtgcagggg 2520  
 cctggggaga gggccattc tcccacaag gtgccctact atattaatca cgagaccag 2580  
 accactgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc cgatctgaa 2640  
 aacgtgaggt ttagecctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca gaagccctg 2700  
 tgctggatc tgctgtccct gtccgcccc tgcgatgcc tggatcagca taatctgaag 2760  
 cagaacgac agccaatgga tctctgcag atcatcaact gctgaccac tatctacgac 2820  
 aggtggagc aggagcacia caacctggg aacgtgcctc tgtgcgtgga tatgtcctg 2880  
 aactggctgc tgaactgta tgactggg cgcaccggcc gcatcagagt gctgagttt 2940  
 aaaactggga ttatccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag gtacctgtc 3000  
 aagcaggtg ctatgacac tggattttg gaccagccc gctgggact gctgctgcat 3060  
 gatagatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gttcggagg atctaacac 3120  
 gaaccagcg tgcagctg tttcagttt gccataaca aacctgaaat cgaggtgct 3180  
 ctgttctgg attgatgag cctggaacca cagagcatgg tgggctgcc tgtgctgac 3240

agagtggctg cgcgcaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg caaggaatgt 3300  
cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat ttgccagagc 3360  
tgctctttt cgggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat ggtggaatat 3420  
tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct gaagaataag 3480  
tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgatgg ggtatctgcc agtgcagaca 3540  
gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtga 3579

<210> 2

<211> 810

<212> ДНК

<213> Аденоассоциированный вирус

<400> 2

gtttaaaca gcttgcattg ctaagctaga ccttcagat taaaataac tgaggtgaag 60  
gcctgggtag gggaggtggt gtgagacgct cctgtctctc ctctatctgc ccatcgccc 120  
tttggggagg aggaatgtgc ccaaggacta aaaaaaggcc atggagccag aggggcgagg 180  
gcaacagacc ttcatgggc aaacctggg gcctgctgt ctatgatgcc cactacggg 240  
tctaggtgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgct ggttataatt 300  
aaccagaca tgtggtgcc cccccccc caaacctgc tgcctctaaa aataacctg 360  
tcctggtgg atccccgca tgcgaagatc ttcgaacaag gctgtggggg actgagggca 420  
ggctgtaaca ggcttggggg ccagggtta tacgtgctg ggactccaa agtattactg 480  
ttccatgtc cggcgaagg gccagctgc cccgccagc tagactcagc acttagttta 540  
ggaaccagtg agcaagtcag ccttggggc agccataca aggccatgg gctgggcaag 600  
ctgcacgctt ggttccgggg tggcacggt gccgggcaa cgagctgaaa gctcatctgc 660  
tctcaggggc cctccctgg ggacagccc tctggttag tcacacctg taggtctctc 720  
tatataacc aggggcacag gggtgcctt cattctacca ccacctccac agcacagaca 780  
gacactcagg agccagccag cggcgcgccc 810

<210> 3

<211> 8562

<212> ДНК

<213> Аденоассоциированный вирус

<400> 3

gccaatacg caaacgctt ctccccgcg gttggccgat tcattaatgc agctgcgcg 60  
tcgtcgtctc actgagccc cccgggcaa gcccgggcgt cgggcgacct ttggtcgccc 120  
ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca ctagggttc 180  
cttgtagtta atgattaacc cgcctgcta cttatctac tagccatgct cttagttta 240  
aacaagcttg catgtctaag ctgacctt cagattaaa ataactgagg taaggcctg 300  
ggtaggggag gtggtgtgag acgtcctgt ctctctcta tctgccatc ggccctttg 360  
ggaggaggaa tgtgccaag gactaaaaaa agccatgga gccagagggg cgagggcaac 420  
agaccttca tgggcaaac ttggggcctt gctgtctagc atgccccact acgggtctag 480  
gctgccatg taaggaggca aggcctgggg acaccgaga tgcctgttta taattaacc 540  
agacatgtg ctgccccccc ccccccaaca cctgctgct ctaaaaataa cctgtcct 600

ggtggatccc ctgcatgcga agatcttcga acaaggctgt gggggactga gggcaggctg 660  
 taacaggctt gggggccagg gcttatacgt gcctgggact cccaaagtat tactgttcca 720  
 tgttcccggc gaaggccag ctgtccccg ccagctagac tcagcactta gtttaggaac 780  
 cagtgagcaa gtcagccctt ggggcagccc atacaaggcc atggggctgg gcaagctgca 840  
 cgctgggctc cgggggtgggc acgggtcccg ggcaacgagc tgaagctca tctgcttca 900  
 ggggccccctc cctggggaca gccccctctg gctagtcaca cctgtaggc tctctatat 960  
 aaccaggggg cacaggggct gccctcattc taccaccacc tccacagcac agacagacac 1020  
 tcaggagcag ccagcggcgc gcccaggtaa gtttagctt tttgtcttt atttcaggtc 1080  
 ccggatccgg tgggtgtgca aatcaaagaa ctgctcctca gtggatgtg cctttacttc 1140  
 taggcctgta cggaagtgtt acttctgctc taaaagctgc ggaattgtac ccgcggcgc 1200  
 caccatgctg tgggtggagg aggtggagga ttgttatgaa agggaggacg tgcagaagaa 1260  
 gacttttacc aagtgggtga acgctcagtt cagcaaattt gggaagcagc acatcgagaa 1320  
 tctgtttcc gacctgcagg atgggagacg gctgctggat ctgctggaag gactgactgg 1380  
 ccagaagctg cccaaagaga aggggagcac tagggtgcac gccctgaaca acgtgaacaa 1440  
 agctctgaga gtgctgcaga acaacaactg ggatctggtg aatattggca gtactgat 1500  
 cgtggacggg aaccacaaac tgacactggg cctgatctgg aacattatc tgcactggca 1560  
 ggtgaaaaat gtgatgaaga acatcatggc cgggctgcag cagaccaatt ccgagaagat 1620  
 cctgctgtct tgggtgcggc agagcacccg caactatccc caggtgaacg tgattaactt 1680  
 cactacatcc tggagcagc ggctggcct gaatgctctg attcacagcc acaggcctga 1740  
 tctgttcgac tggaatagcg tgggtgcca gcagtctgcc acacagcgc tggaacatgc 1800  
 ctcaatate gctcgttacc agctggggat cgaaaaactg ctggaccagc aggatgtgga 1860  
 cactacatac ccagataaaa agtctattct gatgtacatt actagcctgt tccaggtgct 1920  
 gccacagcag gtgtctattg aagccattca ggaggtggaa atgctgccc gccccccaa 1980  
 agtgactaaa gaggagcatt ttcagctgca tcatcagatg cattacagcc agcagattac 2040  
 cgtgagcctg gctcagggat atgagcgcac cagtgtcca aaaccacggt tcaagtecta 2100  
 cgcttatacc caggctgct acgtgacaac tagcgacct actagatecc ctttccatc 2160  
 ccagcacctg gaggccccag aggacaagag ctttgggtcc agcctgatgg aaagcgaggt 2220  
 gaatctggat cggtaaccaga cagccctgga ggaggtgctg agctggctgc tgagtctga 2280  
 agacacactg caggcccagg gcgaaattc caatgacgtg gaagtgggtga aggatcagtt 2340  
 ccacacacac gagggtata tgatggacct gacagctcac caggggcgcg tgggcaatat 2400  
 cctgcagctg ggctctaaac tgatggcac cgggaaactg agtgaggacg aggaaacaga 2460  
 agtgcaggag cagatgaacc tgctgaacag ccgctgggag tctctgagag tggctagtat 2520  
 ggagaagcag tccaacctgc accgggtgct gatggacctg cagaaccaga aactgaaaga 2580  
 gctgaacgac tggctgacaa agactgagga acgcacaagg aagatggagg aggagccact 2640  
 gggaccgcac ctggaggatc tgaagagaca ggtgcagcag cataagggtc tgcaggagga 2700  
 tctggaacag gagcaggtgc ggtgaaactc cctgacacat atgggtgtgg tgggtgacga 2760  
 atctagtgga gatcaccca ccgccccct ggaggaacag ctgaaggtgc tgggggaccg 2820  
 gtgggccaac atttgccggt ggaccgagga caggtgggtg ctgctgcagg acatcctgct 2880  
 gaaatggcag aggctgaccg aggagcagtg tctgtttagt gcttggctga gcgagaaaga 2940  
 ggacccctg aacaagatcc acacaaccgg cttaaggat cagaacgaaa tgctgtctag 3000

cctgcagaaa ctggetgtgc tgaagcccga tctggagaaa aagaagcaga gcatgggcaa 3060  
 actgtatagc ctgaaacagg acctgctgag caccctgaag aacaagagcg tgaccagaa 3120  
 gacagaagcc tggctggata actttgcccc ctgctgggac aacctggtgc agaaactgga 3180  
 gaaaagtaca gctcagatct ctaggctgt gaccacaacc cagcctagcc tgaccagac 3240  
 aacctgatg gaaaccgtga ccaccgtgac aaccgcgaa cagatcctgg tgaacatgc 3300  
 ccaggaagag ctgccacctc cacctcccca gaagaagaga accctggagc ggctgcagga 3360  
 gctgcaggaa gccactgacg aactggacct gaagctgagg caggccgaag tgattaaggg 3420  
 gtcttggcag cctgtggcg atctgctgat tgattccctg caggaccacc tggaaaaggt 3480  
 gaaggtctg agaggcgaag ttgctccact gaaggagaac gtgagtcatg tgaacgatct 3540  
 ggctagacag ctgacaacac tgggcatcca gctgagccca tacaatctga gcactgga 3600  
 ggacctgaat accagtgga agctgctgca ggtggctgtg gaagaccggg tgcggcagct 3660  
 gcatgaggcc catcgcgact tcggaccagc cagccagcac ttctgagca catcctgca 3720  
 ggggccctgg gagaggcca ttctcccaa caagtgccc tactatatta atcacgagac 3780  
 ccagaccact tgttgggacc atcccaagat gacagaactg taccagtccc tggccgatct 3840  
 gaacaactg aggtttagcg ctacagaac cgctatgaag ctgagacggc tgcagaagc 3900  
 cctgtgctg gatctgctgt cctgtccgc cgctcgcat gccctggatc agcataatct 3960  
 gaagcagaac gatcagcaa tggatactct gcagatcacc aactgectga ccactatcta 4020  
 cgacaggctg gagcaggagc acaaacct ggtgaactg cctctgtgcg tggatatgtg 4080  
 cctgaactgg ctgctgaacg tctatgacac tgggcgcacc ggccggatca gactgctgag 4140  
 ttttaaaact gggattatct cctgtgtaa ggcccactg gaggacaagt acaggtacct 4200  
 gttcaagcag gtggetagta gcaactggatt ttgtgaccag cgccgctgg gactgctgct 4260  
 gcatgatagt atccagattc ctgacagct gggagaggtg gctagtctc gaggatctaa 4320  
 catcgaacc agcgtgca gctgttcca gtttcccaat acaaacctg aatcgagc 4380  
 tgctctgtc ctggattgga tgcgctgga accacagagc atggtgtgce tgcctgtgct 4440  
 gcacagagt gctgccgccc aaactgcaa gcaccaggct aatgcaaca tctgcaagga 4500  
 atgtccatt atcggttcc gctacaggag tctgaaacat ttaactacg atattgcca 4560  
 gagtgcctc tttccggaa gactggcaa aggacacaag atgcactacc ctatggtgga 4620  
 atattgacc ccaactacat ctggcgaaga tgtgcgcat ttgccaagg tgctgaagaa 4680  
 taagtctcgg actaagaggt acttcccaa gcacccccgc atgggtatc tgcagtgca 4740  
 gacagtctg gaaggagaca atatggagac cgatacaatg tgagcggccg caataaaga 4800  
 tctttatctt cattagatct gtgtgtgtg ttttgtgtg tctagagcat ggctacgtg 4860  
 ataagtagca tggcgggta atcattaact acaaggaacc cctagtgatg gagttggca 4920  
 ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggcg accaaaggtc gcccagccc 4980  
 cgggctttgc ccggcgggc tcagtgagcg agcagcgcg cagctggcgt aatagcgaag 5040  
 agccccgac cgatgcctc tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcga tggcgattcc 5100  
 gttgcaatgg ctggcggtaa tattgtctg gatattacca gcaaggcca tagtttgagt 5160  
 tcttactc agcgaagtga ttttactaat aatcaaaga gtattgcgac aacggtta 5220  
 ttgcgtgatg gacagactct ttactcgtt ggctcactg attataaaa cacttctcag 5280  
 gattctggcg taccgttct gtctaaatc ctttaacg gcctctgtt tagctcccgc 5340  
 tctgattcta acgaggaaag cacgttatac gtgctcgtca aagcaacct agtacgcc 5400



ctgtagecggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact 5460  
 tgccagegcc ctagegcccc ctccttctgc tttcttccct tctttcteg ccacgttctc 5520  
 cggtttccc cgtaagctc taaatcgggg gctcccctta gggttccgat ttagtcttt 5580  
 acggcacctc gacccccaaa aacttgatta gggatgatgt tcacgtagt ggccatcgcc 5640  
 ctgatagacg gttttctgc ctttgacgtt ggagtcacg ttcttaata gtggactctt 5700  
 gtccaaaact ggaacaacac tcaacctat ctcggctat tctttgatt tataaggat 5760  
 tttgccgatt tcggcctatt ggftaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 5820  
 ttttaacaaa atattaacgc ttacaattta aatatttgc tatacaatct tctgtttt 5880  
 ggggctttc tgattatcaa ccgggttaca tatgattgac atgctagtt tacgattacc 5940  
 gttcatcgat tctctgtt gctccagact ctcaggcaat gacctgatag cctttgtaga 6000  
 gacctctcaa aatagctac cctctccgc atgaattat cagctagaac ggttgaatat 6060  
 catattgatg gtgattgac tctctccgc cttctcacc cgtttgaate tttacctaca 6120  
 cactactcag gcattgcatt taaaatata gagggttcta aaaatttta tcttgcgtt 6180  
 gaaataaagg cttctcccgc aaaagtatta cagggtcata atgttttgg tacaaccgat 6240  
 ttagctttat gctctgagc tttattgct aattttgcta attcttgc tgcctgtat 6300  
 gatttattg atgttgaat cgctgatgc ggtatttct cctacgcat ctgtgcgga 6360  
 tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctctc tgatccgca tagttaagc 6420  
 agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgcctgacg ggcttctctg ctcccggcat 6480  
 ccgcttacag acaagctgt accgtctccg ggagctgcat gtgctagagg tttcacctg 6540  
 catcaccgaa acgcgcgaga cgaaaggccc tcgtgatac cctatttta taggtaatg 6600  
 tcatgataat aatggttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcgga 6660  
 ccctatttg tttatttct taaatacatt caaatatga tccgctcat agacaataac 6720  
 cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gatttcaa cattccctg 6780  
 tcgccctat tccctttt cggcatttt gcttctctgt tttgctcac ccagaaacgc 6840  
 tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 6900  
 atctcaacag cggtaaagat cttgagagt ttcgccccga agaactttt ccaatgatga 6960  
 gcactttta agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 7020  
 aactcgtctg ccgcatacac tattctcaga atgacttgg ttgagtactca ccagtcacag 7080  
 aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtctgccc ataaccatga 7140  
 gtgataaac tgcggccaac ttactctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 7200  
 ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgcttga tcgtgggaa ccggagctga 7260  
 atgaagccat accaaacgac gagegtgaca ccacgatgcc ttagcaatg gcaacaactg 7320  
 tgcgaaaact attactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaaaa ttaatagact 7380  
 ggatggagge ggataaagt gcaggaccac ttctgcctc ggccttccg gctggctgtg 7440  
 ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctc cggtatcatt gcagactgg 7500  
 ggccagatgg taagccctcc cgtatctgag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 7560  
 tggatgaacg aatagacag atcctgaga taggtgctc actgattaag cattgtaac 7620  
 tctcagacca agttactca tatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 7680  
 aaaggatcta ggtgaagat cttttgata atctcatgac caaaatccct taactgagt 7740  
 tttcttcca ctgagcgtca gacccctag aaaagatcaa aggatcttct tgatctctt 7800

tttttctgcg cgtaatctgc tgettcaaaa caaaaaaac accgctacca gcggtggttt 7860  
 gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 7920  
 agatacaaaa tactgttctt ctagtgtage cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 7980  
 tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tctgtttacc agtggctgct gccagtggcg 8040  
 ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg 8100  
 cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac 8160  
 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 8220  
 acaggtatcc ggtaagcggc agggctggaa caggagagcg cacgagggag ctccagggg 8280  
 gaaacgctg gtatctttat agtctgtcgc ggtttcgcca cctctgactt gacgctgat 8340  
 ttttgtgatg ctgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 8400  
 tacggttctt ggcccttttc tggccttttg ctacatgtt ctttctgcg ttatccctg 8460  
 attctgtgga taaccgtatt accgctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 8520  
 cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcgggaaga gc 8562

<210> 4

<211> 564

<212> ДНК

<213> Аденоассоциированный вирус

<400> 4

cagccactat gggcttaggc tgcccatgta aggaggcaag gcctggggac acccgagatg 60  
 cctggttata attaaccag acatgtggct gctcccccc cccaacacct gctgcctgag 120  
 cctcaccccc accccgggtc ctgggtctta ggctctgtac accatggagg agaagctcgc 180  
 tctaaaaata accctgtccc tgggtggctg tgggggactg agggcaggct gtaacaggct 240  
 tgggggccag ggcttatacg tgcttgggac tcccaaagta ttactgttcc atgttcccgg 300  
 cgaagggcca gctgtcccc gccagctaga ctcagcactt agtttaggaa ccagtgagca 360  
 agtcagccct tggggcagcc catacaagc catggggctg ggcaagctgc acgctgggt 420  
 ccggggtggg cacgggtccc gggcaacgag ctgaaagctc atctgctctc aggggccct 480  
 ccttggggac agccccctct ggctagtcac accctgtagg ctctctata taaccaggg 540  
 gcacaggggc tgccccggg tcac 564

