

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391085 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.13

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.07

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПЛАКОФИЛЛИНОМ 2

(31) 63/089,951; 63/172,053; 63/216,322;
63/227,801

(71) Заявитель:
ТЕНАЯ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(32) 2020.10.09; 2021.04.07; 2021.06.29;
2021.07.30

(72) Изобретатель:
Ян Чжихун Джейн, Хо Жаклин, Рейд
Крис, Ян Цзинь (US)

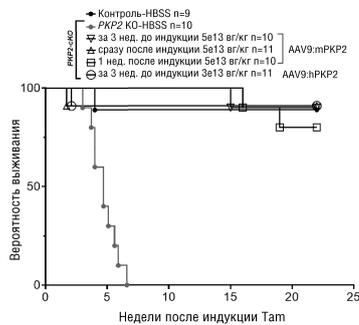
(33) US

(86) PCT/US2021/053908

(87) WO 2022/076648 2022.04.14

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

(57) Изобретение относится к способам и композициям для генной терапии плакофиллином 2 с целью лечения сердечных заболеваний, таких как аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКМПЖ) или аритмогенная кардиомиопатия (АКМ).



A1

202391085

202391085

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 577709EA/071

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПЛАКОФИЛЛИНОМ 2 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей патентной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 63/089951, поданной 9 октября 2020 г., предварительной патентной заявки США № 63/172053, поданной 7 апреля 2021 г., предварительной патентной заявки США № 63/216322, поданной 29 июня 2021 г., и предварительной патентной заявки США № 63/227801, поданной 30 июля 2021 г., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКМПЖ), или аритмогенная кардиомиопатия (АКМ), представляет собой наследственное заболевание сердца, встречающееся у 1/2000-1/5000 человек. АКМПЖ характеризуется замещением фиброзно-жировой тканью в миокарде, атрофией миокарда, преимущественной дилатацией правого желудочка, желудочковыми аритмиями и внезапной остановкой сердца (Wang et al., 2018). Заболевание трудно диагностировать с помощью обычной визуализации и ЭКГ, особенно на ранней стадии, из-за его субклинических проявлений. На поздней стадии заболевание прогрессирует до более выраженных проявлений в виде желудочковых аритмий и морфологических нарушений в желудочке. Обнаружено, что внезапная остановка сердца у молодых людей и спортсменов связана с АКМПЖ и стрессом сердечной стенки, вызванным физической нагрузкой. До настоящего времени не существует эффективного лечения АКМПЖ (Wang et al., 2018).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В одном аспекте предложены способы лечения сердечного заболевания или нарушения у индивидуума, который нуждается в этом. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей (а) вектор для генной терапии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид плакофиллин 2 (РКР2), или его фрагмент, функционально связанную с промотором и 3'-элементом; и (б) фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса, аденовируса, лентивируса, поксвируса, вируса осповакцины и вируса герпеса. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой аденоассоциированный вирус. В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус выбран из группы, состоящей из AAV6, AAV8 и AAV9. В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус представляет собой AAV9, имеющий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления сердечное заболевание или нарушение представляет собой аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (АКМПЖ) или аритмогенную

кардиомиопатию (АКМ). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, вызывающий экспрессию в тканях, включая сердце, или специфический для сердца промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор вызывает экспрессию в миокарде, эпикарде или в обоих. В некоторых вариантах осуществления специфический для сердца промотор включает промотор РКР2, промотор тропонина или промотор тяжелой цепи альфа миозина. В некоторых вариантах осуществления промотор РКР2 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления промотор тропонина имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления 3'-элемент включает посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH полиА) или их сочетание. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии дополнительно содержит специфический для сердца энхансер. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ген РКР2, имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет размер, меньший или равный примерно 4,7 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент включает буфер, полимер, соль или их сочетание. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению по меньшей мере одного из: замещения фиброзно-жировой тканью; атрофии миокарда; преобладающей дилатации правого желудочка; желудочковых аритмий; внезапной остановки сердца; сердечных явлений, вызванных физической нагрузкой; кардиомиопатии, дилатации или сердечной недостаточности правого желудочка; кардиомиопатии, дилатации или сердечной недостаточности левого желудочка; предсердных аритмий; обморока; сердцебиения; одышки или боли в груди. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению замещения фиброзно-жировой тканью в миокарде, эпикарде или в обоих. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению структуры и/или функции десмосомы. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению экспрессии мРНК РКР2 и/или уровней белка и активности РКР2. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению экспрессии одного или более генов, оказывающих прямое или косвенное влияние на один или более симптомов заболевания сердца. В некоторых вариантах осуществления ген включает один или более из генов риадинового рецептора 2 (Ryr2), анкирина В (Ank2), Casp1c (CaV1.2), триадины (Trdn) или кальсеквестрина-2 (Casq2). В некоторых вариантах осуществления индивидуум идентифицирован как имеющий по меньшей мере одну вариацию белка десмосомы. В некоторых вариантах осуществления белок десмосомы представляет собой РКР2. В некоторых вариантах осуществления вариация включает делецию, вставку, вариацию одного нуклеотида или вариацию количества копий.

[0004] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения сердечного заболевания или нарушения у индивидуума, который нуждается в этом. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей вектор для генной терапии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид плакофиллин 2 (PKP2) или его фрагмент, функционально связанную с по меньшей мере одним промотором, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса, аденовируса, лентивируса, поксвируса, вируса осповакцины и вируса герпеса. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой аденоассоциированный вирус. В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус выбран из группы, состоящей из AAV6, AAV8 и AAV9. В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус представляет собой AAV9 или его производное. В некоторых вариантах осуществления AAV9 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления сердечное заболевание или нарушение представляет собой аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (АКМПЖ) или аритмогенную кардиомиопатию (АКМ). В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутривенно, интракардиально, перикардиально или внутриартериально. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой специфический для сердца промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор вызывает экспрессию в миокарде, эпикарде или в обоих. В некоторых вариантах осуществления специфический для сердца промотор представляет собой промотор тропонина или промотор тяжелой цепи альфа миозина. В некоторых вариантах осуществления промотор тропонина имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор PKP2. В некоторых вариантах осуществления промотор PKP2 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор представляет собой промотор бета-актина. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии дополнительно содержит специфический для сердца энхансер. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ген PKP2, имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент включает буфер, полимер, соль или их сочетание. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению по меньшей мере одного из: замещения фиброзно-жировой тканью; атрофии миокарда; преобладающей дилатации правого желудочка; желудочковых аритмий; внезапной

остановки сердца; сердечных явлений, вызванных физической нагрузкой; кардиомиопатии, дилатации или сердечной недостаточности правого желудочка; кардиомиопатии, дилатации или сердечной недостаточности левого желудочка; предсердных аритмий; обморока; сердцебиения; одышки или боли в груди. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению замещения фиброзно-жировой тканью в миокарде, эпикарде или в обоих. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению структуры и/или функции десмосомы. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению экспрессии мРНК РКР2 и/или уровней белка и активности РКР2. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению индуцированной экспрессии гена РКР2. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению экспрессии одного или более генов, оказывающих прямое или косвенное влияние на один или более симптомов заболевания сердца. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению экспрессии одного или более из генов рианодинового рецептора 2 (Ryr2), анкирина В (Ank2), Casn1c (CaV1.2), триадины (Trdn) или кальсеквестрина-2 (Casq2). В некоторых вариантах осуществления индивидуум идентифицирован как имеющий по меньшей мере одну вариацию белка десмосомы. В некоторых вариантах осуществления белок десмосомы представляет собой РКР2. В некоторых вариантах осуществления вариация включает делецию, вставку, вариацию одного нуклеотида или вариацию количества копий.

[0005] В другом аспекте настоящее изобретение относится к векторам для генной терапии, содержащим ген плакофиллина 2, функционально связанный с по меньшей мере одним промотором. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса, аденовируса, лентивируса, поксвируса, вируса осповакцины и вируса герпеса. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии представляет собой аденоассоциированный вирус. В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус выбран из группы, состоящей из AAV6, AAV8 и AAV9. В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус представляет собой AAV9 или его производное. В некоторых вариантах осуществления AAV9 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой специфический для сердца промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор вызывает экспрессию в миокарде, эпикарде или в обоих. В некоторых вариантах осуществления специфический для сердца промотор представляет собой промотор тропонина или промотор тяжелой цепи альфа миозина. В некоторых вариантах осуществления промотор тропонина имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РКР2. В некоторых вариантах осуществления промотор РКР2 имеет нуклеотидную

последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор представляет собой промотор бета-актина. В некоторых вариантах осуществления вектор для генной терапии дополнительно содержит специфический для сердца энхансер. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая ген РКР2, имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, вектор для генной терапии сформулирован в фармацевтически приемлемом носителе или эксципиенте, включающем буфер, полимер, соль или их сочетание.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0006] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящей спецификации, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если было бы специально и индивидуально указано, что каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка включены посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0007] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии публикации этого патента или патентной заявки с цветным(и) рисунком(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

[0008] Понимание особенностей и преимуществ настоящего изобретения будет достигнуто путем обращения к следующему далее подробному описанию, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых использованы принципы изобретения, а также к прилагаемым чертежам, в числе которых:

[0009] На ФИГ. 1 показано, каким образом сердечные десмосомы связывают клетки воедино.

[0010] На ФИГ. 2 приведено краткое описание признаков заболевания и возможных механизмов заболевания АКМПЖ.

[0011] На ФИГ. 3А-3С представлены результаты кратковременного выключения РКР2 в иПСКМ в день 8. На ФИГ. 3А показано исчезновение DSP с клеточной мембраны. На ФИГ. 3В представлен график, иллюстрирующий уменьшение плотности саркомеров. На ФИГ. 3С показано нарушение уплотнения клеток в структурированных иПСКМ.

[0012] На ФИГ. 4 представлен количественный анализ мембранной локализации DSP при определении по совместной локализации с PKG.

[0013] На ФИГ. 5 представлен иммуноблот, показывающий уменьшение общего количества белка DSP, обнаруживаемого преимущественно в нерастворимой фракции, в клетках с выключенным РКР2.

[0014] На ФИГ. 6А-6В представлены результаты введения трансдукцией РКР2 с использованием AAV. На ФИГ. 6А представлена векторная карта конструкции AAV. ФИГ. На 6В показано иммунофлуоресцентное изображение восстановления мембранной

локализации DSP. На ФИГ. 6С показана количественная оценка общей интенсивности DSP после выключения РКР2 и восстановления за счет трансгена AAV-РКР2.

[0015] На ФИГ. 7А-7В представлены результаты введения трансдукцией РКР2 с использованием AAV на скорость сокращений. На ФИГ. 7А представлена временная шкала эксперимента. На ФИГ. 7В показаны результаты двух анализов сократимости, которые демонстрируют функциональное восстановление сниженной скорости после выключения РКР2.

[0016] На ФИГ. 8 представлено схематическое изображение экспрессионной кассеты AAV второго поколения для РКР2 α человека и мыши. На левой панели показаны все элементы в экспрессионной кассете. На правой панели показано расположение элементов в экспрессионных кассетах.

[0017] На ФИГ. 9А и ФИГ. 9В представлены результаты восстановления скорости сокращений за счет AAV-hРКР2 α второго поколения после выключения РКР2 в иПСК кардиомиоцитах. На ФИГ. 9А показана экспрессия в растворимой и нерастворимой фракциях в клетках, трансдуцированных при разных значениях множественности инфекции. На ФИГ. 9В показано восстановление скорости сокращений в клетках после выключения РКР2.

[0018] На ФИГ. 10 показана экспрессия AAV-РКР2 α второго поколения у мышей дикого типа.

[0019] На ФИГ. 11А-11G показаны результаты пилотных исследований безопасности экспрессии AAV9 второго поколения для РКР2 α человека и мыши у мышей дикого типа. На ФИГ. 11А показана масса тела до и после инъекции AAV9. На ФИГ. 11В показана фракция выброса у мышей с введенным AAV9 для РКР2 α человека и мыши. На ФИГ. 11С и ФИГ. 11D показана структура ЛЖ, измеренная по внутренним диаметрам в конце диастолы и систолы. На ФИГ. 11Е, ФИГ. 11F и ФИГ. 11G показана электрофизиологическая активность в виде QRS (11Е), интервала QT (11F) и амплитуды P/R (11G).

[0020] На ФИГ. 12 представлена кривая выживаемости Каплана-Мейера для мышей РКР2-сКО.

[0021] На ФИГ. 13А-13В показана дилатационная кардиомиопатия правого желудочка (ПЖ) у мышей РКР2-сКО. На ФИГ. 13А (левая панель) представлены изображения, иллюстрирующие увеличение внутреннего размера ПЖ в конце диастолы (ВРПЖд) у мышей РКР2-сКО. На ФИГ. 13А (правая панель) представлен график ВРПЖд с течением времени у мышей РКР2-сКО. На ФИГ. 13В (левая панель) представлены изображения, иллюстрирующие увеличение площади ПЖ у мышей РКР2-сКО. На ФИГ. 13В (правая панель) представлен график площади ПЖ с течением времени у мышей РКР2-сКО.

[0022] На ФИГ. 14А-14В показано развитие дилатационной кардиомиопатии левого желудочка (ЛЖ) у мышей РКР2-сКО в сравнении с контролем. На ФИГ. 14А (левая панель) представлены изображения, иллюстрирующие увеличение внутреннего

размера ЛЖ в конце систолы (ВРЛЖс) и в конце диастолы (ВРЛЖд) у мышей РКР2-сКО. На ФИГ. 14А (правая панель) представлен график, показывающий увеличение ВРЛЖс и ВРЛЖд у мышей РКР2-сКО с течением времени. На ФИГ. 14В представлен график производительности ЛЖ при измерении в виде процентной доли фракции выброса с течением времени.

[0023] На ФИГ. 15 показано развитие тяжелых электрофизиологических фенотипов у мышей РКР2-сКО в сравнении с контролем, в частности, удлинение интервала QRS и увеличение отношения амплитуд P/R у мышей РКР2-сКО. На верхней панели показана иллюстративная электрокардиограмма контрольных мышей и мышей РКР2-сКО. На нижней панели представлены графики увеличения интервала QRS и увеличения амплитуды P/R у мышей РКР2-сКО в сравнении с контролем.