<210> 5

<211> 8409

<212> ДНК

<213> Аденоассоциированный вирус

<400> 5

gcccatacg caaacgect ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60  
 ctgctcgtc cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttgctgcc 120  
 cggcctcagt gacgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180  
 cctttagtft aatgattaac ccgcatgct aattatctac gtagccatgt ctgacagcc 240  
 actatgggtc taggctgcc atgtaaggag gcaaggcctg gggacaccgc agatgcctgg 300  
 ttataaftaa cccagacatg tggtgtctcc cccccccaa cacctgctgc ctgagcctca 360  
 ccccccccc ggtgctggg tcttaggctc tgtacacat ggaggagaag ctgctctaa 420

aaataacct gtcctggtg ggctgtgggg gactgagggc aggctgtaac aggcttgggg 480  
gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact gttccatgtt cccggcgaag 540  
ggccagctgt cccccgccag ctgactcag cacttagttt aggaaccagt gagcaagtca 600  
gcccctgggg cagcccatc aaggccatgg ggctgggcaa gctgcacgcc tgggtccggg 660  
gtgggacagg tgccgggca acgagctgaa agctcatctg ctctcagggg cccctcctg 720  
gggacagccc ctctggcta gtcacacct gtaggtctct ctatataacc caggggcaca 780  
ggggctgcc cgggtcacc accacctcca cagcacagac agacactcag gagccagcca 840  
gccaggtlaag tttagtcttt ttgtcttta ttccaggtcc cggatccggt ggtggtgcaa 900  
atcaaagaac tctctcag tggatgtgc ctttacttct aggcctgtac ggaagtgtta 960  
cttctgctt aaaagctgcg gaattgtacc cgcggccgcc accatgctgt ggtgggagga 1020  
ggtggaggat tgttatgaaa gggaggacgt gcagaagaag acttttacc agtgggtgaa 1080  
cgctcagtc agcaatttg ggaagcagca catcgagaat ctgtttccg acctgcagga 1140  
tgggagacgg ctgctggatc tgctggaagg actgactgc cagaagctgc ccaaagagaa 1200  
ggggagcact aggtgcacg cctgaacaa cgtgaacaaa gctctgagag tctgcagaa 1260  
caacaacgtg gatctggtga atattggcag tactgatc gtggacggga accacaaact 1320  
gacactgggc ctgatctgga acatttct gactggcag gtgaaaaatg tgatgaagaa 1380  
catcatggcc gggctgcagc agaccaatc cgagaagatc ctgctgtctt gggctcggca 1440  
gagcaccgc aactatcccc aggtgaacgt gattaactc actacatct ggagcagcg 1500  
gctggcctg aatgctctga ttcacagcca caggctgat ctgttcgact ggaatagct 1560  
ggtgtgccag cagtctgcca cacagcct ggaacatgcc ttcaatatc ctcggtacca 1620  
gctgggacg gaaaaactgc tggaccaga ggatgtggac actacatacc cagataaaaa 1680  
gtctattctg atgtacatta ctgacctgtt ccaggtgctg ccacagcagg tgtctattga 1740  
agccattcag gaggtgaaa tctgccccg ccccccaaa gtgactaaag aggagcattt 1800  
tcagctgat catcagatgc attacagcca gcagattacc gtgacctgg ctcagggata 1860  
tgagcacc agtagtccaa aaccacggtt caagtctac gcttatacc aggetgcta 1920  
cgtgacaact agcacccta ctgatcccc ctccatcc cagcactgg aggeccaga 1980  
ggacaagagc ttgggtcca gcctgatgga aagcaggtg aatctggatc ggtaccagac 2040  
agccctggag gaggtgctga gctggctgct gactgctgaa gacacactgc aggccaggg 2100  
cgaaatttc aatgactgg aagtgtgaa ggtcagttc cacacacagc agggctatat 2160  
gatggactg acagctcacc aggggcgct gggcaatc ctgcagctgg gctctaaact 2220  
gatcggcacc gggaaactga gtgaggacga ggaacagaa gtcaggagc agatgaacct 2280  
gctgaacagc cgctgggagt gctgagagt ggctagtatg gagaagcagt ccaacctgca 2340  
ccgggtgctg atggacctgc agaaccagaa actgaaagag ctgaacgact ggctgacaaa 2400  
gactgaggaa cgcacaagga agatggagga ggagccactg ggaccgacc tggaggatct 2460  
gaagagacag gtcagcagc ataagtgct gcaggaggat ctggaacagg agcaggtgcg 2520  
ggtgaactcc ctgacacata tgggtgtgt ggtggacgaa tctagtggag atcacgccac 2580  
cgccgcctg gaggaacagc tgaagtgct gggggaccgg tggccaaca ttgccggtg 2640  
gaccgaggac agtgggtgc tctgcagga catctgctg aatggcaga ggtgaccga 2700  
ggagcaggt ctgttagtg ctggctgag cgagaaagag gacgccgtga acaagatcca 2760  
cacaaccgac ttaagatc agaacgaaat gctgtctagc ctgcagaaac tggctgtct 2820

gaaggccgat ctggagaaaa agaagcagag catgggcaaa ctgtatagcc tgaacagga 2880  
cctgctgagc accetgaaga acaagagcgt gaccagaag acagaagcct ggctggataa 2940  
ctttccccgc tgctgggaca acctggtgca gaaactggag aaaagtacag ctcagatctc 3000  
tcaggctgtg accacaacce agcctagcct gaccagaca accgtgatgg aaacctgac 3060  
caccgtgaca acccgcaac agatcctggt gaaacatgcc caggaagagc tgccacctcc 3120  
acctccccag aagaagagaa cctggagcgc gctgcaggag ctgcaggaag ccaactgaca 3180  
actggacctg aagctgaggc aggccgaagt gattaagggg tcttggcagc ctgtggcgca 3240  
tctgctgatt gattccctgc aggaccacct ggaaaagggt aaggctctga gaggcgaaat 3300  
tgctccactg aaggagaacg tgagtcattg gaacgatctg gctagacagc tgacaacact 3360  
gggcatccag ctgagcccat acaatctgag cactctggag gacctgaata ccaggtggaa 3420  
gctgctgcag gtggtctgtg aagaccgggt gcggcagctg catgaggccc atcgcgactt 3480  
cggaccagcc agccagcact ttctgagcac atccgtgcag gggccctggg agagggccat 3540  
tttcccaac aaggtgcct actatattaa tcagagacc cagaccactt gttgggacca 3600  
tccaagatg acagaactgt accagtcct ggccgatctg aacaactga ggtttagcgc 3660  
ttacagaacc gctatgaagc tgagacggct gcagaaggcc ctgtgcctgg atctgctgc 3720  
cctgtccgcc gctgcgatg cctggatca gcataatctg aagcagaacg atcagccaat 3780  
ggatctctg cagatcatca actgcctgac cactatctac gacaggtgg agcaggagca 3840  
caacaactg gtgaactgc ctctgtcgt ggatatgtgc ctgaactggc tgctgaactg 3900  
glatgacact gggcgaccg gccggatcag agtctgagt tttaaaactg ggattatctc 3960  
cctgtglaag gccacctgg aggacaagta caggtacctg ttcaagcagg tggtagtag 4020  
cactggattt tgtgaccagc gccgctggg actgctgctg catgatagta tccagattcc 4080  
tagacagctg ggagaggtgg ctagtctgg aggatctaac atcgaacca gcgtgcgcag 4140  
ctgtttccag tttccaata acaaacctga aatcgaggct gctctgttcc tggattgat 4200  
gcgctggaa ccacagagca tgggtggct gctgtgctg cacagagtgg ctgccgccga 4260  
aactgccaag caccaggcta aatgcaacat ctgcaaggaa tctccatta tggctttcg 4320  
ctacaggagt ctgaaacatt ttaactacga tattgccag agctgcttct tttccggaag 4380  
agtggccaaa ggacacaaga tgcactacce tatggtggaa tattgcacce caactacatc 4440  
tggcgaagat gtgcgcgatt ttgccaagg gctgaagaat aagttcggga ctaagaggta 4500  
cttcgccaag ccccccgca tggggtatct gccagtgcag acagtctgg aaggagaca 4560  
tatggagacc gatacaatgt gagcgcccgc aataaaagat ctttatttc attagatctg 4620  
tgtgttggt tttgtgtgt ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa 4680  
tcattaacta caaggaacce ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgt 4740  
cgctactga ggccgggcga ccaaaggctc cccgacgcc gggtttgccc cggcgccct 4800  
cagtgagcga gcgagcgcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgcct 4860  
tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggaagtcc agacgattga gcgtcaaat 4920  
gtaggtattt ccatgagcgt tttcctgtt gcaatggctg gcgtaatat tgttctggat 4980  
attaccagca agccgatag ttgagttct tctactcagg caagtgatgt tattactaat 5040  
caaagaagta ttgcgacaac ggftaattg cgtgatggac agacttttt actcgtggc 5100  
ctcactgatt ataaaaacac ttctcaggat tctggcgtac cgttctctc taaaatecct 5160  
ttaatcgccc tctgtttag ctcccgtct gattctaacg aggaaagcac gttatactg 5220

ctgctcaaag caacatagat acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt 5280  
 ggftacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgccta gcgcccgtc ctttcgctt 5340  
 cttcccttcc ttctcgcca cgttcgcgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct 5400  
 ccctttaggg ttccgattta gtgatttacg gcacctcgac ccaaaaaaac ttgattaggg 5460  
 tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt ttctgccctt tgacgttga 5520  
 gtccacgttc ttaatatgtg gactctgtt ccaactgga acaactca accetatctc 5580  
 ggtctattct ttgatttat aagggatit gccgatttc gcctattggt taaaaaatga 5640  
 gctgattta caaaaattta acgcgaatt taacaaaata ttaacttta caatttaaat 5700  
 atttgctat acaacttcc tgttttggg gcttttctga ttatcaaccg ggtacatat 5760  
 gattgacatg ctagtttac gattaccgt catcgattct cttgttctc ccagactctc 5820  
 aggcaatgac ctatagcct tttagagac ctctcaaaa tagctaccct ctccggcatg 5880  
 aatttatcag ctagaacgt tgaatatcat attgatggtg atttgactgt ctccggcctt 5940  
 tctcaccgt ttgaatctt acctacacat tactcagga ttgcattta aatatatgag 6000  
 ggttctaaaa attttatcc ttgcgttga ataaaggctt ctccgcaaa agtattacag 6060  
 ggtcataatg ttttggtag aaccgattta gctttatct ctgaggctt attgctaat 6120  
 tttgctaatt cttgacctg cctgtatgat ttattgatg ttggaagtc ctgatcgggt 6180  
 attttctct tacgcactg tgcgtattt cacaccgat atggtgact ctactata 6240  
 tctgctga tccgcctag ttaagccagc cccgacacc gccaacacc gctgacgcgc 6300  
 cctgacgggc ttgtctctc ccggcctcc ctacagaca agctgtgacc gtctccggga 6360  
 gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aaggcctcg 6420  
 tgatacgcct attttatag gttaatgca tgataaat ggtttctag acgtcaggtg 6480  
 gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc ctattgttt attttctaa atacattca 6540  
 atatgtatcc gctcatgaga caataacct gataaatgt tcaataat tgaaaaagga 6600  
 agagtatgag tattcaacat ttccgtctc ccttatcc ctttttgcg gcattttgcc 6660  
 ttctgtttt tctcacca gaaacgttg taaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 6720  
 gtgacagagt gggttacat gaactggat tcaacagcg taagatcctt gagagtttc 6780  
 gccccgaaga acgtttcca atgatgaca ctttaaaagt tctgctatgt ggcgcggat 6840  
 taccctgat tgacccggg caagagcaac tcggtcgcg catacactat tctcagaatg 6900  
 acttggtga gtactacca gtcacagaaa agcatctac ggatggcatg acagtaagag 6960  
 aattatgcag tgctgcata accatgagtg ataactgc ggccaactta ctctgaca 7020  
 cgtcggagg accgaaggag ctaaccgtt tttgcaca catgggggat catgtaactc 7080  
 gcctgatcg ttgggaaccg gactgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 7140  
 cgtgctgt agcaatgca acaacttgc gcaactatt aactggcgaa ctactactc 7200  
 tagcttccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagtgca ggaccactc 7260  
 tgcctcggc cttccggct ggtggttta ttctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 7320  
 ggtctcggg taccattgca gactggggc cagatggtaa gccctccgt atcgtagtt 7380  
 tctacagac ggggagtcag gcaactatg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 7440  
 gtgcctact gattaagcat tgtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 7500  
 ttgatttaa acttctttt taatttaaaa ggtactaggt gaagatcctt ttgataatc 7560  
 tcatgacca aatccctta cgtgagttt cgttccact agcgtcagac cccgtagaaa 7620

agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaca 7680  
 aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagetacca actctttttc 7740  
 cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatc tgctcttcta gtgtagccgt 7800  
 agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcgtac atacctcgt ctgctaate 7860  
 tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 7920  
 galagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 7980  
 gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg 8040  
 ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 8100  
 gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 8160  
 ttgccacct ctgactttag cgtcgatttt tgtgatctc gtcagggggg cggagcctat 8220  
 ggaaaaacgc cagcaacgcg gcccttttac gtttctggc cttttgctgg ccttttctc 8280  
 acatgttct tctgcgtta tcccctgatt ctgtgataa ccgtattacc gggtttgagt 8340  
 gagctgatac cgctcggcgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagt agcgaccaag 8400  
 cgaagagc 8409

<210> 6

<211> 8611

<212> ДНК

<213> Аденоассоциированный вирус

<400> 6

gccaatacg caaacccgct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60  
 ctgctcgt cactgagcc gcccgggcaa agcccgggcg tggggcacc tttggtcgc 120  
 cggcctcagt gacgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180  
 cttttagtt aatgattaac ccgcatgct aattatctac gtagccatgt ctagagtta 240  
 aacaagctt catgtctaag ctgacctt cagattaaa ataactgagg taaggcctg 300  
 ggtaggggag gtggtgtgag acgtcctgt ctctctcta tctgcccac gcccttttg 360  
 ggaggaggaa tgtgccaag gactaaaaaa agccatgga gccagagggg cgagggcaac 420  
 agaccttca tgggcaaac ttggggccct gctgtctagc atgccccact acgggtctag 480  
 gctgcccacg taaggaggca agcctgggg acaccgaga tgctgtgta taattaacc 540  
 agacatgtg ctgcccccc ccccccaaca cctgctgct ctaaaaataa cctgtcct 600  
 ggtggatccc ctgcatgca agatcttca acaaggctgt gggggactga gggcagctg 660  
 taacaggctt gggggccagg gcttatact gctgggact ccaaagtat tactgttcca 720  
 tgttccggc gaaggccag ctgtccccg ccagctagac tcagactta gtttagaac 780  
 cagtgagcaa gtcagcctt ggggcagccc atacaaggcc atggggtgg gcaagctgca 840  
 cgctgggtc cggggtgggc acggtgccc ggcaacgagc taaaagctca tctgctca 900  
 ggggccccct cctggggaca gccctcctg gctagtcaca cctgtagc tctctatat 960  
 aaccagggg cacaggggct gccctatc taccaccac tcacagcac agacagacac 1020  
 tcaggagcca gccagcggcg cggccaggta agtttagct tttgtctt tatttcaggt 1080  
 cccggatccg gtggtgtgca aatcaaaaga actgctctc agtggatgtt gccttactt 1140  
 ctaggcctgt acggaagtgt tacttctgct ctaaaagctg cggaattga ccgcgggccg 1200  
 ccaccatgct gtggtgggag gaggtggagg attgttatga aaggaggagc gtcagaaga 1260

agacttttac caagtgggtg aacgctcagt tcagcaaatt tgggaagcag cacatcgaga 1320  
 atctgttttc cgacctgcag gatgggagac ggctgctgga tctgctggaa ggactgactg 1380  
 gccagaagct gcccaaagag aaggggagca ctagggtgca cgcctgaac aacgtgaaca 1440  
 aagctctgag agtgcctgag aacaacaacg tggatctggt gaatttggc agtactgata 1500  
 tctgggacgg gaaccacaaa ctgacctgg gcctgatctg gaacattatt ctgactggc 1560  
 aggtgaaaaa tgtgatgaag aacatcatgg ccgggctgca gcagaccaat tccgagaaga 1620  
 tctgctgtc ttgggtgagg cagagcacc gcaactatcc ccaggtgaac gtgattaact 1680  
 tcactacatc ctggagcgac gggctggccc tgaatgctct gattcacagc cacaggcctg 1740  
 atctgttcga ctggaatagc gtggtgtgcc agcagtctgc cacacagcgc ctggaacatg 1800  
 ccttcaatat cgctcggtag cagctgggga tcaaaaaact gctggacca gaggatgtgg 1860  
 aactacata ccagataaa aagtctatc tcatgtacat tactagcctg tccaggtgc 1920  
 tgccacagca ggtgtctatt gaagccatc aggaggtgga aatgctgccc cgcccccca 1980  
 aagtactaa agaggagcat ttccagctgc atcatcagat gcattacagc cagcagatta 2040  
 ccgtgagcct ggctcaggga tatgagcgca ccagtagtcc aaaaccagg tcaagtct 2100  
 acgttatac ccaggtgcc tacgtgaca ctagegacc tactagatcc cctttccat 2160  
 cccagacct ggaggcccca gaggacaaga gctttgggtc cagcctgatg gaaagcgagg 2220  
 tgaatctgga tgggtaccag acagccctgg aggaggtgct gagctggctg ctgagtgtg 2280  
 aagacacact gcaggcccag ggcgaaatc ccaatgacgt ggaagtggg aaggatcagt 2340  
 tccacacaca cgagggtat atgatggacc tgacagctca ccaggggagc gtgggcaata 2400  
 tctgcagct gggtctaaa ctgatcgga ccgggaaact gagtgaggac gaggaacag 2460  
 aagtgcagga gcagatgaac ctgctgaaca gccgctggga gtgtctgaga gtggctagta 2520  
 tggagaagca gtccaacctg caccgggtgc tcatggacct gcagaaccag aactgaaag 2580  
 agctgaacga ctggctgaca aagactgagg aacgcacaag gaagatggag gaggagccac 2640  
 tgggaccga cctggaggat ctgaagagac aggtgcagca gcataaggctg ctgcaggagg 2700  
 atctggaaca ggagcaggtg cgggtgaact cctgacaca tatggtggtg gtggtggacg 2760  
 aatctagtgg agatcacgcc accgcccgc tggaggaaca gctgaaggctg ctgggggacc 2820  
 ggtgggcca catttcccgg tggaccgagg acaggtgggt gctgctgcag gacatctgc 2880  
 tgaatggca gaggctgacc gaggagcagt gtctgttag tcttggctg agcgagaaag 2940  
 aggacgccgt gaacaagatc cacacaaccg gcttaagga tcagaacgaa atgctgtcta 3000  
 gcctgcagaa actggctgtg ctgaaggccg atctggagaa aaagaagcag agcatgggca 3060  
 aactgtatag cctgaaacag gacctgctga gcacctgaa gaacaagagc gtgaccaga 3120  
 agacagaagc ctggctggat aactttgccc gctgctggga caacctggtg cagaaactgg 3180  
 agaaaagtac agctcagatc tctcaggctg tgaccacaac ccagcctagc ctgaccaga 3240  
 caacctgat ggaaacctg accacctga caaccgcga acagatctg gtgaaacatg 3300  
 cccaggaaga gctgccacct ccacctccc agaagaagag aacctggag cggctgcagg 3360  
 agctgcagga agccactgac gaactggacc tgaagctgag gcaggccgaa gtgattaagg 3420  
 ggtcttggca gcctgtgggc gatctgctga ttgattccct gcaggaccac ctggaaaagg 3480  
 tgaaggctct gagaggcgaa attgctccac tgaaggagaa cgtgagtcac gtgaacgatc 3540  
 tggctagaca gctgacaaca ctgggatcc agctgagccc atacaatctg agcacactgg 3600  
 aggacctgaa taccaggtgg aagctgctgc aggtggctgt ggaagaccgg gtgcggcagc 3660