[0024] На ФИГ. 16А-16С показана повышенная экспрессия генов фиброза, ремоделирования тканей и маркеров сердечной недостаточности. На ФИГ. 16А показана экспрессия РНК РКР2 в ПЖ и ЛЖ (вверху), а также экспрессия белка десмосомы и Sx43 (внизу) у мышей РКР2-сКО в сравнении с контролем. На ФИГ. 16В показана повышенная экспрессия генов фиброза: TGF β 1, Col1a1 и Col3a1; и генов ремоделирования тканей: Timp1 и Mmp2 у мышей РКР2-сКО в сравнении с контролем. На ФИГ. 16С показана повышенная экспрессия маркеров сердечной недостаточности, NPPA и NPPB, у мышей РКР2-сКО в сравнении с контрольными мышами.

[0025] На ФИГ. 17 показан дизайн эксперимента для оценки эффективности РКР2 в качестве генной терапии в модели АКМПЖ на мышах РКР2-сКО.

[0026] На ФИГ. 18А представлено схематическое изображение экспрессионных кассет AAV для РКР2 α человека и мыши. На ФИГ. 18В представлены иммуноблоты, показывающие белковую экспрессию РКР2 α мыши и человека у мышей, получавших AAV9:РКР2.

[0027] На ФИГ. 19 представлена кривая выживаемости Каплана-Мейера для мышей РКР2-сКО, получавших AAV9:РКР2.

[0028] На ФИГ. 20А-20С показана эффективность введения AAV9:РКР2 у мышей РКР2-сКО для уменьшения дилатации ПЖ и ЛЖ и поддержания сердечной функции. На ФИГ. 20А представлен график, показывающий улучшение фракции выброса у мышей, получавших AAV9:РКР2. На ФИГ. 20В представлен график, показывающий уменьшение дилатации ПЖ у мышей, получавших AAV9:РКР2. На ФИГ. 20С представлен график, показывающий улучшение ВРЛЖд (вверху) и ВРЛЖс (внизу).

[0029] На ФИГ. 21А-21В показано улучшение параметров ЭКГ у мышей РКР2-сКО, получавших AAV:РКР2. На ФИГ. 21А представлены иллюстративные необработанные кривые ЭКГ контрольных мышей и мышей РКР2-сКО, получавших AAV9:mРКР2 и буфер. На ФИГ. 21В представлены графики, показывающие улучшение отношения P/R, интервала QT и интервала QRS у мышей РКР2-сКО, получавших AAV9:РКР2 в сравнении с введением буфера.

[0030] На ФИГ. 22А-22В показано уменьшение тяжести аритмий за счет введения

AAV9:PKP2 у мышей PKP2-сКО. На ФИГ. 22А (вверху) представлена таблица градаций тяжести аритмий. На ФИГ. 22А (внизу) представлен график, демонстрирующий улучшение показателей тяжести аритмии у мышей PKP2-сКО, получавших AAV9:PKP2, в сравнении с контролем. На ФИГ. 22В представлен график распределения, показывающий уменьшение тяжести аритмии у мышей PKP2-сКО, получавших AAV9:PKP2, в сравнении с контролем. Каждая точка представляет животное.

[0031] На ФИГ. 23 представлен дизайн эксперимента, использованного для оценки эффективности PKP2 человека в качестве генной терапии с использованием модели АКМПЖ на мышцах PKP2-сКО.

[0032] На ФИГ. 24А-24Д представлены результаты генно-терапевтического лечения при помощи AAV9:hPKP2 мышцей PKP2-сКО. На ФИГ. 24А показаны результаты для фракции выброса. На ФИГ. 24В показаны результаты для размеров правого желудочка. На ФИГ. 24С показана дилатация ЛЖ, измеренная по ВРЛЖд. На ФИГ. 24Д показана дилатация ЛЖ, измеренная по ВРЛЖс.

[0033] На ФИГ. 25 представлены результаты генно-терапевтического лечения при помощи AAV9:hPKP2 мышцей PKP2-сКО в виде интервала QT (вверху), отношения P/R (в центре) и показателя тяжести аритмии (внизу).

[0034] На ФИГ. 26А-26В представлены результаты введения AAV9:hPKP2 мышцам PKP2-сКО в виде уменьшения экспрессии маркеров сердечной недостаточности, маркеров фиброза и ремоделирования тканей в правом желудочке (ФИГ. 26А) и левом желудочке (ФИГ. 26В).

[0035] На ФИГ. 27А-27В представлены результаты введения AAV9:hPKP2 мышцам PKP2-сКО в виде уменьшения развития фиброза. На ФИГ. 27А представлены гистологические изображения мышц контрольных мышей и мышцей PKP2-сКО, получавших и не получавших AAV9:hPKP2. На ФИГ. 27В представлен график для положительной по коллагену ткани от контрольных мышей и мышцей PKP2-сКО, получавших и не получавших AAV9:hPKP2.

[0036] На ФИГ. 28А-28В показана экспрессия PKP2 и других белков десмосомы в растворимой фракции (ФИГ. 28А) и нерастворимой фракции (ФИГ. 28В).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0037] Наиболее распространенной генетической основой аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (АКМПЖ) являются мутации в генах, кодирующих белки десмосом. Функционально десмосомы представляют собой адгезивные межклеточные соединения, удерживающие вместе интеркалированные кардиомиоциты. Ген плакофиллина 2 (PKP2), один из генов десмосом, чаще всего идентифицируют как причинный фактор для АКМПЖ. С внутренней стороны от расположенного на мембране комплекса PKP2 взаимодействует с белками десмосом, плакоглобином (PKG) и десмоплакином (DSP). DSP закрепляет промежуточные филаменты, десмин, которые образуют переплетенную сеть для стабилизации сократительных единиц сердечных клеток, саркомеров и других органелл (ФИГ. 1, Brodehl et al., 2018; Moncayo-Arlandi and

Brugada, 2017). Считается, что потеря десмосом влияет на межклеточную адгезию, передачу сигналов и электрическую связь кардиомиоцитов (Wang et al., 2018). Кроме того, потеря передачи сигналов и электрической связи приводят к дефектам суставов вследствие дополнительного коллапса содержащих коннексин щелевых контактов (ЩК). ЩК необходимы для электрического соединения клеток и способствуют синхронному сокращению за счет обеспечения потока малых молекул между клетками (Green et al., 2019) (ФИГ. 2, краткая сводка признаков заболевания и возможных механизмов АКМПЖ). Кроме того, дифференциация эпикардия может способствовать фиброзно-жировому ремоделированию, которое наблюдается у пациентов с АКМПЖ или АКМ (Kohela et al., 2021).

[0038] Для определения функциональности десмосом были созданы модели: генетические линии мышей и iPСКМ, полученные от пациентов. Модель на мышах с нокаутом сердечного РКР2 (мышинная модель Delmar, Cerrone et al., 2017) характеризуется глубоким ранним развитием бивентрикулярной дилатации, фиброза и значительным уменьшением экспрессии генов, регулирующих гомеостаз Ca^{2+} , что позволило выявить лежащие в основе механизмы аритмий, возможно, до явных структурных изменений. В нескольких полученных от пациентов линиях iPСКМ, несущих мутации РКР2, было обнаружено уменьшение экспрессии РКР2, дефекты гомеостаза Ca^{2+} и накопление капель липидов, вызванное культивированием в липогенной индукционной среде (Brodehl et al., 2019).

[0039] Сообщалось об уменьшении количества РКР2 как на уровне мРНК, так и на уровне белка, в образцах сердца пациентов, страдающих АКМПЖ с мутациями РКР2 (Akdis et al., 2016; Asimaki et al., 2009). Было высказано предположение об опосредованном нонсенс-мутациями распаде мРНК (NMD) для некоторых мутаций генов десмосом, включая мутации РКР2, что предполагает гораздо менее известный клеточный механизм уравнивания экспрессии мутировавших транскриптов и белков (Gerull and Brodehl, 2020; Mura et al., 2003). Эти наблюдения предполагают возможность вмешательства в АКМПЖ на основе генной терапии путем восстановления уровня экспрессии РКР2 ДТ в сердце.

Способы лечения

[0040] Векторы для генной терапии РКР2, предложенные в настоящем документе, в различных аспектах полезны для лечения индивидуума с сердечным заболеванием или состоянием. Используемый в настоящем документе термин «лечение», или «лечение состояния или субъекта, нуждающегося в этом», означает (1) принятие мер для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты, такие как уменьшение симптомов; (2) предотвращение заболевания, например, предотвращение развития клинических симптомов заболевания, у пациента, который предрасположен к заболеванию, например, у носителя генетической мутации в гене десмосомы, таком как РКР2, но еще не испытывает или не проявляет симптомы заболевания; (3) ингибирование заболевания, например остановку или уменьшение развития заболевания или его

клинических симптомов; (4) облегчение заболевания, например, вызывание регресса заболевания или его клинических симптомов; или (5) отсрочку развития заболевания. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения сердечного заболевания или нарушения у индивидуума, который нуждается в этом. В некоторых случаях способ включает введение композиции, содержащей вектор для генной терапии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид плакофиллин 2 (PKP2) или его фрагмент, функционально связанную по меньшей мере с одним промотором, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых случаях сердечное заболевание или нарушение представляет собой аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (АКМПЖ) или аритмогенную кардиомиопатию (АКМ). В некоторых случаях способы лечения по настоящему изобретению приводят к уменьшению по меньшей мере одного симптома аритмогенной кардиомиопатии, включая, но не ограничиваясь тем, что способ приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению по меньшей мере одного из: замещения фиброзно-жировой тканью; атрофии миокарда; преобладающей дилатации правого желудочка; желудочковых аритмий; внезапной остановки сердца; сердечных явлений, вызванных физической нагрузкой; кардиомиопатии, дилатации или сердечной недостаточности правого желудочка; кардиомиопатии, дилатации или сердечной недостаточности левого желудочка; предсердных аритмий; обморока; сердцебиения; одышки или боли в груди. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению замещения фиброзно-жировой тканью в миокарде, эпикарде или в обоих. В некоторых случаях способ приводит к восстановлению структуры и/или функции десмосомы. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению экспрессии мРНК PKP2 и/или уровней белка и активности PKP2. В некоторых случаях способ приводит к восстановлению индуцированной экспрессии гена PKP2. В некоторых случаях индуцированная экспрессия гена PKP2 включает экспрессию генов, экспрессия которых является прямым или косвенным причинным фактором, приводящим к одному или более фенотипам заболевания. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к восстановлению экспрессии одного или более генов, оказывающих прямое или косвенное влияние на один или более симптомов заболевания сердца. В некоторых случаях способ приводит к восстановлению экспрессии одного или более из генов рианодинового рецептора 2 (Ryr2), анкирина В (Ank2), Casn1c (CaV1.2), триадины (Trdn) или кальсеквестрина-2 (Casq2).

[0041] В некоторых вариантах осуществления способов лечения, предложенных в настоящем документе, вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор. Любой подходящий вирусный вектор предусмотрен для использования в способах по настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса, аденовируса, лентивируса, поксвируса, вируса осповакцины и вируса герпеса. В некоторых случаях вектор для генной терапии представляет собой аденоассоциированный вирус. В

некоторых случаях аденоассоциированный вирус выбран из группы, состоящей из AAV6, AAV8 и AAV9 или их производных. В некоторых случаях аденоассоциированный вирус представляет собой AAV9 или его производное. В некоторых случаях AAV9 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях аденоассоциированный вирус модифицирован для улучшения трансдукции пораженных клеток в миокарде или эпикарде, таких как кардиомиоциты, например, в некоторых случаях аденоассоциированный вирус представляет собой производное AAV6, AAV8 или AAV9. В некоторых случаях производным является любой AAV, описанный в патентной заявке США № 63/012703, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0042] В некоторых вариантах осуществления или способах лечения, предложенных в настоящем документе, композицию, содержащую вектор для генной терапии, вводят любым подходящим путем введения для достижения пораженных клеток. Например, в некоторых случаях композицию вводят внутривенно, интракардиально, перикардиально или интраартериально.

[0043] В некоторых вариантах осуществления способов лечения, предложенных в настоящем документе, РКР2 экспрессируется под любым промотором, подходящим для экспрессии в пораженных клетках и тканях миокарда или эпикарда, например, кардиомиоцитах. Например, в некоторых случаях промотор представляет собой специфический для сердца промотор. В некоторых случаях специфический для сердца промотор представляет собой промотор тропонина или промотор тяжелой цепи альфа миозина. В некоторых случаях промотор представляет собой промотор РКР2. В некоторых случаях с промотором объединяют специфический для сердца энхансер. В некоторых случаях промотор тропонина имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях промотор РКР2 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых случаях конститутивный промотор представляет собой промотор бета-актина.

[0044] В некоторых вариантах осуществления способов лечения, предложенных в настоящем документе, нуклеиновая кислота, кодирующая ген РКР2, имеет любую подходящую последовательность, кодирующую полипептид РКР2, например, последовательность любой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в некоторых случаях ген РКР2 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях ген РКР2 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая ген РКР2, является кодон-оптимизированной.

примерно 4,4 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная экспрессионная кассета имеет размер по меньшей мере примерно 4,5 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная экспрессионная кассета имеет размер по меньшей мере примерно 4,6 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная экспрессионная кассета имеет размер по меньшей мере примерно 4,7 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная экспрессионная кассета имеет размер по меньшей мере примерно 4,8 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная экспрессионная кассета имеет размер по меньшей мере примерно 4,9 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная экспрессионная кассета имеет размер по меньшей мере примерно 5 т.п.н.

[0046] В различных вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, вектор для генной терапии, содержащий ген РКР2, сформулирован в композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Например, в некоторых случаях фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент включает буфер, полимер, соль или их сочетание.

[0047] В некоторых вариантах осуществления способов лечения, предложенных в настоящем документе, индивидуум идентифицирован как имеющий по меньшей мере одну вариацию белка десмосомы. В некоторых случаях белок десмосомы представляет собой РКР2. В некоторых случаях вариация включает делецию, вставку, вариацию одного нуклеотида или вариацию количества копий. В некоторых случаях индивидуум идентифицирован как имеющий по меньшей мере одну вариацию белка десмосомы с помощью секвенирования ДНК, ПЦР, количественной ПЦР, гибридизации *in situ* или другого подходящего метода идентификации вариации гена у индивидуума.