tgcattgagc ccatcgcgac ttccgaccag ccagccagca ctttctgagc acatccgtgc 3720  
 agggggccctg ggagagggcc atttctcca acaaggtgcc ctactatatt aatcacgaga 3780  
 cccagaccac ttgtgggac catccaaga tgacagaact gtaccagtcc ctggccgac 3840  
 tgaacaactg gaggtttagc gcttacagaa ccgctatgaa gctgagacgg ctgcagaagg 3900  
 cctgtgctt ggatctgctg tccctgtccg ccgctgcga tgcctggat cagcataatc 3960  
 tgaagcagaa cgatcagcca atggatatcc tgcagatcat caactgctg accactatct 4020  
 acgacaggct ggagcaggag cacaacaacc tgggtaactg gctctgtgc gtggatatgt 4080  
 gctgaactg gctgctgaac gtgtatgaca ctgggcgcac cggccggatc agagtctga 4140  
 gttttaaaac tgggattatc tccctgtgta aggcccacct ggaggacaag tacaggtacc 4200  
 tgttcaagca ggtggctagt agcactggat tttgtgacca gcgcccctg ggactgtgc 4260  
 tgcattgatg tatccagatt cctagacagc tgggagaggt ggctagtctt ggaggatcta 4320  
 acatcgaacc cagcgtgcgc agctgttcc agtttgcga taacaaacct gaaatcgagg 4380  
 ctgctctgtt cctggattgg atgcgctgg aaccacagag catggtgtgg ctgctgtgc 4440  
 tgcacagagt ggctccgcc gaaactgcca agcaccaggc taaatgcaac atctcaagg 4500  
 aatgtccat tatcgcttt cgtacagga gtctgaaaca ttttaactac gatatttgc 4560  
 agagtgtctt ctttccgga agagtggcca aaggacaca gatgcactac cctatggtgg 4620  
 aatattgcac cccaactaca tctggcgaag atgtgcgca ttttccaag gtgctgaaga 4680  
 ataagtctg gactaagagg tacttcgcca agcacccecg catggggat ctgccagtgc 4740  
 agacagtctt ggaaggagac aatatggaga ccgatacaat gtgagcggcc gcaataaag 4800  
 atcttattt tcattagatc tgtgtgtgg tttttgtgt gtctagagca tggctacgta 4860  
 gataagtgc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac cctagtgtat ggagttggcc 4920  
 actccctct tgcgcgctcg ctgctcact gaggcggggc gaccaaagg cgcgccagc 4980  
 ccgggctttg cccggcgggc ctgagtgc gagcgcgc gccagctggc gtaatagcga 5040  
 agaggcccgc accgatgcc ctccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggaagt 5100  
 ccagacgatt gacgtcaaa atgtaggtat ttcatgagc gttttctg ttgcaatggc 5160  
 tggcggtaat attgtctgg atattaccag caaggccgat agtttgagt cttctactca 5220  
 ggcaagtgt gttacta atcaagaag tattgcgaca acggttaatt tgcgtgatgg 5280  
 acagactct ttactgggt gcctactga ttataaaaac actctcagg attctggcgt 5340  
 accgttctg tctaaaatcc cttaategg cctctgttt agctcccgt ctgattctaa 5400  
 cgaggaaagc acgtatacg tctctgcaa agcaaccata gtacgcgcc tgtagcggcg 5460  
 cattaagcgc ggcgggtgt gtggttacgc gcagcgtgac cgtacactt gccagcgc 5520  
 tagcgcgc tctttcgt tcttccct ctttctcgc cagttcgc ggtttccc 5580  
 gtcaagctct aaatcggggg ctcccttag ggtccgatt tagtgattta cggcacctcg 5640  
 acccaaaaa acttgattag ggtgatggt cagctagtgg gccatgccc tgatagacgg 5700  
 ttttgcgcc ttgacgttg gactccact tcttaaatag tggactctg ttccaaactg 5760  
 gaacaact caacctatc tggctatct ctttgattt ataagggtt ttgccgatt 5820  
 cggcctatt gttaaaaat gagctgatt acaaaaaat taacgcgaat ttaacaaaa 5880  
 tattaactt tacaattaa atattgct atacaactt cctgttttg gggtttct 5940  
 gattatcaac cggggtacat atgattgaca tctagtctt acgattacc ttcatgatt 6000  
 ctctgttg ctccagactc tcaggcaatg acctgatagc cttttagag acctctcaa 6060



aatagctacc ctctccggca tgaatttacc agctagaacg gttgaatacc atattgatgg 6120  
 tgatttgact gtctccggcc ttctcacc gtttgaatct ttacctacac attactcagg 6180  
 cattgcatft aaaatatatg aggggtctaa aaattttat ccttgcgttg aaataaaggc 6240  
 ttctcccgca aaagtattac agggtcataa tgttttggg acaaccgatt tagctttatg 6300  
 ctctgagget ttattgctta attttgctaa ttctttgcct tgctgtatg atttattgga 6360  
 tgttggaaat tctgatgagc gtttttctc ctacgcacc tgtgcggat ttacaccgc 6420  
 atatgggtgca ctctcagtac aatctgctct gatcccgcat agttaagcca gccccgacac 6480  
 ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttctctgc tcccggcacc cgtttacaga 6540  
 caagctgtga ccgtctccgg gagctgatg tgcagaggt ttccaccgac ataccgaaa 6600  
 cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatagc ctattttat aggttaatgt catgataata 6660  
 atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctattgt 6720  
 ttattttctt aaatacttc aatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 6780  
 ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt 6840  
 ccctttttg cggcattttg ccttctgtt ttgtctacc cagaaacgct ggtgaaagta 6900  
 aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcaca gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 6960  
 ggtaagatcc ttgagagttt tgcceccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaa 7020  
 gttctgctat gtggcgcggt attatccgt attgacccg ggcaagagca actcggctgc 7080  
 cgcatacact attctcagaa tgactgggt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 7140  
 accgatggca tgacagtaag agaattatgc agtctgcca taaccatgag tgataaact 7200  
 gcggccaact tactctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc tttttgcac 7260  
 aacatggggg atcatgtaac tgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 7320  
 ccaaacgacg agcgtgacac cagatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaaacta 7380  
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 7440  
 gataaagttg caggaccact tctgcctcg gccctccgg ctggctggtt tattgctgat 7500  
 aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 7560  
 aagccctccc gtatcgtatg tatctacacg accgggagtc aggcaactat ggtgaaagca 7620  
 aatagacaga tctctgagat aggtgctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa 7680  
 gtttactcat atatacttta gattgattta aaactcatt ttaatttaa aagatctag 7740  
 gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcttccac 7800  
 tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaaa ggtcttctt gagatccttt tttctgcgc 7860  
 gtaatctgct gcttgcacac aaaaaacca ccctaccag cgggtggttg tttgccgat 7920  
 caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgc gataccaaat 7980  
 actgtcttc tagtgtagc gtagtaggc caccacttca agaactctgt agcaccgct 8040  
 acatacctcg ctctgctaat cctgttaca gtggctgctg ccagtggcga taagctgtg 8100  
 ctaccgggt tggactcaag acgatagta ccgataagg cgcagcggc gggtgaacg 8160  
 ggggttctg gcacacagcc cagctggag cgaacacct acaccgaact gagataccta 8220  
 cagcgtgagc tatgagaaag cgcacgctt cccgaaggga gaaaggcggg caggtatccg 8280  
 gtaagcggca ggtctggaac aggagagcgc acgaggagc ttccaggggg aaacgctgg 8340  
 tatctttata gtctctcgg gtttccac ctctgactg agcgtcgatt tttgtgatg 8400  
 tctcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggcctttt acggttctg 8460

gccttttgc ggcttttgc tcacatgttc ttctctcgt taccctga ttctgtgat 8520  
 aaccgtatta ccgggttga gtgagctgat accgctgcc gcagccgaac gaccgagcgc 8580  
 agcgagtcag tgagcgacca agcggaagag c 8611

<210> 7

<211> 792

<212> ДНК

<213> Аденоассоциированный вирус

<400> 7

aagcttgc atgtctaac gaccctcag attaaaaata actgaggtaa gggcctgggt 60  
 aggggaggtg gtgtgagacg ctctgtctc tctctatct gcccatcgcc cctttgggga 120  
 ggaggaatgt gcccaaggac taaaaaaagg ccatggagcc agaggggcca gggcaacaga 180  
 ctttcatgg gcaaaccttg gggcctgct gtctagcatg cccactacg ggtctaggct 240  
 gcccatgtaa ggaggcaagg cctggggaca ccgagatgc ctggtataa ttaaccaga 300  
 catgtggctg cccccccc ccaaacct gctgctcta aaaataacc tgccttgg 360  
 ggatccctg catgcaaga tcttgaaca aggctgtggg ggactgaggg caggctgtaa 420  
 caggctggg ggccagggt tatactgcc tgggactccc aaagtattac tgtccatgt 480  
 tcccgccgaa gggccagctg tccccgcca gctagactca gcaactagt taggaaccag 540  
 tgagcaagtc agcccttggg gcagccata caaggccatg gggctgggca agctgcacgc 600  
 ctgggtccgg ggtgggacg gtgcccggc aacgagctga aagctcatct gcttcaggg 660  
 gccctcctt ggggacagcc cctctggct agtcacacc ttaggctcc tctatataac 720  
 ccaggggac aggggctgcc ctattctac caccactcc acagcacaga cagactca 780  
 ggagcagcca gc 792

<210> 8

<211> 8629

<212> ДНК

<213> Плазмида, содержащая ген устойчивости к канамицину

<400> 8

gcgcctcgc tcgctactg agggccccc ggcaagccc gggcgtcggg cgaccttgg 60  
 tcgccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120  
 gggttcctg tagttaatga ttaaccgcc atgctacta tctactgac catgctctag 180  
 agtttaaca agcttgcag tctaagctag accctcaga ttaaaaataa ctgaggtgag 240  
 ggcctgggta ggggaggtg gtgagacgc tctgtctc cctctatct gccatcgcc 300  
 ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaggc catggagcca gagggcgag 360  
 ggcaacagac ctttcatggg caaaccttg ggcctgctg tctagcatg cccactacg 420  
 gtctaggctg ccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 480  
 taaccagac atgtggctgc cccccccc ccaaacctg ctgctctaa aaataacct 540  
 gtccttggg gatccctgc atgcaagat ctctgaaca ggctgtgggg gactgaggc 600  
 aggctgtaac aggcttgggg gccagggtt atactgctt gggactcca aagtattact 660  
 gttccatgt cccggcgaag ggccagctgt cccccccag ctgactcag cacttagttt 720  
 aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggca 780

gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg 840  
 ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctctggcta gtcacacct gtaggtctct 900  
 ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac 960  
 agacactcag gacgagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt 1020  
 caggtcccgg atccgggtgt ggtgcaaate aaagaactgc tctcagtgg atgttgctt 1080  
 tacttctagg cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtaccgc 1140  
 ggcccacc atgctgtgtt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca 1200  
 gaagaagact ttaccaagt ggggtaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat 1260  
 cgagaatctg tttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact 1320  
 gactggccag aagctgccc aagagaaggg gagcactagg gtgcacgcc tgaacaact 1380  
 gaacaaact ctgagagtgc tgcagaacaa caactggat ctggtgaata ttggcagtac 1440  
 tgatactgtg gacgggaacc aaaaactgac actgggctg atctggaaca ttattctgca 1500  
 ctggcaggtg aaaaatgtga tgaagaact catggccggg ctgcagcaga ccaattccga 1560  
 gaagatctg ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac taccaccagg tgaactgat 1620  
 taacttact acatctgga ggcacgggtt ggccctgaat gctctgattc acagccacag 1680  
 gcctgatctg ttcgactgga atagctgtgt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga 1740  
 acatgcttc aatctgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga 1800  
 tgtggacact acataccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca 1860  
 ggtgctgcca cagcaggtgt ctattgaage cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc 1920  
 ccccaaagt actaaagagg agcatttca gctgcatcat cagatgatt acagccagca 1980  
 gattaccgtg agcctggctc agggatgta ggcaccagt agtccaaaac cacggttcaa 2040  
 gtctacgt tataccagg ctgcctactg gacaactagc gacctacta gatccccctt 2100  
 tccatcccag cacctggagg cccagagga caagagcttt gggccagcc tgatggaaag 2160  
 cgaggtgaat ctggatcggg accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag 2220  
 tgctgaagac aactgcagg cccagggcga aatttccaat gactggaag tggtaagga 2280  
 tcagttccac acacagagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg 2340  
 caatatactg cagctgggct ctaaaactgat cggcaccggg aaactgagt aggacgagga 2400  
 aacagaagtg caggagcaga tgaacctgct gaacagccc tgggagtgtc tgagagtggc 2460  
 tagtatggag aagcagcca acctgcacc ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact 2520  
 gaaagagctg aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga 2580  
 gccactggga cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca 2640  
 ggaggatctg gaacaggagc aggtgcgggt gaactcctg acacatatgg tgggtgtgtt 2700  
 ggacgaatct agtggagatc acgccaccgc cgcctggag gaacagctga aggtgctggg 2760  
 ggaccgtgg gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat 2820  
 cctgctgaaa tggcagagge tgaccgagga gcagtgtctg tttagtctt ggctgagcga 2880  
 gaaagaggac gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct 2940  
 gtctagcctg cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat 3000  
 gggcaaactg tatagctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac 3060  
 ccagaagaca gaagcctggc tggataactt tgcccctgc tgggacaacc tggtcagaa 3120  
 actggagaaa agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaaccagc ctgacctgac 3180

ccagacaacc gtgatgaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgccaacaga tcttgggtgaa 3240  
 acatgcccag gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaacce tggagcggct 3300  
 gcaggagctg caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat 3360  
 taaggggtct tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga 3420  
 aaaggtgaag gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcattgtaa 3480  
 cgalctggct agacagctga caaactggg catccagctg agcccatata atctgagcac 3540  
 actggaggac ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg 3600  
 gcagctgcat gaggcccac gcgactcgg accagccagc cagcacttc tgagcacac 3660  
 cgtgcagggg ccttgggaga gggccattc tccaacaag gtgcctact atattaatca 3720  
 cgagaccag accactgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctgac 3780  
 cgalctgaac aactgaggt ttgagcctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca 3840  
 gaagccctg tgctggatc tctgtccct gtcgcccgc tgcgatgccc tggatcagca 3900  
 taatctgaag cagaacgac agccaatgga tatctgcag atcatcaact gctgaccac 3960  
 tatctacgac aggtggagc aggagcaca caaactggtg aactgcctc tctgctgga 4020  
 tatgtgctg aactggtgc tgaactgta tgacctggg cgcaccggcc gcatcagagt 4080  
 gctgagttt aaaactggga ttatccct gtglaaggcc cacctggagg acaagtacag 4140  
 gtacctgtc aagcaggtg ctgtagcac tggatttgt gaccagccc gctgggact 4200  
 gctgctgcat gatagtacc agattctag acagctggga gagtggtgta gttcggagg 4260  
 atcaacac gaaccagcg tgcgagctg ttccagttt gccaataaca aactgaaat 4320  
 cgaggtgct ctgttctgg attggatgac cctggaacca cagagcatgg tgtgctgcc 4380  
 tgtgctgac agagtggct cgcgcaaac tgccaagcag caggctaaat gcaacatctg 4440  
 caaggaatg cccattatc gcttctgta caggagtctg aaacattta actacgatat 4500  
 ttgccagac tcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actacctat 4560  
 ggtggaatat tgcacccaa ctacatctg cgaagatgt cgcgattttg ccaaggtgct 4620  
 gaagaataag ttccgacta agagtactt cccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc 4680  
 agtgcagaca gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtgag cggccgcaat 4740  
 aaaagatct tttttcatt agatctgtg gttggtttt tgtgtgcta gactgacca 4800  
 gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggtaataa ttaactacaa ggaacccta 4860  
 gtgatggagt tggccactc ctctctgccc gctcctcgc tcaactgagc cggcgacca 4920  
 aaggtgccc gacgcccggg ctttcccgg gcgccctcag tgagcgagcg agcgcgagc 4980  
 tgcattatg aatcgccaa cgcgccccga gagcggttt gctattggg cgtcttccg 5040  
 ctctctgct cactgactc ctgcctcgg tcttccgct gcgcgagcg gtatcagctc 5100  
 actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatg 5160  
 gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttctg gctttttcc 5220  
 ataggtccc cccccctgac gagcatcaca aaaatcgac ctcaagtac aggtggcgaa 5280  
 acccgacagg actataaaga taccagcgt tccccctgg aagctcctc gtgcctctc 5340  
 ctgtccgac cctgcccct accggatacc tctccctt tctccctc ggaagcgtg 5400  
 cgtttctca tagctcagc ttaggtatc tcaattcgt gtaggtcgt cgtccaage 5460  
 tgggtgtg gcacgaacce cccgtcagc ccgaccctg cgccttacc ggtaactatc 5520  
 gtctgagc caaccggta agacacgact tctccact ggcagcagc actgtaaca 5580

ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 5640  
 acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcctct gctgaagcca gttaccttcg 5700  
 gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca acaaaaccac cgctggtagc ggtggttttt 5760  
 ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 5820  
 tttctacggg gtctgacgct cagtggaaac aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga 5880  
 gattatcaaa aaggatctc acctagatcc ttttaaatca aaaaatgaagt tttaaatcaa 5940  
 tctaaagtat atatgagtaa aatatctccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag 6000  
 gttgggaagc cctgcaaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc 6060  
 aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttccatgat tgaacaagat 6120  
 ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagagc tattcggcta tgactgggca 6180  
 caacagaaa tcggctgctc tgatccgcc gtgttccggc tgcagcgcga gggcgcccc 6240  
 gttcttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 6300  
 cggctatcgt ggtggccac gacgggctt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgcact 6360  
 gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtccgg ggcaggatct cctgtcatcc 6420  
 caccttctc ctgccagaa agtatccatc atggctgat caatgcggcg gctgcatacg 6480  
 ctgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaac atcgcacga gcgagcacgt 6540  
 actcggatgg aagccggtct tctgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 6600  
 gcgccagccg aactgttgc caggtcaag gcgcgatgc ccgacggcga ggcactcctc 6660  
 gtgacctg gcgatcctg ctgccgaat atcatggtg aaaaatggccg ctttctgga 6720  
 ttcatcgact gtggccggt ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggtacc 6780  
 cgtgatattg ctgaagact tggcggcgaa tgggctgacc gcttctcgt gctttacgt 6840  
 atcgcgctc ccgattcga gcgcacgcc ttctatgcc ttctgacga gttcttctga 6900  
 accgtaata ttattgaagc atttacagg gttattgtct catgagcggg tacatattg 6960  
 aatgtattta gaaaaataa caaatagggg tccgcgcac atttccccga aaagtccac 7020  
 ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga 7080  
 ggcccttctg tctcgcgct tccggtgat acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 7140  
 cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atcccgggag cagacaagcc cgtcagggcg 7200  
 cgtcagcggg tgttggcggg tctcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 7260  
 tactgagagt gcaccatag cgtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 7320  
 gcatcagcgg attccaacat ccaataaate atacaggcaa ggcaaagaat tagcaaaatt 7380  
 aagcaataaa gcctcagagc ataaagctaa atcggttgta ccaaaaacat tatgacctg 7440  
 taatactttt gcgggagaag cctttattc aacgcaagga taaaaatttt tagaacctc 7500  
 atatatttta aatgcaatgc ctgagtaatg ttaggtaaa gattcaaacg ggtgagaaag 7560  
 gccggagaca gtcaaatcac catcaatag atattcaacc gttctagctg ataaattcat 7620  
 gccggagagg gtactatft ttgagaggtc tctacaaagg ctatcaggtc attgcctgag 7680  
 agtctggagc aaacaagaga atcgtatgac ggtaatcgt aaaaactagc atcaatcata 7740  
 tttacccgg ttgataatca gaaaagcccc aaaaacagga agattgtata agcaaatatt 7800  
 taaattgtaa gcgttaatat ttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgta aatcagctca 7860  
 ttttttaacc aatagggcga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag 7920  
 ataggggtga gttgttcc agtttgaac aagagtccac tattaagaa cgtggactcc 7980

aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc 8040  
 taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc 8100  
 ccccgattta gagcttgacg gggaaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa 8160  
 gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtglagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc 8220  
 acaccgccc cgcttaatgc gccgctacag ggcgcgtact atggttgctt tgacgagcac 8280  
 gtataacgtg ctttctcgt tagaatcaga gcgggagcta aacaggaggc cgattaaagg 8340  
 gattitagac aggaacggta ccccagaatc ctgagaagtg tttttataat cagtgaggcc 8400  
 accgagtaaa agagtctgtc catcacgcaa attaaccgtt gtcgcaatac ttctttgatt 8460  
 agtaataaca tcaactgctt gagtagaaga actcaaacta tcggccttgc tgtaatatc 8520  
 cagaacaata ttaccgccag ccattgcaac ggaatcgcca ttcgccattc aggetgcgca 8580  
 actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttegetatt acgccagct 8629

<210> 9

<211> 4977

<212> ДНК

<213> Кассета, содержащая ген устойчивости к канамицину

<400> 9

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccc ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60  
 tcgcccggcc tcagtgagcg agcagagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120  
 gggttccttg tagttaatga ttaaccgcc atgctactta tctacgtagc catgctctag 180  
 agtttaaaca agcttgcattg tctaagctag acccttcaga ttaaaaataa ctgaggttaag 240  
 ggccctgggta ggggaggttg tftgagacgc tctgtctct cctctatctg cccatcgccc 300  
 ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaggc catggagcca gaggggagcag 360  
 ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg 420  
 gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 480  
 taaccagac atgtggctgc cccccccc ccaacacctg ctgctctaa aaataacct 540  
 gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat ctctgaaca ggctgtgggg gactgagggc 600  
 aggetgtaac aggettgggg gccagggctt atactgctt gggactcca aagtattact 660  
 gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt cccccccag ctgactcag cacttagttt 720  
 aggaaccagt gagcaagta gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa 780  
 gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg 840  
 ctctcagggg cccctcctg gggacagccc ctctggcta gtcacacct gtaggctcct 900  
 ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcaattacc accacctca cagcacagac 960  
 agacactcag gacagcccag cggcgcgccc aggtaagttt agtcttttg tctttattt 1020  
 caggtcccgg atccgtgggt ggtgcaaatc aaagaactgc tctcagtgg atgttgcctt 1080  
 tactctagg cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtaccgc 1140  
 ggcccacc atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca 1200  
 gaagaagact ttaccaagt ggtgtaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagacat 1260  
 cgagaatctg tttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact 1320  
 gactggccag aagctgccc aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaact 1380  
 gaacaagct ctgagagtgc tgcagaaca caactggat ctggtgaata ttggcagtac 1440

tgatacgtg gacgggaacc aaaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca 1500  
 ctggcaggtg aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga 1560  
 gaagatcctg ctgtcttggg tgcggcagag caccgcgaac tateccccagg tgaacgtgat 1620  
 taacttcaact acatcctgga ggcacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag 1680  
 gcctgatctg ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgccctgga 1740  
 acatgccttc aatatacgtc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga 1800  
 tgtggacact acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca 1860  
 ggtgctgcca cagcaggtgt ctattgaage cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc 1920  
 ccccaagtgc actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca 1980  
 gattaccgtg agcctggctc agggatatga ggcaccagt agtccaaaac cacggttcaa 2040  
 gtctacgtct tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatccccctt 2100  
 tccatcccag cacctggagg ccccagagga caagagcttt ggggccagcc tgatggaaag 2160  
 cgaggatgaat ctggatcggg accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag 2220  
 tgctgaagac aactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggatgaagga 2280  
 tcagttccac acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg 2340  
 caatacctg cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga 2400  
 aacagaagtg caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc 2460  
 tagtatggag aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact 2520  
 gaaagagctg aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga 2580  
 gccactggga cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca 2640  
 ggaggatctg gaacaggagc aggtgcgggt gaactcctg acacatatgg tgggtggtgt 2700  
 ggacgaatct agtggagatc acgccaccgc cgcctggag gaacagctga aggtgctggg 2760  
 ggaccgtggg gccaacatft gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat 2820  
 cctgctgaaa tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga 2880  
 gaaagaggac gccgtgaaca agatccacac aaccggctft aaggatcaga acgaaatgct 2940  
 gtctagcctg cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat 3000  
 gggcaactg tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac 3060  
 ccagaagaca gaagcctggc tggataactt tccccctgc tgggacaacc tggtcagaa 3120  
 actggagaaa agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaaccagc ctagcctgac 3180  
 ccagacaacc gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcttgggtgaa 3240  
 acatgcccag gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaacce tggagcggct 3300  
 gcaggagctg caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat 3360  
 taaggggtct tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga 3420  
 aaagtggaag gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcattgtgaa 3480  
 cgatctggct agacagctga caaactggg catccagctg agccataca atctgagcac 3540  
 actggaggac ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg 3600  
 gcagctgcat gaggcccatc gcgactcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc 3660  
 cgtgcagggg cctggggaga gggccatttc tccaacaag gtgcctact atattaatca 3720  
 cgagaccag accactgtft gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc 3780  
 cgatctgaac aactgaggt tttagcctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca 3840

gaaggccctg tgectggatc tgetgtecet gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca 3900  
taatctgaag cagaacgac agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gctgaccac 3960  
tatctacgac aggctggagc aggagcacia caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga 4020  
tatgtgctg aactggctgc tgaactgta tgacctggg cgcaccggcc ggatcagagt 4080  
gctgagtttt aaaactggga ttatctccct gtglaaggcc cacctggagg acaagtacag 4140  
gtacctgtc aagcaggtg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gctgggact 4200  
gctgctgcat gatagatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gttcggagg 4260  
atctaacac gaaccagcg tgcgcagctg ttccagttt gccaataaca aacctgaaat 4320  
cgaggtgct ctgttctgg attggatg cctggaacca cagagcatgg tgtggtgcc 4380  
tgtctgcac agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg 4440  
caaggaatg cccattatc gctttcgta caggagtctg aaacatttta actacgatat 4500  
ttgccagagc tgettcttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat 4560  
ggtggaatat tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgt cgcgattttg ccaaggtgct 4620  
gaagaataag ttccggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc 4680  
agtgcagaca gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtgag cgcccgcaat 4740  
aaaagatct tatttcatt agatctgtgt gttggtttt tgtgtgcta gactcgacca 4800  
gagcatggct acgtagataa gtagcatggc ggttaatca ttaactacia ggaacccta 4860  
gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc tcaactgagc cgggcgacca 4920  
aaggctgccc gacccccgg cttgccccg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 4977



### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения мышечной дистрофии у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий стадию введения рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) rAAV.МНСК7.microdystrophin, где

rAAV вводят с использованием системного пути введения и в дозе, составляющей от приблизительно  $5,0 \times 10^{12}$  до приблизительно  $1,0 \times 10^{15}$  г. в./кг.

2. Способ по п.1, где системный путь введения представляет собой внутривенный путь, и вводимая доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг.

3. Способ по п.1 или п.2, где дозу rAAV вводят в концентрации приблизительно 10 мл/кг.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где rAAV вводят путем инъекции, инфузии или имплантации.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где rAAV вводят путем инфузии в течение приблизительно одного часа.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где rAAV вводят внутривенным путем в периферическую вену конечности.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где rAAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, SEQ ID NO: 1.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где rAAV содержит последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:7.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где rAAV относится к серотипу AAVrh.74.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где rAAV содержит конструкцию AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна или мышечную дистрофию Беккера.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где субъект-человек страдает мышечной дистрофией Дюшенна, и rAAV вводят путем внутривенной инфузии в течение приблизительно одного часа в дозе, составляющей приблизительно  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг, и где rAAV содержит конструкцию AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке субъекта увеличивается после введения rAAV по сравнению с уровнем экспрессии гена микродистрофина до введения rAAV.

14. Способ по п.13, где уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью вестерн-блота в биоптатах мышц до и после введения rAAV.

15. Способ по п.14, где уровень белка микродистрофина увеличивается на по меньшей мере 72% после введения rAAV по сравнению с уровнем микродистрофина до введения rAAV.

16. Способ по п.13, где уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

17. Способ по п.16, где уровень белка микродистрофина увеличивается на по меньшей мере 72% после введения гAAV по сравнению с уровнем микродистрофина до введения гAAV.

18. Способ по любому из пп. 1-12, где уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV.

19. Способ по п.18, где уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается на 87% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV.

20. Способ по любому из пп. 1-12, где количество волокон, положительных по микродистрофину, в мышечной ткани субъекта увеличивается после введения гAAV по сравнению с количеством волокон, положительных по микродистрофину, до введения гAAV.

21. Способ по п.20, где количество волокон, положительных по микродистрофину, определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью вестерн-блота в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

22. Способ по п.20, где количество волокон, положительных по микродистрофину, определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

23. Способ по любому из пп. 1-12, где уровень альфа-саркогликана у субъекта увеличивается после введения гAAV по сравнению с уровнем альфа-саркогликана до введения гAAV.

24. Способ по п.23, где уровень альфа-саркогликана определяют путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью вестерн-блота в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

25. Способ по п.23, где количество альфа-саркогликана определяют путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

26. Способ по любому из пп. 1-12, где уровень бета-саркогликана у субъекта увеличивается после введения гAAV по сравнению с уровнем бета-саркогликана до введения гAAV.

27. Способ по п.26, где уровень бета-саркогликана определяют путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью вестерн-блота в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

28. Способ по п.26, где количество бета-саркогликана определяют путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

29. Способ по любому из пп. 1-12, где прогрессия заболевания у субъекта замедляется после введения гAAV, что измеряют с помощью любого из следующего: теста с шестиминутной ходьбой, времени подъема, подъема на 4 ступеньки, подъема и спуска на 4 ступеньки, системы амбулаторной оценки North Star (NSAA), теста на время прохождения 10 метров, теста на время прохождения 100 метров, ручной динамометрии (ННД), теста с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени и/или балла по шкале подтеста оценки крупной моторики (Бейли-III).

30. Способ по п.29, где у субъекта наблюдается улучшение балла NSAA на по меньшей мере 6 пунктов через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению с баллом NSAA до введения гAAV.

31. Способ по п.29, где у субъекта наблюдается улучшение времени подъема на по меньшей мере 0,8 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению со временем подъема до введения гAAV.

32. Способ по п.29, где у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время подъема на 4 ступеньки на по меньшей мере 1,2 секунды через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению с тестом на время подъема на 4 ступеньки до введения гAAV.

33. Способ по п.29, где у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время прохождения 100 м на по меньшей мере 7 секунд через по меньшей мере 270 дней после введения гAAV по сравнению с тестом на время прохождения 100 м до введения гAAV.

34. Способ обеспечения экспрессии гена микродистрофина в клетке пациента, включающий введение пациенту конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

35. Способ по п.34, где уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке пациента определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью вестерн-блота в биоптатах мышц до и после введения конструкции гAAV.MHCK7.micro-dystrophin.

36. Способ по п.34, где уровень экспрессии гена микродистрофина в клетке пациента определяют путем измерения уровня белка микродистрофина с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения конструкции гAAV.MHCK7.micro-dystrophin.

37. Способ по п.34, где уровень экспрессии гена микродистрофина измеряют у пациента путем определения во сколько раз количество копий генома гAAV-вектора на ядро больше, чем 1.

38. Способ уменьшения уровней СК в сыворотке крови у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту конструкции AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

39. Способ по п.38, где уровень СК в сыворотке крови у пациента снижается на по

меньшей мере 87% через 60 дней после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV.

40. Способ увеличения количества волокон, положительных по микродистрофину, в мышечной ткани пациента, включающий введение пациенту конструкции AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

41. Способ по п.40, где количество волокон, положительных по микродистрофину, определяют путем измерения уровня белка дистрофина с помощью вестерн-блота в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

42. Способ по п.40, где количество волокон, положительных по микродистрофину, определяют путем измерения уровня белка дистрофина с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

43. Способ по п.40, где количество волокон, положительных по микродистрофину, измеряют путем определения во сколько раз количество копий генома гAAV-вектора на ядро больше, чем 1.

44. Способ увеличения уровня экспрессии альфа-саркогликана у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту конструкции AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

45. Способ по п.44, где уровень альфа-саркогликана определяют путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью вестерн-блота в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

46. Способ по п.44, где количество альфа-саркогликана определяют путем измерения уровня белка альфа-саркогликана с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

47. Способ увеличения уровня экспрессии бета-саркогликана у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту конструкции AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

48. Способ по п.47, где уровень бета-саркогликана определяют путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью вестерн-блота в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

49. Способ по п.47, где количество бета-саркогликана определяют путем измерения уровня белка бета-саркогликана с помощью иммуногистохимического анализа в биоптатах мышц до и после введения гAAV.

50. Способ лечения пациента с мышечной дистрофией Дюшенна или мышечной дистрофией Беккера, включающий введение пациенту конструкции AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3 таким образом, чтобы прогрессия заболевания у пациента замедлилась, что измеряют с помощью любого из следующего: теста с

шестиминутной ходьбой, времени подъема, подъема на 4 ступеньки, подъема и спуска на 4 ступеньки, системы амбулаторной оценки North Star (NSAA), теста на время прохождения 10 метров, теста на время прохождения 100 метров, ручной динамометрии (HND), теста с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени и/или балла по шкале подтеста оценки крупной моторики (Бейли-III).

51. Способ по п.50, где у субъекта наблюдается улучшение балла NSAA на по меньшей мере 6 пунктов через по меньшей мере 90 дней после введения гAAV по сравнению с баллом NSAA до введения гAAV.

52. Способ по п.50, где у субъекта наблюдается улучшение времени подъема на по меньшей мере приблизительно 0,8 секунды через по меньшей мере 90 дней после введения гAAV по сравнению со временем подъема до введения гAAV.

53. Способ по п.50, где у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время подъема на 4 ступеньки на по меньшей мере приблизительно 1,2 секунды через по меньшей мере 90 дней после введения гAAV по сравнению с тестом на время подъема на 4 ступеньки до введения гAAV.

54. Способ по п.50, где у субъекта наблюдается улучшение в тесте на время прохождения 100 м на по меньшей мере 7 секунд через по меньшей мере 90 дней после введения гAAV по сравнению с тестом на время прохождения 100 м до введения гAAV.

55. Композиция для лечения мышечной дистрофии у субъекта-человека, нуждающегося в этом, где композиция содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV) гAAV.МНСК7.microdystrophin, где композиция составлена для системного пути введения, и доза гAAV составляет от приблизительно  $5 \times 10^{12}$  г. в./кг до приблизительно  $1,0 \times 10^{15}$  г. в./кг.

56. Композиция по п.55, где системный путь введения представляет собой внутривенный путь введения, и доза гAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг.

57. Композиция по п.55 или п.56, где доза гAAV составляет приблизительно 10 мл/кг.

58. Композиция по любому из пп. 55-57, где композиция составлена для введения путем инъекции, инфузии или имплантации.

59. Композиция по любому из пп. 55-57, где композиция составлена для введения путем инфузии в течение приблизительно одного часа.

60. Композиция по любому из пп. 55-57, где доза композиции составлена для внутривенного введения в периферическую вену конечности.

61. Композиция по любому из пп. 55-60, где гAAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, SEQ ID NO: 1.

62. Композиция по любому из пп. 55-61, где гAAV содержит последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:7.

63. Композиция по любому из пп. 55-62, где гAAV относится к серотипу AAVrh.74.

64. Композиция по любому из пп. 55-63, где гAAV содержит конструкцию AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9

или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

65. Композиция по любому из пп. 55-64, где мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна или мышечную дистрофию Беккера.

66. Композиция для лечения мышечной дистрофии Дюшенна у субъекта-человека, нуждающегося в этом, где композиция содержит рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) rAAV.МНСК7.microdystrophin, где

композиция составлена для введения путем внутривенной инфузии в течение приблизительно одного часа в дозе, составляющей приблизительно  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг, и

где rAAV содержит конструкцию AAVrh7.4.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

67. Применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) rAAV.МНСК7.microdystrophin для получения лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии у субъекта-человека, нуждающегося в этом, где лекарственное средство составлено для системного пути введения и содержит дозу rAAV, составляющую от приблизительно  $1 \times 10^{14}$  г. в./кг до приблизительно  $4 \times 10^{14}$  г. в./кг.