Векторы для генной терапии

[0048] В другом аспекте предложены векторы для генной терапии, содержащие ген плакофиллина 2, функционально связанный с по меньшей мере одним промотором. В некоторых случаях вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор. В некоторых случаях вирусный вектор представляет собой любой подходящий вирусный вектор для лечения сердечного заболевания или состояния. В некоторых случаях вирусный вектор подходит для доставки гена в клетки миокарда, эпикарда или обоих. В некоторых случаях вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса, аденовируса, лентивируса, поксвируса, вируса осповакцины и вируса герпеса. В некоторых случаях вектор для генной терапии представляет собой аденоассоциированный вирус. В некоторых случаях аденоассоциированный вирус выбран из группы, состоящей из AAV6, AAV8 и AAV9 или их производных. В некоторых случаях аденоассоциированный вирус представляет собой AAV9 или его производное. В некоторых случаях AAV9 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 7. В некоторых случаях аденоассоциированный вирус представляет собой производное AAV6, AAV8 или AAV9, оптимизированное для трансдукции клеток в соответствии со способами лечения, описанными в настоящем документе. В некоторых случаях

производное представляет собой любой AAV, описанный в патентной заявке США № 63/012703, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0049] В некоторых вариантах осуществления векторов для генной терапии, предложенных в настоящем документе, РКР2 экспрессируется под любым промотором, подходящим для экспрессии в пораженных клетках и тканях, например, кардиомиоцитах. В некоторых случаях РКР2 экспрессируется под промотором, активным в клетках миокарда, эпикарда или обоих. Например, в некоторых случаях промотор представляет собой специфический для сердца промотор. В некоторых случаях специфический для сердца промотор представляет собой промотор тропонина или промотор тяжелой цепи альфа миозина. В некоторых случаях промотор представляет собой промотор РКР2. В некоторых случаях с промотором объединяют специфический для сердца энхансер. В некоторых случаях промотор тропонина имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 3. В некоторых случаях промотор РКР2 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых случаях конститутивный промотор представляет собой промотор бета-актина.

[0050] В некоторых вариантах осуществления векторов для генной терапии, предложенных в настоящем документе, нуклеиновая кислота, кодирующая ген РКР2, имеет любую подходящую последовательность, кодирующую полипептид РКР2, например, последовательность любой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в некоторых случаях ген РКР2 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях ген РКР2 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность, кодирующая ген РКР2, является кодон-оптимизированной.

[0051] В некоторых вариантах осуществления векторов для генной терапии, предложенных в настоящем документе, вектор для генной терапии включает 3'-элемент. В некоторых вариантах осуществления 3'-элемент стабилизирует продукт транскрипции вектора для генной терапии (например, транскрипт РКР2). В некоторых вариантах осуществления 3'-элемент включает последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH). В некоторых вариантах осуществления 3'-элемент включает посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

[0052] В некоторых вариантах осуществления векторов для генной терапии, предложенных в настоящем документе, вектор для генной терапии имеет генную экспрессионную кассету, имеющую размер от примерно 3 т.п.н. до примерно 5 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная экспрессионная кассета имеет размер от примерно 4 т.п.н. до примерно 5 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная

генная экспрессионная кассета имеет размер по меньшей мере примерно 4,8 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная экспрессионная кассета имеет размер по меньшей мере примерно 4,9 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления генная экспрессионная кассета имеет размер по меньшей мере примерно 5 т.п.н.

[0053] В различных вариантах осуществления векторов для генной терапии, предложенных в настоящем документе, вектор для генной терапии, содержащий ген РКР2, сформулирован в композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Например, в некоторых случаях фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент включает буфер, полимер, соль или их сочетание.

[0054] В некоторых вариантах осуществления векторы для генной терапии, описанные в настоящем документе, включают нуклеотидные последовательности, приведенные ниже в Таблице 1.

Таблица 1: Последовательности		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
РКР2 человека	ATGGCAGCCCCCGGCGCCCCAGCTGAGTACGGCTACA TCCGGACCGTCCTGGGCCAGCAGATCCTGGGACAAC GGACAGCTCCAGCCTGGCGCTGCCCTCCGAGGCCAAG CTGAAGCTGGCGGGGAGCAGCGGCCGCGGGCGGCCAG ACAGTCAAGAGCCTGCGGATCCAGGAGCAGGTGCAGC AGACCCTCGCCCGGAAGGGCCGCAGCTCCGTGGGCAA CGGAAATCTTACCCGAACCAGCAGTGTTCTGAGTAT GTCTACAACCTACACTTGGTTGAAAATGATTTTGTGG AGGCCGTTCCCCTGTTCTAAAACCTATGACATGCTAA AGGCTGGCACAACTGCCACTTATGAAGGTCGCTGGGG AAGAGGAACAGCACAGTACAGCTCCCAGAAGTCCGTG GAAGAAAGGTCCTTGAGGCATCCTCTGAGGAGACTGG AGATTTCTCCTGACAGCAGCCCGGAGAGGGCTCACTA CACGCACAGCGATTACCAGTACAGCCAGAGAAGCCAG GCTGGGCACACCCTGCACCACCAAGAAAGCAGGCGGG CCGCCCTCCTAGTGCCACCGAGATATGCTCGTTCCGAG ATCGTGGGGGTCAGCCGTGCTGGCACCAACAAGCAGGC AGCGCCACTTTGACACATAACCACAGACAGTACCAGCA TGGCTCTGTTAGCGACACCGTTTTTTGACAGCATCCCTG CCAACCCGGCCCTGCTCACGTACCCCAGGCCAGGGAC	1

CAGCCGCAGCATGGGCAACCTCTTGGAGAAGGAGAAC
TACCTGACGGCAGGGCTCACTGTCTGGGCAGGTCAGGC
CGCTGGTGCCCCTGCAGCCCGTCACTCAGAACAGGGC
TTCCAGGTCCTCCTGGCATCAGAGCTCCTTCCACAGCA
CCCGCACGCTGAGGGAAGCTGGGCCAGTGTCGCCGT
GGATTCCAGCGGGAGGAGAGCGCACTTGACTGTCGGC
CAGGCGGCCGCAGGGGGAAGTGGGAATCTGCTCACTG
AGAGAAGCACTTTCCTGACTCCCAGCTGGGGAATGC
AGACATGGAGATGACTCTGGAGCGAGCAGTGAGTATG
CTCGAGGCAGACCACATGCTGCCATCCAGGATTTCTG
CTGCAGCTACTTTCATACAGCACGAGTGCTTCCAGAA
ATCTGAAGCTCGGAAGAGGGTTAACCAGCTTCGTGGC
ATCCTCAAGCTTCTGCAGCTCCTAAAAGTTCAGAATGA
AGACGTTTCAGCGAGCTGTGTGTGGGGCCTTGAGAAAC
TTAGTATTTGAAGACAATGACAACAAATTGGAGGTGG
CTGAACTAAATGGGGTACCTCGGCTGCTCCAGGTGCT
GAAGCAAACCAGAGACTTGGAGACTAAAAACAAT
AACAGGTTTGCTGTGGAATTTGTCATCTAATGACAAAC
TCAAGAATCTCATGATAACAGAAGCATTGCTTACGCT
GACGGAGAATATCATCATCCCCTTTTCTGGGTGGCCTG
AAGGAGACTACCCAAAAGCAAATGGTTTGCTCGATTT
TGACATATTCTACAACGTCCTGATGCCTAAGAAAC
ATGAGTTCTGCTGGCGCTGATGGGAGAAAAGCGATGA
GAAGATGTGACGGACTCATTGACTCACTGGTCCATTAT
GTCAGAGGAACCATTGCAGATTACCAGCCAGATGACA
AGGCCACGGAGAATTGTGTGTGCATTCTTCATAACCTC
TCTACCAGCTGGAGGCAGAGCTCCCAGAGAAATATT
CCCAGAATATCTATATTCAAACCGGAATATCCAGAC
TGACAACAACAAAAGTATTGGATGTTTTGGCAGTCGA
AGCAGGAAAGTAAAAGAGCAATACCAGGACGTGCCG
ATGCCGGAGGAAAAGAGCAACCCCAAGGGCGTGGAG
TGGCTGTGGCATTCCATTGTTATAAGGATGTATCTGTC
CTTGATCGCCAAAAGTGTCCGCAACTACACACAAGAA
GCATCCTTAGGAGCTCTGCAGAACCTCACGGCCGGAA
GTGGACCAATGCCGACATCAGTGGCTCAGACAGTTGT