68. Применение по п.59, где лекарственное средство составлено для внутривенного введения, и доза rAAV составляет приблизительно  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг.

69. Применение по п.67 или п.68, где доза rAAV составляет приблизительно 10 мл/кг.

70. Применение по любому из пп. 67-69, где лекарственное средство составлено для введения путем инъекции, инфузии или имплантации.

71. Применение по любому из пп. 67-69, где лекарственное средство составлено для введения путем инфузии в течение приблизительно одного часа.

72. Применение по любому из пп. 67-69, где лекарственное средство составлено для внутривенного введения в периферическую вену конечности.

73. Применение по любому из пп. 67-72, где rAAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую микродистрофин человека, SEQ ID NO: 1.

74. Применение по любому из пп. 67-73, где rAAV содержит последовательность промотора МНСК7 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:7.

75. Применение по любому из пп. 67-74, где rAAV относится к серотипу AAVrh.74.

76. Применение по любому из пп. 67-74, где rAAV содержит конструкцию AAVrh74.МНСК7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

77. Применение по любому из пп. 67-75, где мышечная дистрофия представляет собой мышечную дистрофию Дюшенна или мышечную дистрофию Беккера.

78. Применение рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) rAAV.МНСК7.microdystrophin для получения лекарственного средства для лечения мышечной дистрофии Дюшенна у субъекта-человека, нуждающегося в этом, где лекарственное средство составлено для введения путем внутривенной инфузии в течение

приблизительно одного часа и содержит дозу гAAV, составляющую приблизительно  $2 \times 10^{14}$  г. в./кг, и где гAAV содержит конструкцию AAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 9 или нуклеотидами 55-5021 из SEQ ID NO: 3.

79. Способ по любому из пп. 1-54, где уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается после введения гAAV по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения гAAV на уровень в процентах, выбранный из группы, состоящей из следующих:

- a) по меньшей мере 78% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- b) по меньшей мере 46, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 или 85% через 270 дней после введения;
- c) по меньшей мере 72, 73, 74 или 95% через 180 дней после введения;
- d) по меньшей мере 87, 88, 93 или 95% через 90 дней после введения;
- e) по меньшей мере 70% через 270 дней после введения;
- f) от 70 до 95% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- g) по меньшей мере 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения; и
- h) по меньшей мере 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения.

80. Композиция по любому из пп. 55-66, где после введения указанной композиции субъекту-человеку, нуждающемуся в лечении мышечной дистрофии, уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается по сравнению с уровнем СК в сыворотке крови до введения композиции на уровень в процентах, выбранный из группы, состоящей из следующих:

- a) по меньшей мере 78% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- b) по меньшей мере 46, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 или 85% через 270 дней после введения;
- c) по меньшей мере 72, 73, 74 или 95% через 180 дней после введения;
- d) по меньшей мере 87, 88, 93 или 95% через 90 дней после введения;
- e) по меньшей мере 70% через 270 дней после введения;
- f) от 70 до 95% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- g) по меньшей мере 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения; и
- h) по меньшей мере 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения.

81. Применение по любому из пп. 67-78, где уровень СК в сыворотке крови у субъекта снижается после введения гAAV субъекту по сравнению с уровнем СК в

сыворотке крови до введения rAAV на уровень в процентах, выбранный из группы, состоящей из следующих:

- a) по меньшей мере 78% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- b) по меньшей мере 46, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 или 85% через 270 дней после введения;
- c) по меньшей мере 72, 73, 74 или 95% через 180 дней после введения;
- d) по меньшей мере 87, 88, 93 или 95% через 90 дней после введения;
- e) по меньшей мере 70% через 270 дней после введения;
- f) от 70 до 95% через 90, 180 или 270 дней после введения;
- g) по меньшей мере 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения; и
- h) по меньшей мере 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% через 90, 180 или 270 дней после введения.

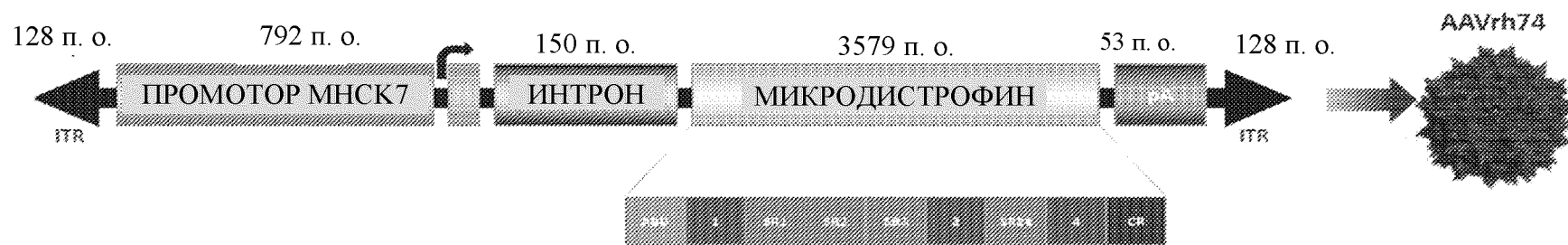
82. Композиция, содержащая:

- a) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3,
- b) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8,
- c) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9,
- d) rAAV, содержащий нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3,
- e) rAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9,
- f) rAAV, содержащий нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8,
- g) частицы rAAV, содержащие нуклеотиды 55-5021 из SEQ ID NO: 3,
- h) частицы rAAV, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9, или
- i) частицы rAAV, содержащие нуклеотиды 1-4977 из SEQ ID NO: 8.

По доверенности



Фигура 1



## Фигура 2

SEQ ID NO 3

rAAVrh74.МНСК7.microdystrophin

**Основные признаки:****ITR**Промотор МНСК7Последовательность химерного интронаПоследовательность микродистрофина человекаПоли-А-хвостУстойчивость к ампициллину

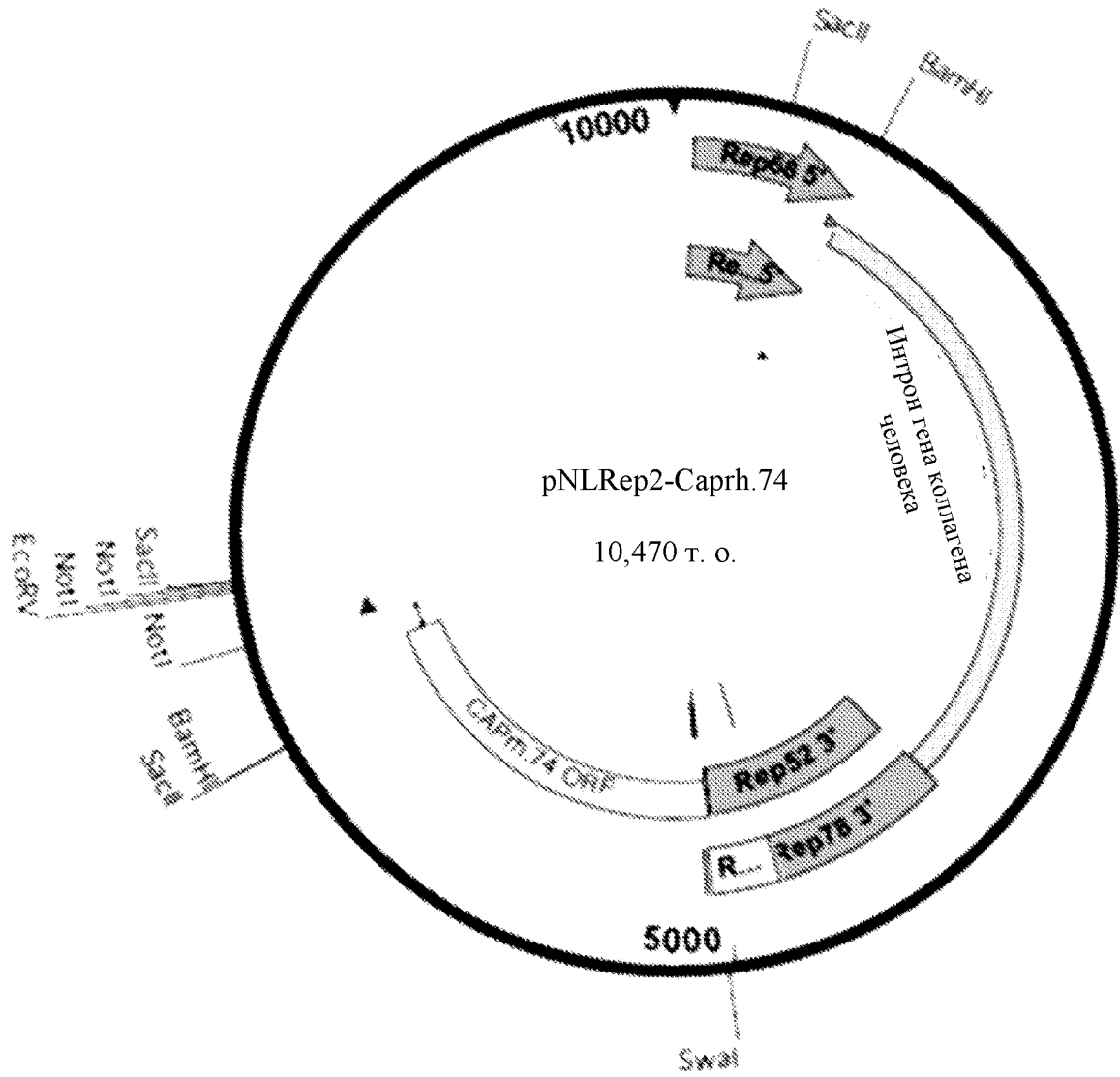
GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGCG  
CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC  
TTTGGTCCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA  
ACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCT  
ACGTAGCCATGCTCTAGAgtttaaacaaagcttgcagctgctaaagctagacccttcagattaaaaataactgaggttaagggcct  
gggtagggaggtggtgtagacgctcctgtctctccctctctgcccacggcccttggggaggaggaaatgcccgaaggactaaaaaa  
agcccatggagccagagggcgagggaacagaccttcatgggcaaacctggggcctgctgctagcatgccccactacgggtcta  
ggctgccatgtaaggaggcaagggcctggggacacccgagatgcctggtataaataaccagacatgtggctgcccccccccccaac  
acctgctgctctaaaaataacctgtccctggtgatcccctgcagcgaagatcttgaacaaggctgtgggggactgaggcaggctg  
taacagcttggggccaggccttatacgtcctgggactcccaagtaactgttccatgttccggcgaaggccagctgtccccgc  
cagctagactcagcaactagtttaggaaccagtgaagcaagtcagccctggggcagcccatacaaggccatgggctgggcaagctgca  
gctgggtccggggtggggcaggtgcccgggcaacagctgaaagctcatctgctctcaggggccccctcctggggacagcccctcctg  
gctagtcacaccctgtaggctcctctatataaccaggggcacaggggctgcccctcattctaccaccacctccacagcacagacagact  
caggagcagccagcggcgcgcccAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTCAGGTCCC GGAT  
CCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAAGTCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAG  
GCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGC  
CACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGA  
AGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCAC  
ATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAA  
GGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCT  
GAACAACGTGAACAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTGGTGA  
ATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCTGATCT  
GGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGG  
CTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCG  
CAACTATCCCAGGTGAACGTGATTAACCTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGC  
CCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTGACTGGAATAGCGTGGT  
GTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCA  
GCTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCCAGATA  
AAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGT

CTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCAAAGTGA  
CTAAAGAGGAGCATTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGC  
CTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAGTCTACGC  
TTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAAGTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTCCATC  
CCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCG  
AGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTG  
AGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGT  
GAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGG  
GGCGCTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAACTGATCGGCACCGGGAAACTG  
AGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCT  
GGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTGCTG  
ATGGACCTGCAGAACAGAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAGACTGA  
GGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTG  
AAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGG  
TGCGGGTGAACCTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGAT  
CACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGGGCCAA  
CATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAAT  
GGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAG  
GACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATGCTGTC  
TAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCAGAGCA  
TGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCCTGAAGAACAAGAGC  
GTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGACAACCT  
GGTGCAGAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCC  
AGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAACCCGC  
GAACAGATCCTGGTGAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCCAGAA  
GAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAACCTGGAC  
CTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGCGATCT  
GCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGGCGAAA  
TTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACA  
ACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATAAATCTGAGCACACTGGAGGACCTGAATAC  
CAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAAGACCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGG  
CCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGCAGGGC  
CCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGAGACCC  
AGACCACTTGTGGGACCATCCCAAGATGACAGAAGCTGTACCAGTCCCTGGCCGATC  
TGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCGCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAG  
AAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCCTGCGATGCCCTGGATCAG  
CATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTG  
ACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACACAACCTGGTGAACGTGCCTCT  
GTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACACTGGGCGCACCGG  
CCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAGGCCACCT  
GGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTG  
ACCAGCGCCGCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGG  
GAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCC  
AGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCCTGGATTGGATGCGCC  
TGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAA  
ACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCATTATCGGCTTT

CGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCG  
GAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGGAATATTGCACCCCA  
ACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGG  
ACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGT  
GCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGtgaGCGGCCGCAATAAAAGATCT  
TTATTTTCATTAGATCTGTGTGTGGTTTTTTGTGTGTCTAGAGCATGGCTACGTAGA  
TAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG  
GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT  
CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC  
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG  
CCTGAATGGCGAATGGCGATTCCGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATA  
TTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTA  
ATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTAAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCG  
GTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTA  
AAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCA  
CGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGC  
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC  
GCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTC  
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCG  
ACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA  
CGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTC  
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTG  
CCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGCAAT  
TTTAACAAAAATATTAACGCTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTGTTTT  
TGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATT  
ACCGTTCATCGATTCTCTTGTGTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTT  
GTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGG  
TTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATC  
TTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTT  
TATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTT  
TTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATT  
CTTTGCCTTGCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAATCGCCTGATGCGGIATTTTCTC  
CTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCT  
CTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT  
GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA  
GCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGC  
CTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGT  
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAAT  
ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA  
TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTT  
GCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGAT  
GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG  
TAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA  
AGTICTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGG  
TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAA  
GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA

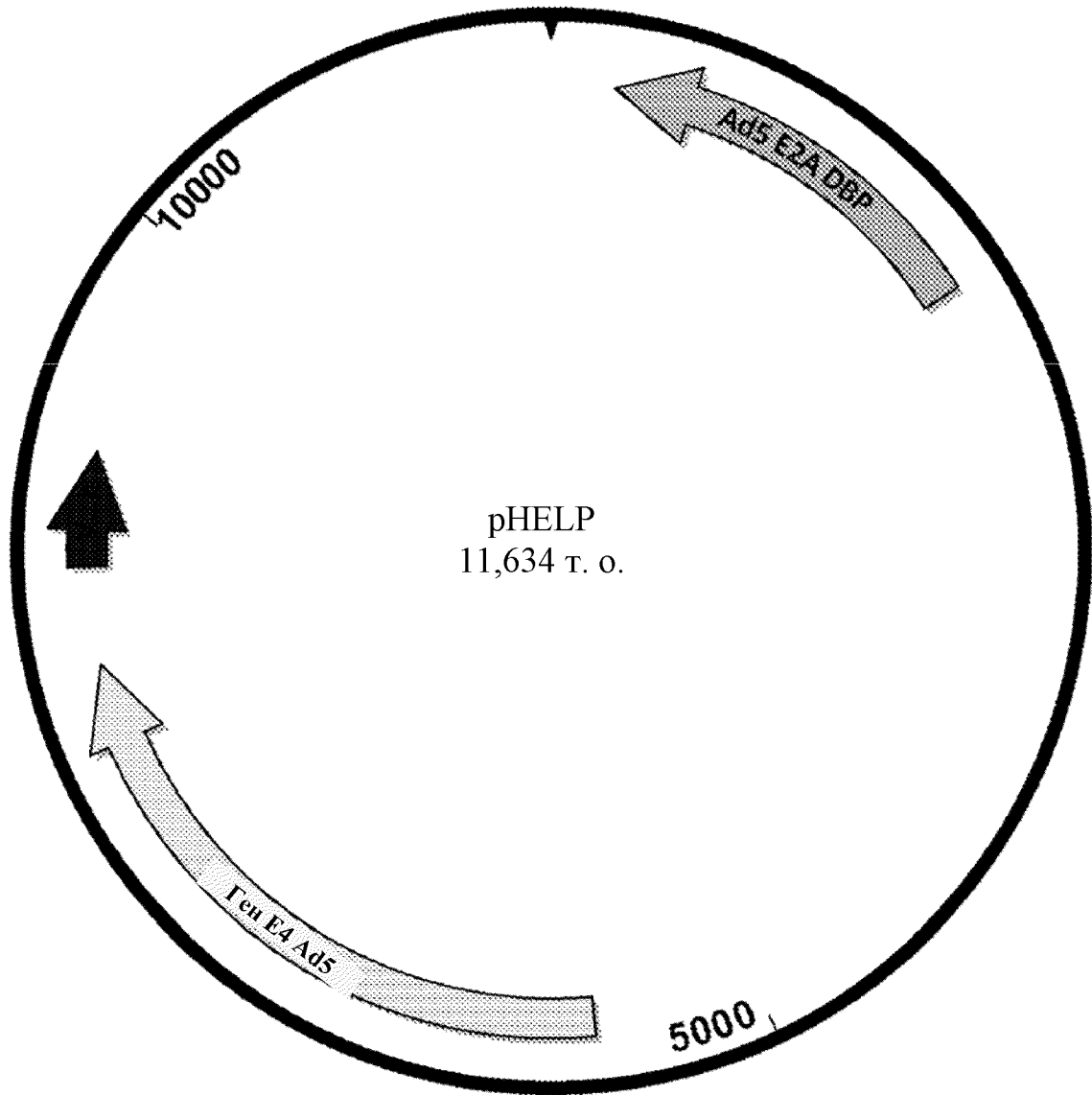
GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA  
ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG  
GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAAT  
GGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA  
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGG  
CCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTC  
GCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCT  
ACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA  
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTT  
AGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA  
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCC  
CGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGC  
TTGCAAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCT  
ACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT  
TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC  
ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG  
TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCT  
GAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTG  
AGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGC  
GGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT  
CCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTTCGCCACCTCTGACTT  
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAG  
CAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTC  
CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAC  
CGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAA  
GAGC