	<p>CCAGAAGGAAAGTGGCCTGCAGCACACCCGAAAGAT GCTGCATGTTGGTGACCCAAGTGTGAAAAAGACAGCC ATCTCGCTGCTGAGGAATCTGTCCCAGGAATCTTTCTCT GCAGAATGAAATTGCCAAAGAACTCTCCCTGATTTG GTTTCCATCATTCTGACACAGTCCCGAGTACTGACCT TCTCATTGAAACTACAGCCTCTGCCTGTTACACATTGA ACAACATAATCCAAAACAGTTACCAGAATGCACGCGA CCTTCTAAACACCGGGGGCATCCAGAAAATTATGGCC ATTAGTGCAGGCGATGCCTATGCCTCCAACAAAGCAA GTAAAGCTGCTTCCGTCCTTCTGTATTCTCTGTGGGCA CACACGGAAGTGCATCATGCCTACAAGAAGGCTCAGT TTAAGAAGACAGATTTTGTCAACAGCCGGACTGCCAA AGCCTACCACTCCCTTAAAGACTGA</p>	
<p>РКР2 человека (кодон- оптимизированн ая)</p>	<p>ATGGCTGCTCCTGGTGTCTCCTGCCGAGTACGGCTACAT CAGAACAGTGCTGGGCCAGCAGATCCTGGGACAGCTG GATTCTAGCTCTCTGGCCCTGCCTTCTGAGGCCAAGCT GAAACTGGCCGGCAGTTCTGGAAGAGGGCGGCCAGACA GTGAAGTCCCTGCGGATCCAAGAACAGGTGCAGCAGA CCCTGGCCAGAAAGGGCAGATCTTCTGTGCGGCAACGG CAACCTGCACAGAACCAGCTCTGTGCCCCGAGTACGTG TACAATCTGCACCTGGTGGAAAACGACTTCGTCGGCG GCAGATCCCCTGTGCCTAAGACCTACGATATGCTGAA GGCCGGCACACCACCGCCACCTATGAAGGCAGATGGGGA AGAGGCACAGCCCAGTACAGCAGCCAGAAAAGCGTG GAAGAGAGAAGCCTGCGGCACCCTCTGCGGAGACTGG AAATCAGCCCTGATAGCAGCCCAGAGAGAGCCACTA CACCCACAGCGACTACCAGTACTCCCAGAGATCTCAG GCCGGCCACACACTGCACCACCAAGAGTCTAGAAGGG CCGCTCTGCTGGTGCCTCCTAGATACGCCAGATCTGAG ATCGTGGGCGTGTCCAGAGCCGGCACAACAAGCAGAC AGAGACACTTCGACACCTACCACCGGCAGTATCAGCA CGGCAGCGTGTCCGATACCGTGTTCGATAGCATCCCC GCCAATCCTGCTCTGCTGACATAACCCTAGACCTGGCAC CTCCAGATCCATGGGCAATCTGCTGGAAAAGAGAAC TACCTGACCGCCGGACTGACCGTGGGACAAGTTCGAC</p>	<p>2</p>

CTCTGGTTCCTCTGCAGCCCGTGACACAGAACAGAGC
CAGCAGAAGCAGCTGGCACCAGTCCAGCTTCCACAGC
ACCAGAACACTGAGAGAAGCTGGCCCTAGCGTGGCCG
TGGATTCTTCTGGTAGAAGGGCTCACCTGACAGTTGGC
CAAGCAGCTGCAGGCGGAAGCGGAAATCTGCTGACCG
AGAGAAGCACCTTCACCGACAGCCAGCTGGGCAACGC
CGACATGGAAATGACACTGGAACGGGCCGTGTCCATG
CTGGAAGCCGATCACATGCTGCCAGCAGAATTAGCG
CCGCTGCCACCTTTATCCAGCACGAGTGCTTCCAGAAG
TCTGAGGCCCGGAAGAGAGTGAACCAGCTGAGAGGC
ATCCTGAAGCTGCTGCAGCTCCTGAAGGTGCAGAACG
AGGATGTGCAGAGGGCTGTGTGTGGGGCCCTGAGAAA
TCTGGTGTTTCGAGGACAACGACAACAAGCTGGAAGTG
GCCGAGCTGAACGGCGTGCCAAGACTGCTGCAGGTTC
TGAAACAGACCCGCGACCTGGAAACAAAGAAGCAGA
TCACCGGCCTGCTCTGGAACCTGAGCAGCAACGACAA
GCTGAAGAACCTGATGATCACAGAGGCCCTGCTGACC
CTGACAGAGAACATCATCATCCCTTTCAGCGGCTGGC
CCGAGGGCGATTACCCTAAAGCTAATGGCCTGCTGGA
CTTCGACATCTTCTACAACGTGACCGGCTGCCTGAGAA
ACATGTCTAGCGCTGGCGCCGATGGCAGAAAGGCCAT
GAGAAGATGTGACGGCCTGATCGACAGCCTGGTGCAC
TATGTGCGGGGCACAATCGCCGATTACCAGCCTGATG
ATAAGGCCACCGAGAACTGCGTGTGCATCCTGCACAA
CCTGAGCTACCAGCTGGAAGCAGAGCTGCCCCGAGAAG
TACAGCCAGAACATCTACATCCAGAACCGGAACATCC
AGACCGACAACAACAAGAGCATCGGCTGCTTCGGCAG
CCGCAGCCGGAAAGTGAAAGAACAGTACCAGGACGT
GCCCATGCCTGAGGAAAAGTCTAACCCCAAAGGCGTG
GAATGGCTGTGGCACAGCATCGTGATCCGGATGTACC
TGAGCCTGATCGCCAAGAGCGTGCGGAATTACACCCA
AGAGGCATCTCTGGGCGCCCTGCAGAATCTGACAGCA
GGATCTGGCCCTATGCCTACCTCTGTGGCTCAGACCGT
GGTGCAGAAAGAGTCTGGCCTGCAGCACACCCGGAAG
ATGCTGCATGTGGGAGATCCCAGCGTGAAGAAAACCG