Фигура 3

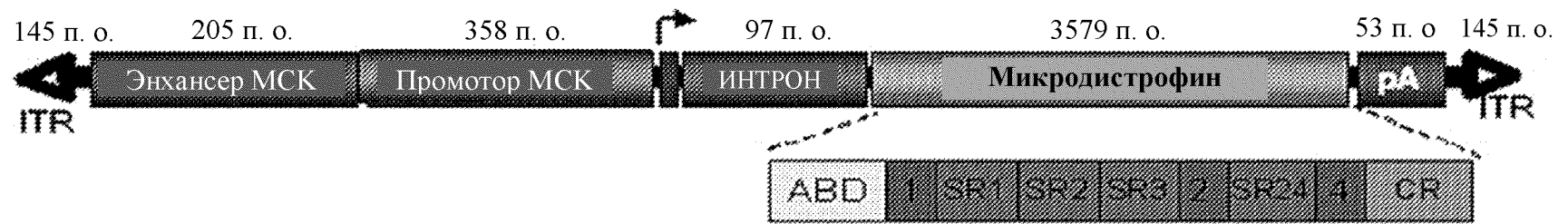


7/30

Фигура 4



Фигура 5





## Фигура 6

SEQ ID NO 5'

rAAVrh74.MCK.micro-dystrophin

**Основные признаки:****ITR**Промотор МСКПоследовательность химерного интронаКодон-оптимизированная последовательность микродистрофина человека -**Поли-А-хвост**Устойчивость к ампициллинуОстов плазмиды рGEX с точкой начала репликации рBR322

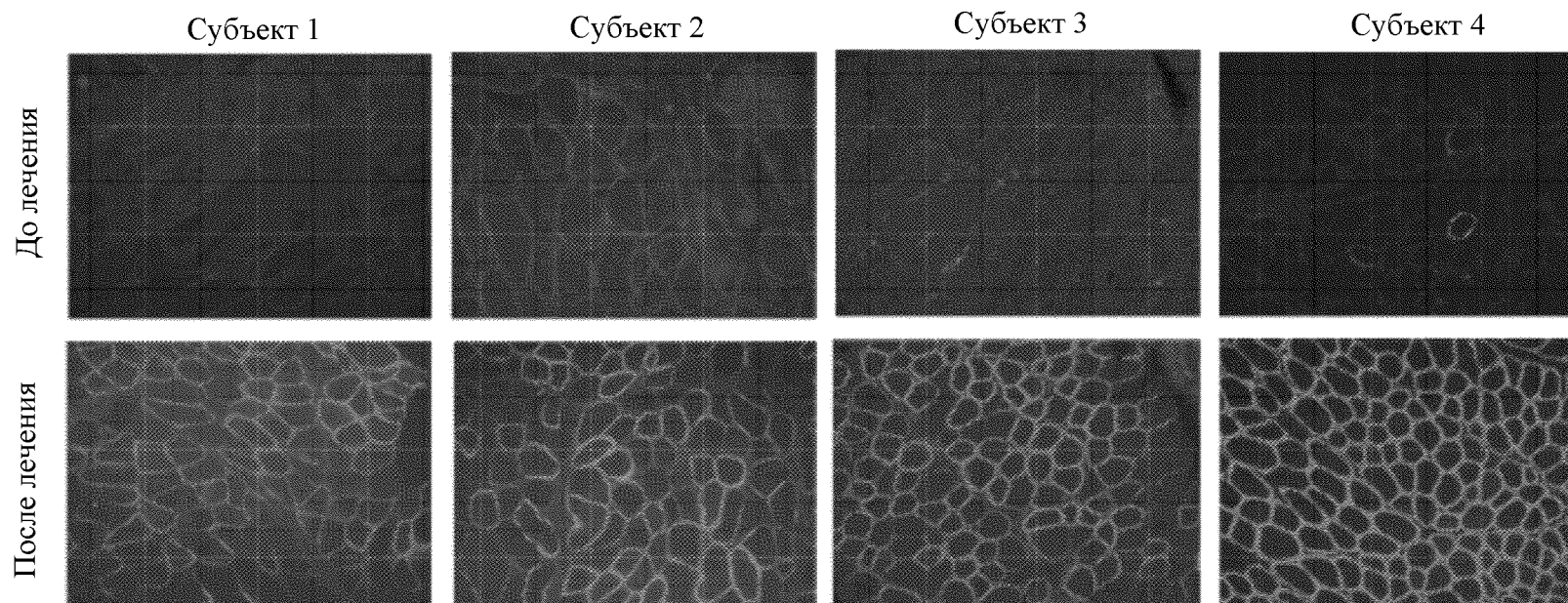
GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA  
GGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA  
GAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGC  
 CATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTG  
GTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCCCACCCGGTGCC  
TGGGTCTTAGGCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGGCTGTGGGGG  
ACTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCA  
TGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAAGTGAGCAAGTCAG  
CCCTTGGGGCAGCCATAACAAGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCC  
GGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCTCCCTGGGGACAGCCCTCCTGGCTAGTCACACCT  
GTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCGGGTCAACACCACCTCCACAGCACAGACAGACA  
 CTCAGGAGCCAGCCAGCCAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTATTTAGGTCCCAGGATCCGGTGGTGGTGCAAA  
 TCAAAGAAGTCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTG  
CGGAATTGTACCCGCGCCGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGC  
AGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATCGAGAATCTGTTTT  
CCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAG  
GGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGTGCAGAACAACAACGTGGATCT  
GGTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCTGATCTGGAACATTATTCT  
GCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGCTGCAGCAGACCAATTCGAGAAGATCCTGC

TGCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGCAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACCTCACTACATCCTGGAGCGACG  
GGCTGGCCCTGAATGCTCTGATTACAGCCACAGGCCTGATCTGTTGACTGGAATAGCGTGGTGTGCCAGCAGT  
CTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCAGCTGGGGATCGAAAACTGCTGGACCCAG  
AGGATGTGGACACTACATACCCAGATAAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACA  
GCAGGTGTCTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCAAAGTGACTAAAGAGGAGCATTI  
TCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAG  
TCCAAAACCACGGTTCAAGTCTACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCT  
TTCCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCGAGGTGAATCTG  
GATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCAGGG  
CGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGTGAAGGATCAGTTCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGC  
TCACCAGGGGCGCGTGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAACTGATCGGCACCGGAAACTGAGTGAGGACG  
AGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGA  
GAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTGTGATGGACCTGCAGAACCAGAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGA  
CAAAGACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTGAAGAGACA  
GGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGTGCGGGTGAACCTCCCTGACACATATGG  
TGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGAC  
CGGTGGGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAATGGCAGAG  
GCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTAGTGCTTGCTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAA  
CCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATGCTGTCTAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAA  
AGAAGCAGAGCATGGGCAAAGTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCTGAAGAACAAGAGCGTGACC  
CAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGTCTGGGACAACCTGGTGCAGAACTGGAGAAAAGTAC  
AGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAACCGTGACCACC  
GTGACAACCCGCGAACAGATCCTGGTGAACATGCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCCAGAAGAAGAGA  
ACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAACTGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGAT  
TAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGCGATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCT  
GAGAGGCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGG  
GCATCCAGCTGAGCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTG  
TGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTCTGAGCACAT  
CCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCA  
CTTGTTGGGACCATCCAAGATGACAGAACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTA  
CAGAACCCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCTGCGA  
TGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACT

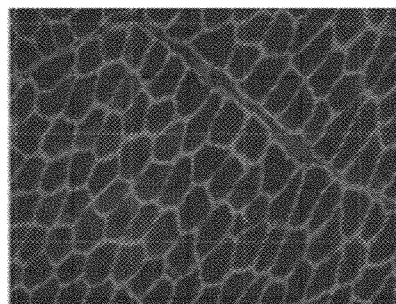
ATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAAACCTGGTGAACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGG  
CTGCTGAACGTGTATGACACTGGGCGCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAACTGGGATTATCTCCCTGT  
GTAAGGCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTGTGACCAGC  
GCCGCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGAT  
CTAACATCGAACCCAGCGTGCAGCTGTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCT  
GGATTGGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAACTG  
CCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCATTATCGGCTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATT  
TAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGT  
GAAATATTGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTA  
AGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTCTGGAAGGAGACAATATGGAG  
ACCGATACAATGTGAGCGGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGCTA  
GAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTAAATCATTAACTACA**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC**  
**CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCAGCGCCGGGCTTTGCCCG**  
**GGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC**CAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAA  
CAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTTCAGACGATTGAGCGTCAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTT  
TTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGGATTCTTCTACTCA  
GGCAAGTGATGTTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTAAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTACTC  
GGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCTGTCTAAAATCCCTTAAATCGGCCT  
CCTGTTTAGCTCCCCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCC  
CTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC  
GCCCCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTGCCACGTTGCGCGCTTTCCCCGTAAGCTCTAAATCGGGGGCT  
CCCTTAGGGTCCGATTTAGTGATTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGT  
GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCA  
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGGTT  
AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTT  
ATACAATCTTCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTACGATTAC  
CGTTCATCGATTCTTGTGTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTAAAAATAG  
CTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTT  
TCTACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAATATATGAGGGTCTAAAAATTTTAT  
CCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTT  
ATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATCTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAAGTTCCTG  
ATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGAT

GCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCAT  
CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGC  
GAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGT  
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT  
GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCC  
CTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAA  
GATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC  
GAAGAAGTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC  
AAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGAAAAGCATCT  
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTT  
CTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGAT  
CGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAAC  
AACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCG  
GATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG  
AGCGTGGGTCTCGCGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC  
GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT  
AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGA  
AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA  
AAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACC  
AGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTCAGCAGAGCGCAGATA  
CCAAATACTGTCCTTCTAGTGAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCGTACATACCTCGC  
TCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAG  
TTACCGGATAAGGCGCAGCGTGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA  
CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGT  
ATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTTGGTATCTTTAT  
AGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA  
AAAAAGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGGTGGCCTTTTGGTGCATGTTCTTCTGCGTTAT  
CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGGGTTTGAAGTGAAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGC  
GCAGCGAGTCAAGTGAAGCGACCAAGCGGAAGAGC

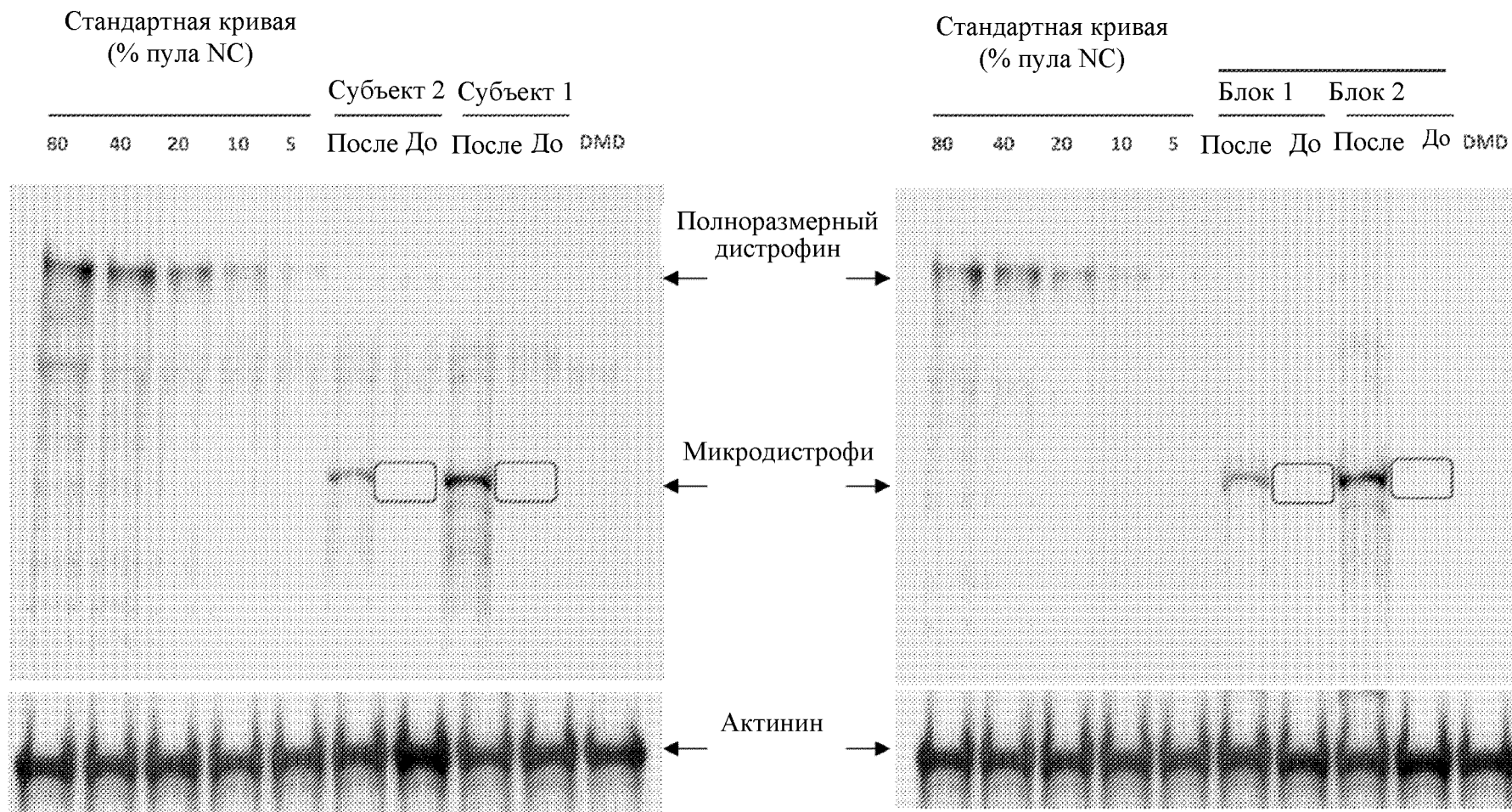
Фигура 7  
Экспрессия микродистрофина (ИНС)



Нормальный контроль

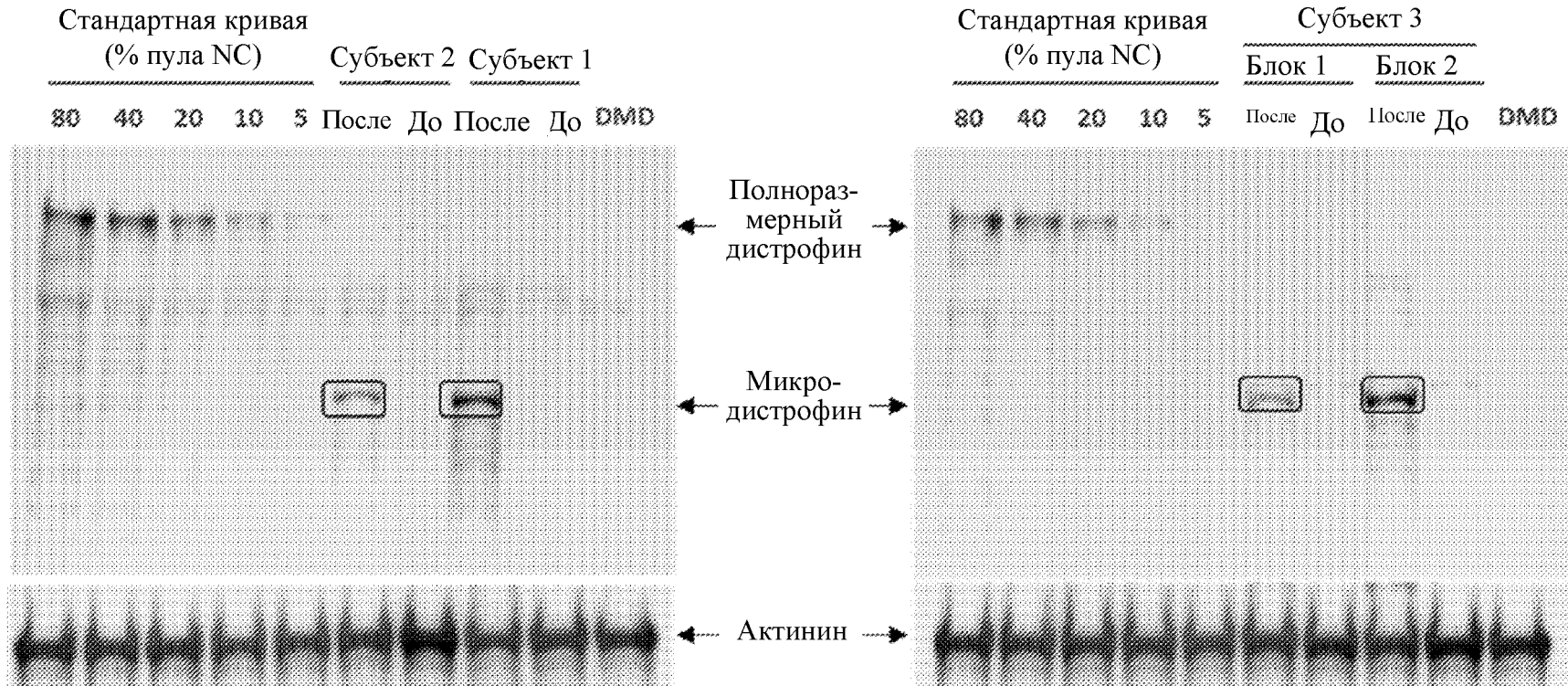


Фигура 8А



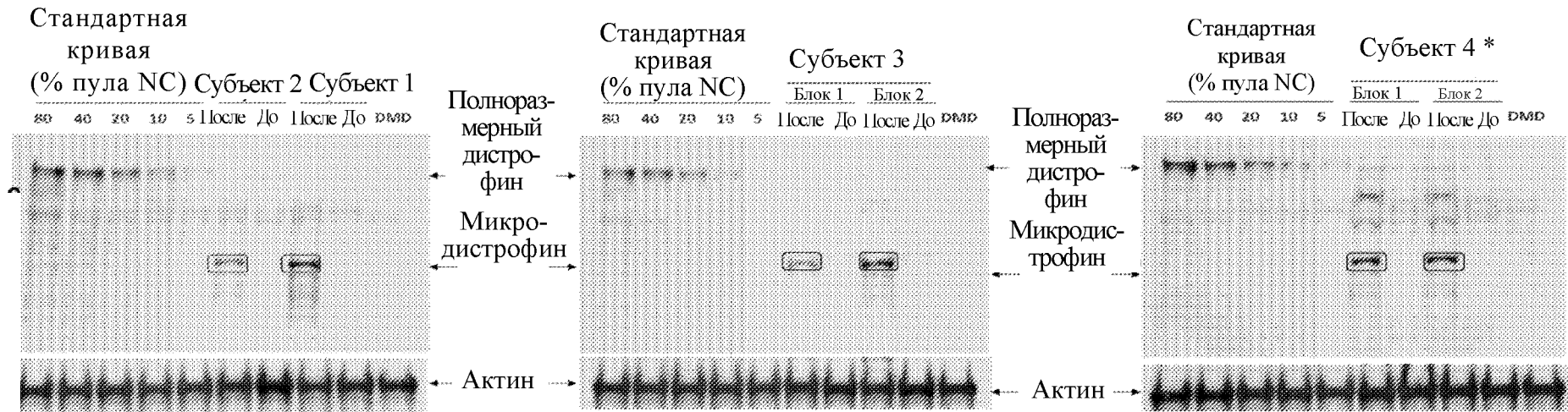


Фигура 8В



Способ количественного определения с	Средний уровень экспрессии микродистрофина по сравнению с нормой
Способ 1	36,5% (без поправки на жировую и фиброзную ткани)
Способ 2	53,7% (с поправкой на жировую и фиброзную ткани)

Фигура 8С

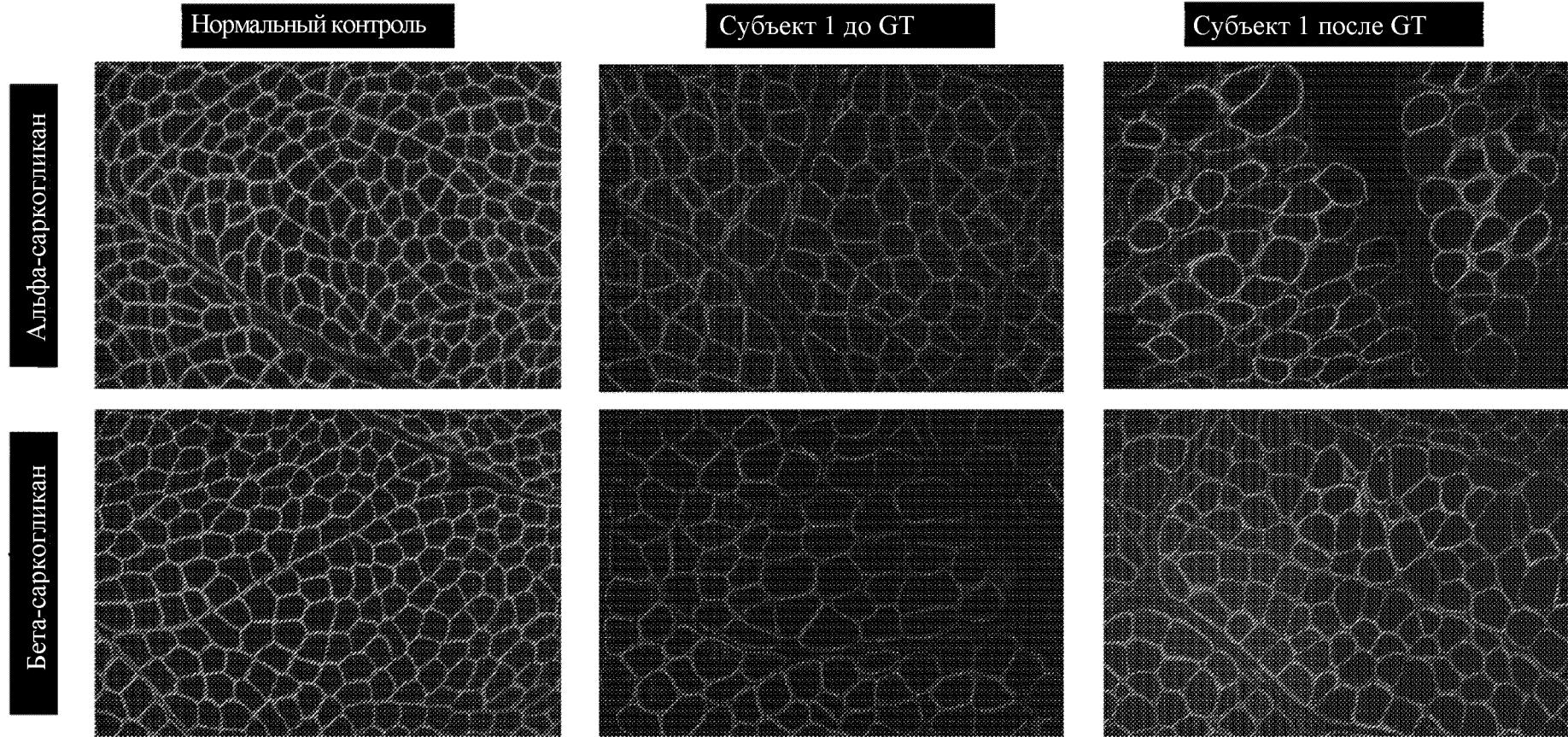


16/30

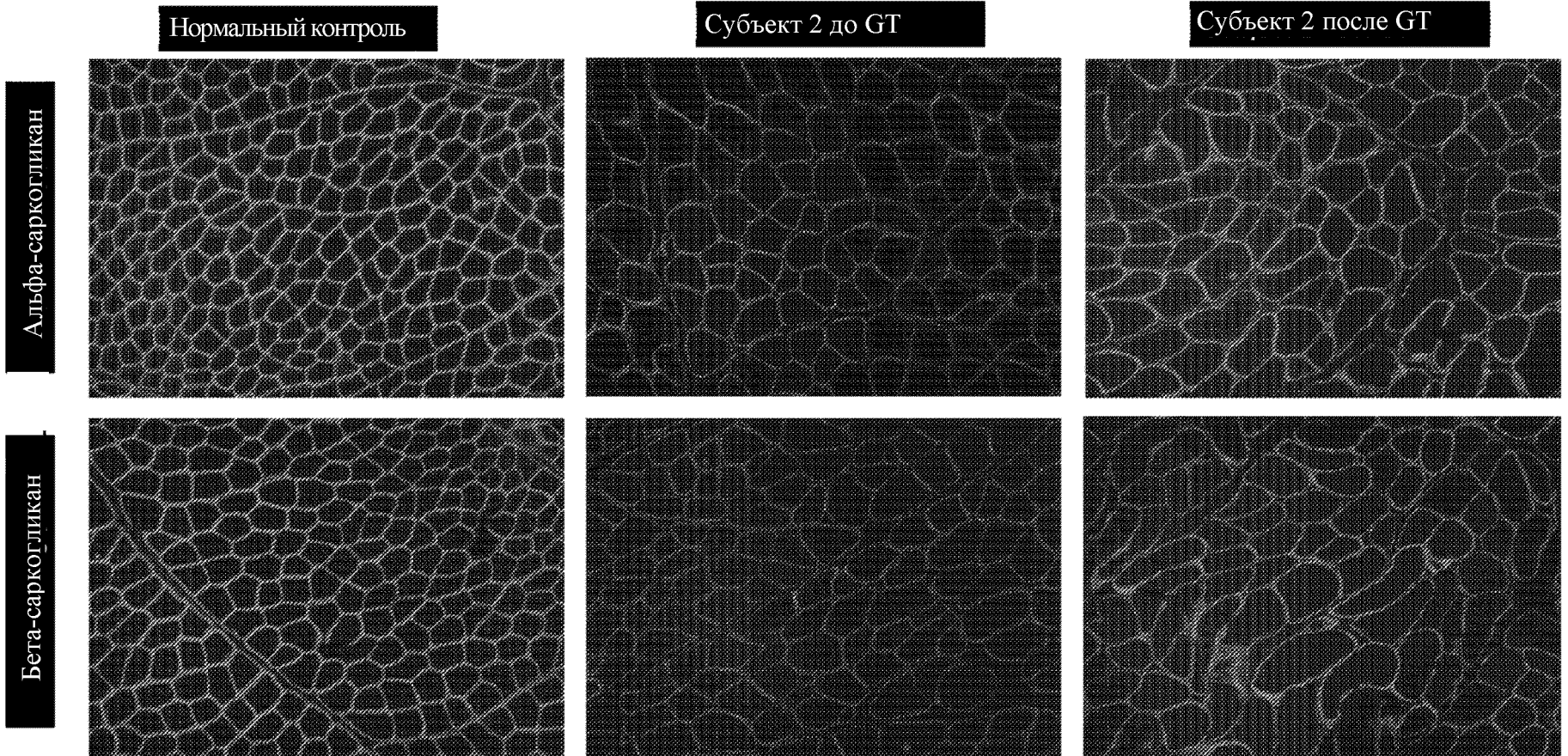
Способ количественного	Средний уровень экспрессии микродистрофина (N = 4) по сравнению с нормой
Способ 1	74,3% (без поправки на жировую и фиброзную ткани)
Способ 2	95,8% (с поправкой на жировую и фиброзную ткани)



Фигура 9А



Фигура 9В



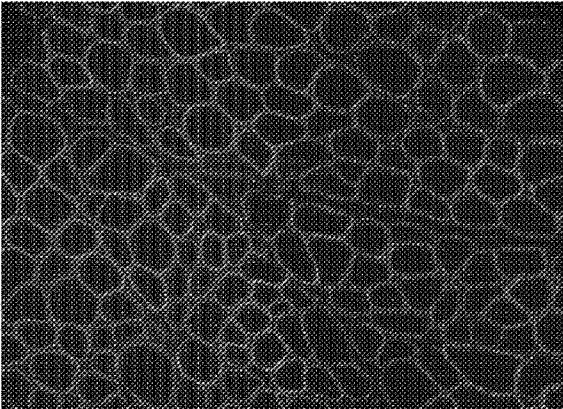
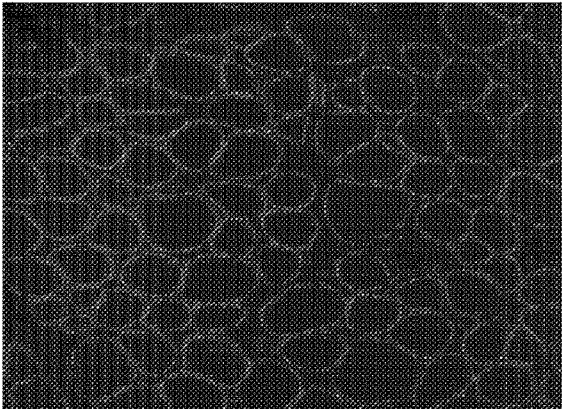
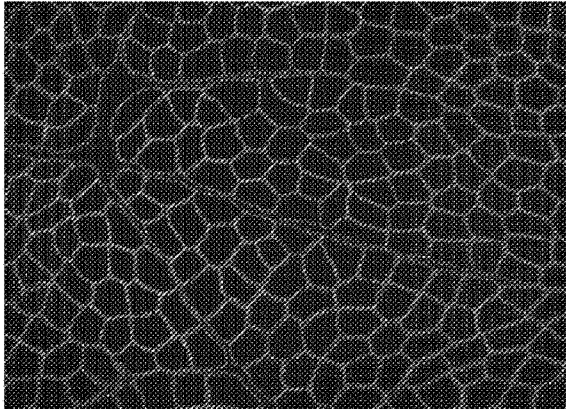
Фигура 9С

Нормальный контроль

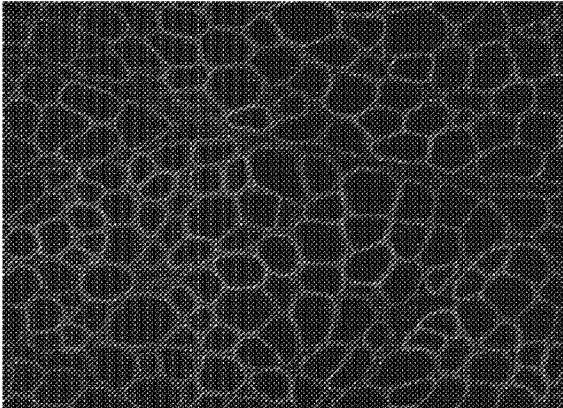
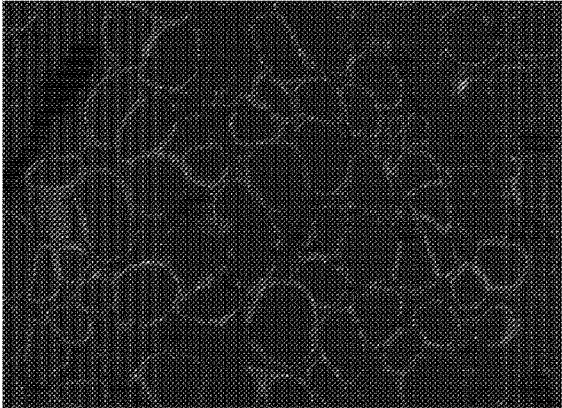
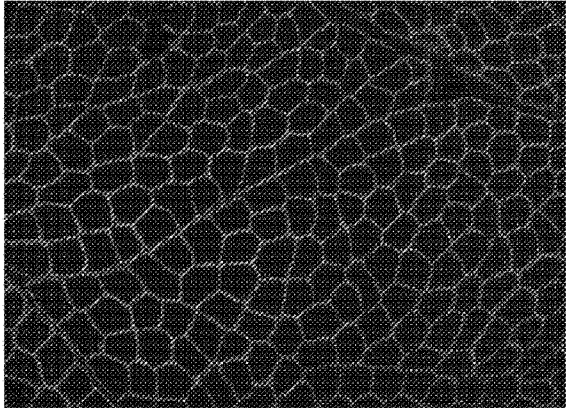
Субъект 3 до GT