	<p>CCATCAGCCTGCTGAGAAACCTGAGCCGGAATCTGTC TCTGCAGAATGAGATCGCCAAAGAGACACTGCCCCGAC CTGGTGTCTATCATCCCTGACACCGTGCCTAGCACCGA CCTGCTGATTGAGACAACAGCCAGCGCCTGCTACACC CTGAACAACATCATTGAGAACTCCTACCAGAACGCCC GCGATCTGCTGAACACAGGCGGCATCCAGAAAATCAT GGCCATCTCTGCCGGCGACGCCTACGCCTCTAACAAG GCCTCTAAAGCCGCCAGCGTGCTGCTGTATTCTCTGTG GGCCCATAACGAGCTGCACCATGCCTATAAGAAGGCC CAGTTCAAAAAGACCGACTTCGTGAACAGCCGGACCG CCAAGGCCTACCACTCTCTGAAAGAT</p>	
Промотор рсTNT	<p>GTCATGGAGAAGACCCACCTTGCAGATGTCCTCACTG GGGCTGGCAGAGCCGGCAACCTGCCTAAGGCTGCTCA GTCCATTAGGAGCCAGTAGCCTGGAAGATGTCTTTAC CCCCAGCATCAGTTCAAGTGGAGCAGCACATAACTCT TGCCCTCTGCCTTCCAAGATTCTGGTGCTGAGACTTAT GGAGTGTCTTGGAGGTTGCCTTCTGCCCCCAACCCTG CTCCCAGCTGGCCCTCCCAGGCCTGGGTTGCTGGCCTC TGCTTTATCAGGATTCTCAAGAGGGACAGCTGGTTTAT GTTGCATGACTGTTCCCTGCATATCTGCTCTGGTTTTA AATAGCTTATCTGAGCAGCTGGAGGACCACATGGGCT TATATGGCGTGGGGTACATGTTCCCTGTAGCCTTGTCCC TGGCACCTGCCAAAATAGCAGCCAACACCCCCCACC CCACCGCCATCCCCCTGCCCCACCCGTCCCCTGTCGCA CATTCTCCCTCCGCAGGGCTGGCTCACCCAGCCCCAG CCCACATGCCTGCTTAAAGCCCTCTCCATCCTCTGCCT CACCCAGTCCCCGCTGAGACTGAGCAGACGCCTCCA</p>	3
Промотор PKP2	<p>CATCTCAGCATCATGGTTGGATGTTTCCACCTGGCTAC ATAAGCAAGCTTTACACAAGGTGTAATTTGCCTAAAT AGTGGTCCATTCTATTGGGGTGGGAGCAATTGCTTCCA GGACTCACATCCATATGGCTCCCCTTAGCCATGTGGC CTGCTGACAAAGGGTGGCGGAACTGTCACTACTCTGT TGTCCACGCTTTCAGTCCTTTGGTTTCCTCTTCACTCCC TGGACGCTCATGTAAAAAGGGAGGCCATATACCTGTG CATTGTGTGTCTAAGCATTGAGTGTGTGTCTAAAGGCA</p>	4

GAAGGGTGTGGGTAGGAAAACAAAGACGAGGGAAGC
TGCGTTCTCCAAACACTTCAGACTTGAGTAAGTGGGGT
TTTGCAGCAATTGAGTGATTTGAGGGAAAGTGAACAT
ACAAACCCAAGCAATCAAAGGGAATATTATCTTAATA
CCAGGGATACATGTTTTTCTTTCTGCCTCTTAAGTCCA
AAGAGGCAAATCAGGACAAGTGGCTTTGGTTGTAAAC
TTTAAGGTCAAGGATCCTTTCTGTTGAGCTTAGCTCTC
AAGTTCTCAGTAGTCAACTGCGGTGAAACATAATTAA
TAGCACGATAAATAACAAGTTGTGGAAGATTGATTGA
AAGTTGGAGGCCCTCTCCGTGGATCTCTTACAAAGA
GCCTGTAATAAAGAGGACTTAATCAACGTTAGCAGGG
CTATTTAAAAGCATCGTCTATTTAAAATTCATTTCTTC
TCTAGAGCCTCTTGTTGGAGTTTCTCTGTGTGGGTGTG
TTCGTAAGAGAGGAATGGGTTAGCAAGAGTACTGGGT
ACAATTTGTGTATCCAAGAGAAAACAGAAGCTCTCAA
TGAGGAAGAACATATGTTTCTGGGACTGCATCTGTGC
AAAAAGTACATAGTCCTGACGTTGTACTAAGAAAAA
AACACTCTCTTTAGAAAGTCTTTTATTTACACGTTAT
CTTCTTGGCACATTTCCCTCATATTGCCCTTCCGCCTG
ACCAAATAGCCCTTCTCACCTCAGGTCCAGGAAAA
CCAGGAAACGTTTCCAACAGTGCGACAAAGCCTGACT
AACCAGACATACTACTCGCTCGGGGATCCCGGAGGCA
AGCCTCAGTCCAAGAACAGGAGTGACTCTCGAGGGCT
CACCTGCCTGCAGGGCAGCCCCTCCCTGCATCGAGCG
GAAATCCATCCTGTCCAGCGCGGGGCGTGGGCAGAGC
GGGGCGCGGCCCCGGCAGGCGGTATCCGCTGGGACTC
CGACAACGTGCGCGACCCCAGGCGAACCGCGCCCCCTC
TCCCCACCTCCCCGCGGGCGGGTACAAGTCTCCAGGT
GTCCGCGCGCTCAGCGGGTCCGGCCCCGCCCCGCCCC
CGCCCCCGGGCCCGACTGCGCGTGCCCCGGCCGGAGCC
GCGCCCCCTCCTCAGGGAAGGCCGGGCGTCCGGCCCA
CGAGGCCGAGCTCCCCCGGCCCCGGGCCTCTCACCG
GCGCGGGGGGCGGGCCAGGGGCGGGGCGGACTCGA
GCGGGGCGGGGCTCGCGCCAGCGCCCCAGCTCCGTG
GCGGCTTCGCCCGCGAGTCCAGAGGCAGGCGAGCAGC