Субъект 3 после GT

Альфа-саркоглиян

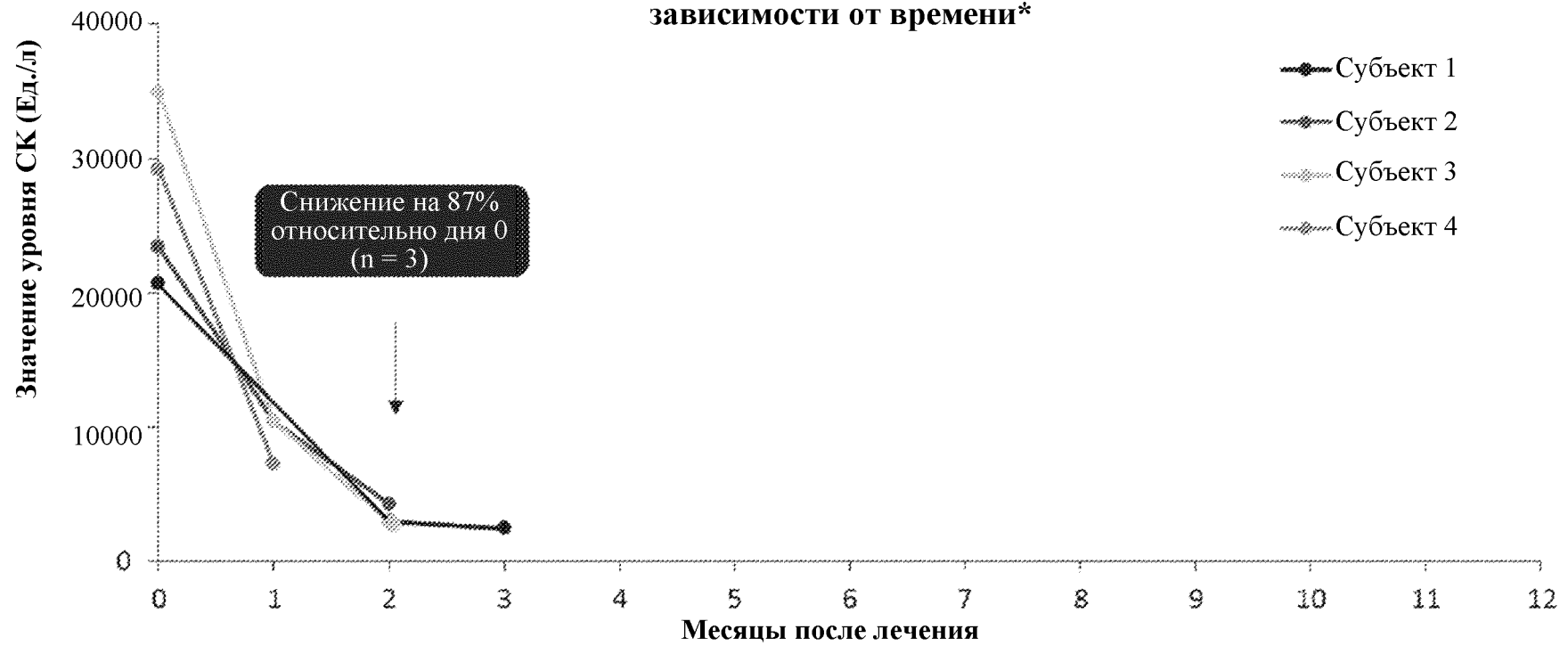


Бета-саркоглиян



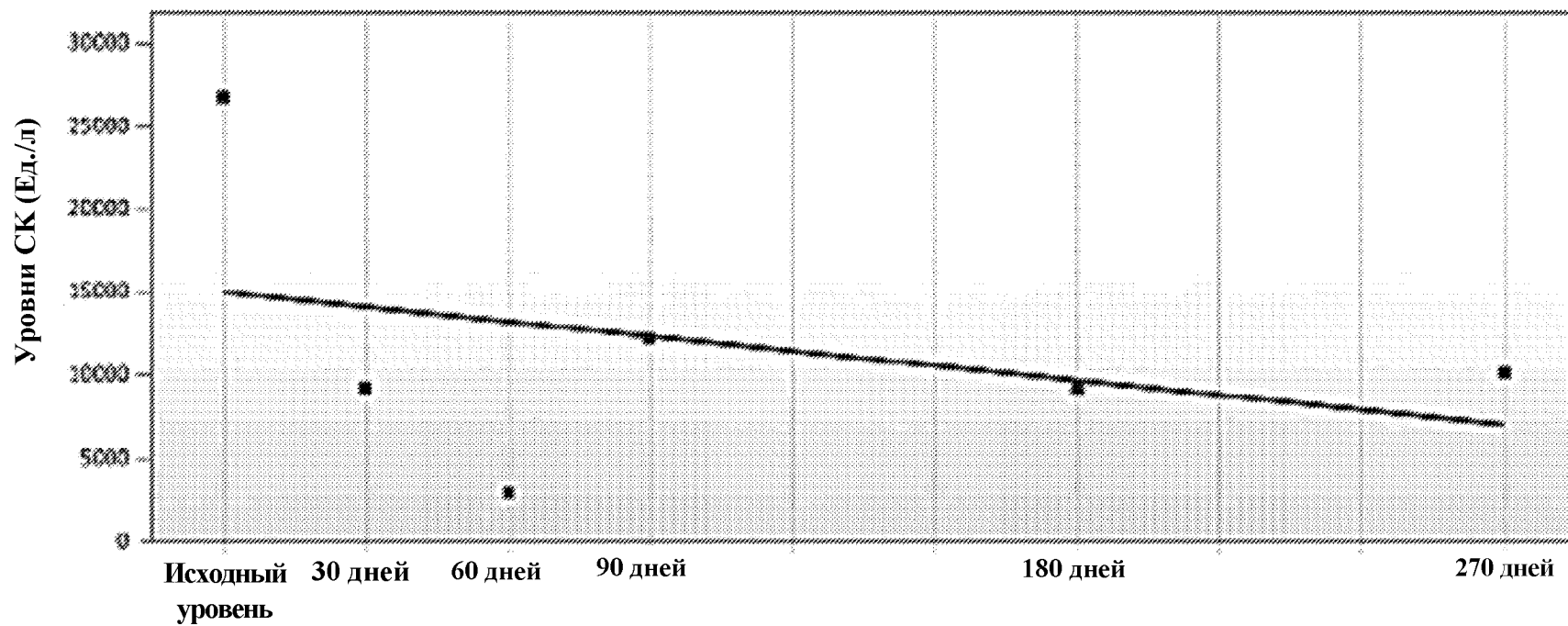
Фигура 10

Значения уровня СК в зависимости от времени\*



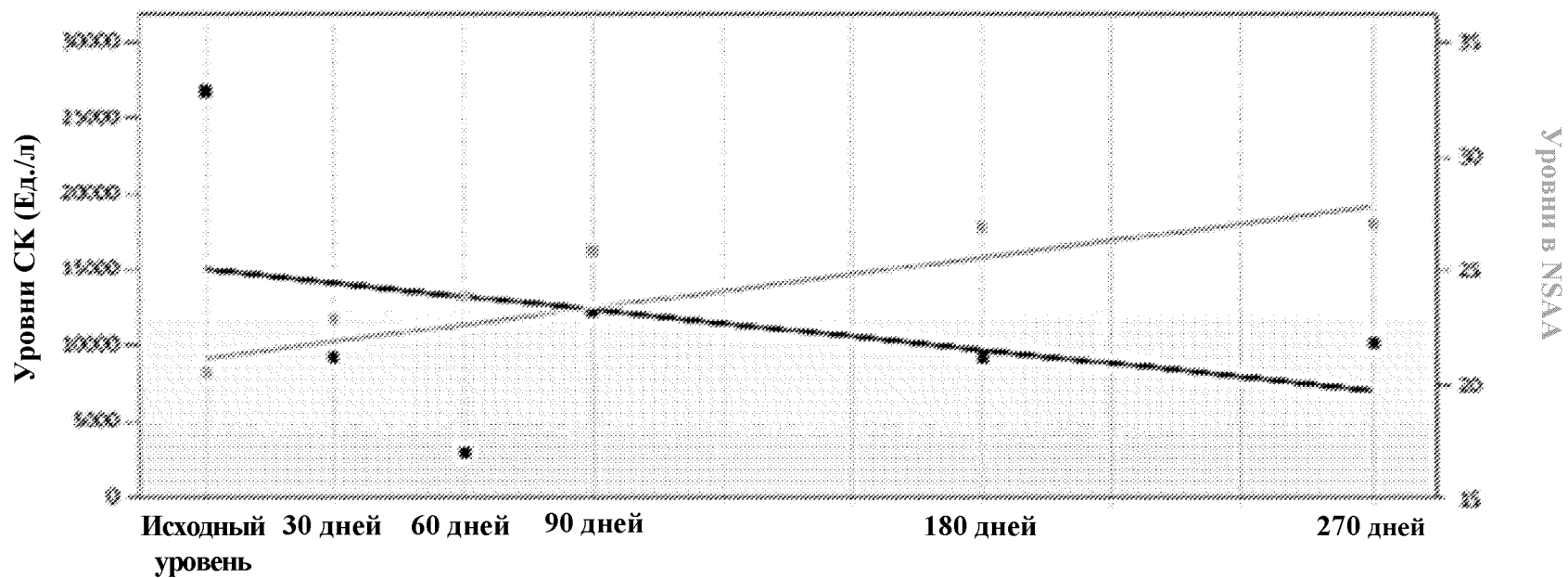
Фигура 11

Средние уровни СК значительно снижаются с течением времени



Фигура 12

Среднее изменение в NSAA значительно увеличивается с течением времени, в то время как



## Фигура 13

SEQ ID NO 9

rAAVrh74.МНСК7.microdystrophin

Основные признаки:

**ITR**

Промотор МНСК7

Последовательность химерного интрона

Последовательность микродистрофина человека

Поли-А-хвост

CGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCG  
ACCTTTGGTGC GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGG  
CCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTTGTAAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTT  
ATCTACGTAGCCATGCTCTAGAGtttaaacaagcttgcattctaaagctagacccttcagattaaaaataactgaggtaa  
gggcctgggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctctctctctctccatcggcccttggggaggagggaatgtgcccaaggact  
aaaaaaggccatggagccagaggggagggcgaacagaccttcatgggcaaaccttggggccctgctgtctagcatgccccactacg  
ggtctaggctgccccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgctgttataattaaccagacatgtgctgcccccccc  
cccaacacctgctgctctaaaaataacctgtccctggtgatccccctgcattcgaagaatcttgaacaaggctgtggggactgagggc  
aggctgtaacagccttgggggcccaggcctfatactgctgggactcccaaaagtattactgttccatgttccccggcgaagggcccagctctcc  
ccccagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagcccttggggcagccccafacaaggccatggggctgggcaag  
ctgcaagcctgggtccgggtgggcacgggtcccgggcaacagctgaaagctcatctgctctcagggccccctccctggggacagcc  
cctctggctagtcaacctgtaggctcctctatataaccaggggcacaggggctgcccctcattctaccaccctccacagcacagaca  
gacctcaggagcagcccagcggcgcccAGGTAAGTTTAGTCTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCG  
GATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAAGCTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTC  
TAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC  
CGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGC  
AGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAG  
CACATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTG  
GAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACG  
CCCTGAACAACGTGAACAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTG  
GTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCT  
GATCTGGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGG  
CCGGGCTGCAGCAGACCAATCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGC  
ACCCGCAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGG  
CTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTGACTGGAATAGC  
GTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGG  
TACCAGCTGGGGATCGAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATAACC  
AGATAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCA  
GGTGTCTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGA  
CTAAAGAGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCG  
TGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCC  
TACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAAGTACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTT  
CCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGA

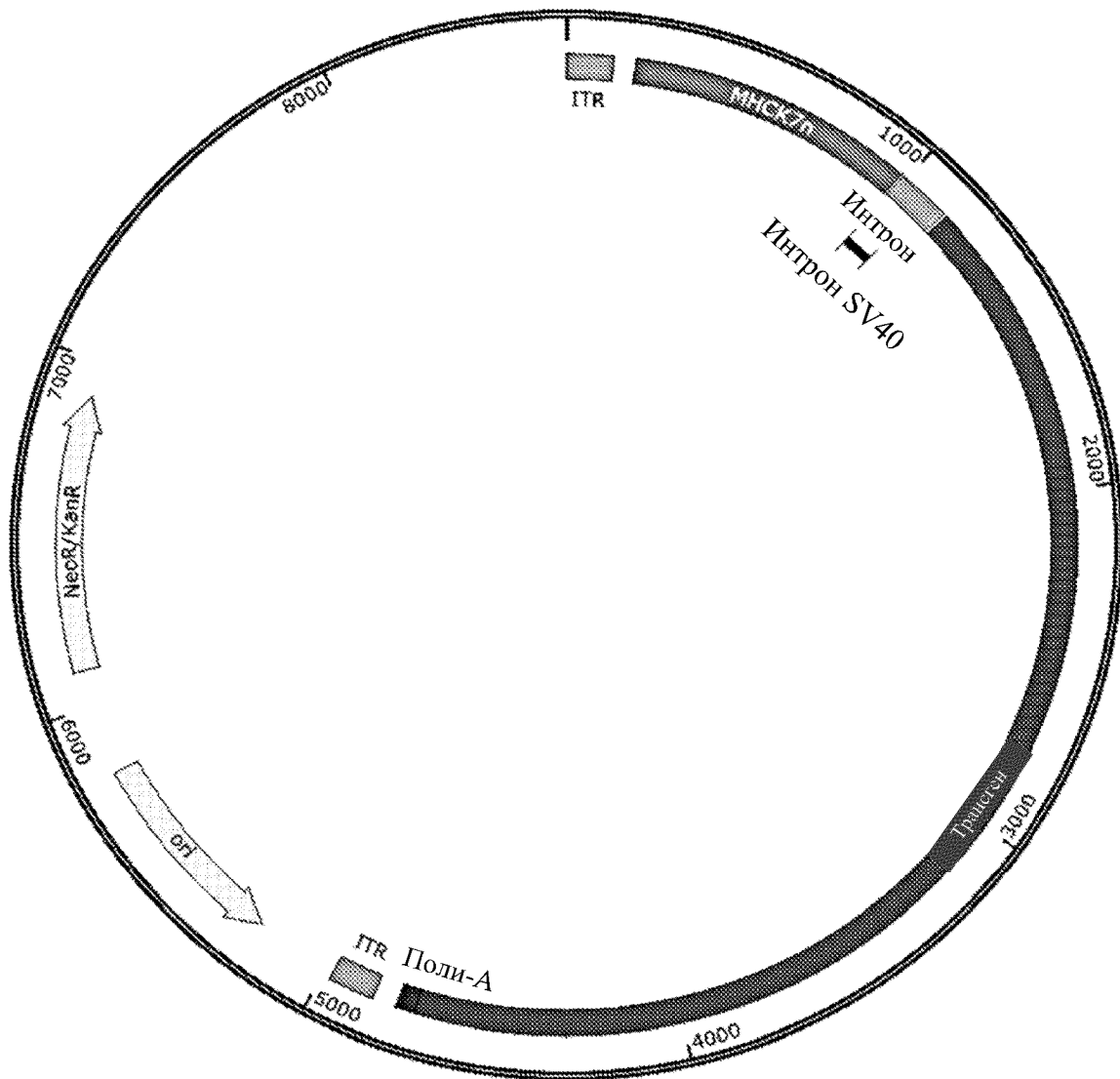


AAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGC  
TGCTGAGTGTGAAGACACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAA  
GTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCA  
CCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGA  
AACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAG  
CCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGG  
TGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAG  
ACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGG  
ATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGA  
GCAGGTGCGGGTGAACCTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTG  
GAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGG  
GCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCT  
GAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGA  
AAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATG  
CTGTCTAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCA  
GAGCATGGGCAAACCTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCTGAAGAACA  
AGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGAC  
AACCTGGTGCAGAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCAC  
AACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAA  
CCCGGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCC  
CAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAAC  
TGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGC  
GATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGG  
CGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAA  
CGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATAACAATCTGA  
GCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGAC  
CGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTT  
TCTGAGCACATCCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGC  
CCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCACTTGTGGGACCATCCAAGATGACAG  
AACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCG  
CTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCG  
CCGCCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGAT  
ATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCA  
CAACAACCTGGTGAACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAA  
CGTGTATGACACTGGGCGCACCGGCCGGATCAGAGTGTGAGTTTTAAACTGGGA  
TTATCTCCCTGTGTAAGGCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGG  
TGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACCAGCGCCGCTGGGACTGCTGCTGCATGATA  
GTATCCAGATTCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCG  
AACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTG  
CTCTGTTCCCTGGATTGGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGC  
TGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGC  
AAGGAATGTCCATTATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGAT  
ATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTAC  
CCTATGGTGGAAATATTGCAACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGGATTTTGCC  
AAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCAT  
GGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAA



IGTGAGCGGCCGCAATAAAAGATCTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTG  
TGTGtctagagtcgaccagagcatggctacgtagataagtagcatggcggggtaatcattaactacaAGGAACCCCTAG  
TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG  
CGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCG  
AGCGAGCGCGC

Фигура 14



## Фигура 15

SEQ ID NO 8

Основные признаки:

**ITR**Промотор МНСК7Последовательность химерного интронаПоследовательность микродистрофина человекаПоли-А-хвостУстойчивость к канамицину

GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCG  
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGG  
ССААСТССАТСАСТАГГГГТТССТТГТАГТТААТГАТТААСССГССАТГСТАСТТ  
АТСТАСТАГТССАТГСТСТАГАgtttaaacaagcttgcattctctaaagctagacccttcagattaaaaataactgaggtaa  
gggcctgggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctcctctctgcccatggccctftggggaggagggaatgtcccaaggact  
aaaaaaggccatggagccagagggcgagggcaacagacccttcatggcaaaccttggggccctgctctctagcatgcccactacg  
ggtctaggctgcccattgaaaggaggcaaggcctggggacaccgagatgctggtataattaaccagacatgtggctgcccccccc  
cccaacacctgctgctctaaaaataaccctgtccctggtggatcccctgcatcgaagatcttgaacaaggctgtggggactgagggc  
aggctgtaacaggcttgggggcccaggcttatactgtgctgggactccaaagtattactgttccatgttccggcgaagggccagctgtcc  
cccggagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagcccttggggcagcccatacaaggccatggggctgggcaag  
ctgacgctggtcgggggtgggcaggtgcccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcagggcccccctccctggggacagcc  
cctcctggctagtcacacctgtaggtcctctatataaccaggggcagaggggctgccctcattctaccaccacctccacagcagaca  
gacctcaggagcagccagcggcgcgcccAGGTAAGTTTAGTCTTTTTTGCTTTTTATTTACAGGTCCCG  
GATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTC  
TAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC  
CGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGC  
AGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAG  
CACATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTG  
GAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACG  
CCCTGAACAACGTGAACAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTG  
GTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAACTGACACTGGGCCT  
GATCTGGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGG  
CCGGGCTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGC  
ACCCGCAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGG  
CTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTGACTGGAATAGC  
GTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGG  
TACCAGCTGGGGATCGAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATAACC  
AGATAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCA  
GGTGTCTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCCAAAGTGA  
CTAAAGAGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCG

TGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCC  
TACGCTTATAACCAGGCTGCCTACGTGACAACCTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTT  
CCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGA  
AAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGC  
TGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAA  
GTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACAGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCA  
CCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGA  
AACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAG  
CCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGG  
TGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAACTGAAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAG  
ACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGG  
ATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGA  
GCAGGTGCGGGTGAACCTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTG  
GAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGG  
GCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCT  
GAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGA  
AAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATG  
CTGTCTAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCA  
GAGCATGGGCAAACCTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCTGAAGAACA  
AGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGAC  
AACCTGGTGCAGAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCAC  
AACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAA  
CCCGCGAACAGATCCTGGTGAACATGCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCC  
CAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAAC  
TGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGC  
GATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGG  
CGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGC  
TGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATAACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTG  
AATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGCA  
TGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGCA  
GGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGA  
GACCCAGACCACTTGTGGGGACCATCCCAAGATGACAGAAGTGTACCAGTCCCTGG  
CCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCCTATGAAGCTGAGACGG  
CTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCTGCGATGCCCTG  
GATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAA  
CTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAAACCTGGTGAACG  
TGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACACTGGGC  
GCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAGG  
CCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGA  
TTTTGTGACCAGCGCCGCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGA

CAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCCGAG  
CTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCTGGATTG  
GATGCGCCTGGAACACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTG  
CCGCCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATT  
ATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGC  
TTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGGAAATAT  
TGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAAT  
AAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTG  
CAGACAGTGTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATAACAATGTGAGCGGCCGCAAT  
AAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGtctagagtcgaccagagcat  
ggctacgtagataagtagcatggcggggtaatacattaactacaAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA  
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGC  
CGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCagctgcat  
 taatgaatcgccaacgcgcggggagagcggtttgcgtattggcgctcttccgcttctcgcctcactgactcgcctgcctcgctcgtcgc  
 gctcgcggcgagcggatcagctcactcaagcgcgtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaaCATGTGA  
 GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT  
 CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT  
 GCGGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC  
 GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT  
 CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG  
 TCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCCGACCGCTGCG  
 CTTATCCGTAACACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCAC  
 TGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA  
 GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATC  
 TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC  
 AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGC  
 AGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG  
 TGGAACGAAAACACTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC  
 ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG  
 TAAAAATATTCCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTG  
 CAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAA  
 GATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTG  
CACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAA  
CAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCG  
GTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCA  
GCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTT  
GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATIGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCT  
CCTGTCATCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCG  
GCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCG  
CATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGG

ACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAC TGTCGCCAGGCTCAAGGCGCGC  
ATGCCCCACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATC  
ATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATT CATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCG  
GACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGC  
GAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCC GATTTCGCAGCGC  
ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAACCGGTAATATTATTGAAGCAT  
TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATA TTTGAATGTATTTAGAAAAATAA  
ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTctaagaaaccattat  
tatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgaggcccttctcgcgcgttcggatgacggtgaaaacctctgacacatgacg  
ctcccgagacggtcacagctgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagccctcagggcgcgtcagcgggtgtggcgggtgtc  
ggggctggcttaactatgcccgcacagagcagattgtactgagagtgcaccatgctggtgtaataccgcacagatgctgaaggagaa  
aataccgcacaggCGAttccaacatcaataaatcatacaggcaaggcaagaattagcaaaattaagcaataaagcctcagagcataa  
agctaaatcgggtgtacaaaaacattatgacctgtacttttgcgggagaagcctttattcaacgcaaggataaaaatttttagaacctc  
atatattttaaagtcaatgcctgagtaatgtgtaggtaaagattcaaacgggtgagaaaggccggagacagtcaaatcaccatcaatgat  
tcaaccgtctagctgataaattcatgcccggagagggtagctattttgagaggtctctacaaggctatcaggtcattgcctgagagtctgga  
gcaaacagaagaatcgatgaacggtaatcgtaaaactagcatgtcaatcatatgtaacccgggtgataatcagaaaagccccaaaaacagg  
aagattgtataagcaaatattaaattgtaaGcgtaaatattttgtaaaaattcgcgtaaatattttgtaaatcagctcatttttaaccaataggccg  
aaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggttccagtttgaacaagagtccactattaagaacg  
tggactccaacgtcaaaaggcgcaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacctaatcaagtttttggggtcag  
gtgccgtaaaGcactaaatcggaaacctaaaggagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaagga  
aggaagaagaagcgaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcacgctgcgcgtaaccaccacaccgcccgcgcttaa  
tgcgccgctacaggcgctactatggtgctttgacgagcacgtataacgtgcttctcgttagaatcagagcgggagctaaacaggagg  
ccgattaaaggatttttagacaggaacggtagccagaatcctgagaagtgttttataatcagtgaggccaccgagtaaaagagtctgtcca  
tcacgcaaatcaccggtgtcgaactctttgattagtaataacatcactgcctgagtagaagaactcaaaactatcggccttgcgtgtaatat  
ccagaacaatattaccgccagccattgcaacggaatgccattgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcgggtcggggc  
tcttcgctattaccgagct