	TCGGTCGCCCCACCGGCCCC	
Экспрессионная кассета AAV для PKP2а человека (промотор pTnT, кодон- оптимизированн ая)	ctgcgcgctcgcctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctcgggagacct ttggtcgcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagaggagtgccaactccat cactaggggttcctttagttaaataaccggccatgctacttatctacgtagccatgctet aggaagatcggaattcGCCCTTAAGTCATGGAGAAGACCCACC TTGCAGATGTCCTCACTGGGGCTGGCAGAGCCGGCAA CCTGCCCAAGGCTGCTCAGTCCATTAGGAGCCAGTAG CCTGGAAGATGTCTTTACCCCCAGCATCAGTTCAAGTG GAGCAGCACATAACTCTTGCCCTCTGCCTTCCAAGATT CTGGTGCTGAGACTTATGGAGTGTCTTGGAGGTTGCCT TCTGCCCCCAACCCTGCTCCCAGCTGGCCCTCCCAGG CCTGGGTTGCTGGCCTCTGCTTTATCAGGATTCTCAAG AGGGACAGCTGGTTTATGTTGCATGACTGTTCCCTGCA TATCTGCTCTGGTTTTAAATAGCTTATCTGAGCAGCTG GAGGACCACATGGGCTTATATGGCGTGGGGTACATGT TCCTGTAGCCTTGTCCTGGCACCTGCCAAAATAGCAG CCAACACCCCCACCCCCACCGCCATCCCCCTGCCCA CCCGTCCCCTGTCGCACATTCCTCCCTCCGCAGGGCTG GCTCACCAGGCCCCAGCCCACATGCCTGCTTAAAGCC CTCTCCATCCTCTGCCTCACCCAGTCCCCGCTGAGACT GAGCAGACGCCTCCAGCCACCATGGCTGCTCCTGGTG CTCCTGCCGAGTACGGCTACATCAGAACAGTGCTGGG CCAGCAGATCCTGGGACAGCTGGATTCTAGCTCTCTG GCCCTGCCTTCTGAGGCCAAGCTGAAACTGGCCGGCA GTTCTGGAAGAGGCGGCCAGACAGTGAAGTCCCTGCG GATCCAAGAACAGGTGCAGCAGACCCTGGCCAGAAA GGGCAGATCTTCTGTGCGCAACGGCAACCTGCACAGA ACCAGCTCTGTGCCCCGAGTACGTGTACAATCTGCACCT GGTGGAAAACGACTTCGTGCGCGGCAGATCCCCTGTG CCTAAGACCTACGATATGCTGAAGGCCGGCACCCCG CCACCTATGAAGGCAGATGGGGAAGAGGCACAGCCC AGTACAGCAGCCAGAAAAGCGTGGAAGAGAGAAGCC TGCGGCACCCTCTGCGGAGACTGGAAATCAGCCCTGA TAGCAGCCCAGAGAGAGCCCACTACCCCACAGCGAC TACCAGTACTCCCAGAGATCTCAGGCCGGCCACACAC	5

TGCACCACCAAGAGTCTAGAAGGGCCGCTCTGCTGGT
GCCTCCTAGATACGCCAGATCTGAGATCGTGGGCGTG
TCCAGAGCCGGCACAACAAGCAGACAGAGACACTTCG
ACACCTACCACCGGCAGTATCAGCACGGCAGCGTGTC
CGATACCGTGTTTCGATAGCATCCCCGCCAATCCTGCTC
TGCTGACATACCCTAGACCTGGCACCTCCAGATCCATG
GGCAATCTGCTGGAAAAAGAGAACTACCTGACCGCCG
GACTGACCGTGGGACAAGTTCGACCTCTGGTTCCTCTG
CAGCCCGTGACACAGAACAGAGCCAGCAGAAGCAGC
TGGCACCAGTCCAGCTTCCACAGCACCAGAACACTGA
GAGAAGCTGGCCCTAGCGTGGCCGTGGATTCTTCTGG
TAGAAGGGCTCACCTGACAGTTGGCCAAGCAGCTGCA
GGCGGAAGCGGAAATCTGCTGACCGAGAGAAGCACCT
TCACCGACAGCCAGCTGGGCAACGCCGACATGGAAAT
GACACTGGAACGGGCCGTGTCCATGCTGGAAGCCGAT
CACATGCTGCCCAGCAGAATTAGCGCCGCTGCCACCT
TTATCCAGCACGAGTGCTTCCAGAAGTCTGAGGCCCG
GAAGAGAGTGAACCAGCTGAGAGGCATCCTGAAGCTG
CTGCAGCTCCTGAAGGTGCAGAACGAGGATGTGCAGA
GGGCTGTGTGTGGGGCCCTGAGAAATCTGGTGTTCGA
GGACAACGACAACAAGCTGGAAGTGGCCGAGCTGAA
CGGCGTGCCAAGACTGCTGCAGGTTCTGAAACAGACC
CGCGACCTGGAAACAAGAAGCAGATCACCGGCCTGC
TCTGGAACCTGAGCAGCAACGACAAGCTGAAGAACCT
GATGATCACAGAGGCCCTGCTGACCCTGACAGAGAAC
ATCATCATCCCTTTCAGCGGCTGGCCCGAGGGCGATTA
CCCTAAAGCTAATGGCCTGCTGGACTTCGACATCTTCT
ACAACGTGACCGGCTGCCTGAGAAACATGTCTAGCGC
TGGCGCCGATGGCAGAAAGGCCATGAGAAGATGTGAC
GGCCTGATCGACAGCCTGGTGC ACTATGTGCGGGGCA
CAATCGCCGATTACCAGCCTGATGATAAGGCCACCGA
GAACTGCGTGTGCATCCTGCACAACCTGAGCTACCAG
CTGGAAGCAGAGCTGCCCCGAGAAGTACAGCCAGAAC
ATCTACATCCAGAACCGGAACATCCAGACCGACAACA
ACAAGAGCATCGGCTGCTTCGGCAGCCGCAGCCGGAA

AGTGAAAGAACAGTACCAGGACGTGCCCATGCCTGAG
GAAAAGTCTAACCCCAAAGGCGTGGAATGGCTGTGGC
ACAGCATCGTGATCCGGATGTACCTGAGCCTGATCGC
CAAGAGCGTGC GGAATTACACCCAAGAGGCATCTCTG
GGCGCCCTGCAGAATCTGACAGCAGGATCTGGCCCTA
TGCCTACCTCTGTGGCTCAGACCGTGGTGCAGAAAGA
GTCTGGCCTGCAGCACACCCGGAAGATGCTGCATGTG
GGAGATCCCAGCGTGAAGAAAACCGCCATCAGCCTGC
TGAGAAACCTGAGCCGGAATCTGTCTCTGCAGAATGA
GATCGCCAAAGAGACACTGCCCGACCTGGTGTCTATC
ATCCCTGACACCGTGCCTAGCACCGACCTGCTGATTGA
GACAACAGCCAGCGCCTGCTACACCCTGAACAACATC
ATTCAGAACTCCTACCAGAACGCCCGCGATCTGCTGA
ACACAGGCGGCATCCAGAAAATCATGGCCATCTCTGC
CGGCGACGCCTACGCCTCTAACAAGGCCTCTAAAGCC
GCCAGCGTGCTGCTGTATTCTCTGTGGGCCCATACCGA
GCTGCACCATGCCTATAAGAAGGCCAGTTCAAAAAG
ACCGACTTCGTGAACAGCCGGACCGCCAAGGCCTACC
ACTCTCTGAAAGATTAAtaagcttggatccaatcaacctctggattacaaa
atftgtgaaagattgactggattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtget
ftaatgcctttgtatcatgctattgctcccgtatggctttcattttctcctctgtataaatcctg
gttgetgtctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcgtggtgtgactgt
gtttgetgacgcaacccccactggttggggcattgccaccactgtcagetctttccggg
actttcgtttccccctcctattgccacggcggaaactcatcgccgctgccttcccgetg
ctggacaggggctcggctgttgggactgacaattccgtggtgtgtcggggaaATCA
TegtctttccTtggctgctcgcctgtgttgcacactggattctgcgcgggacgtccttctg
ctacgtcccttggccctcaatccagcggaccttcttcccggcctgctgccggctctg
cggcctctccgctcttcgagatctgcctcactgtgccttctagttgccagccatctgttgt
ttgcccctccccgtgccttcttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaata
aaatgaggaaattgcatcgcaattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtgg
ggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgtgggggaCTG
GGGACTCGAGTTAAGGGCgaattcccgataaggatcttctagagcatg
gctacgtagataagtagcatggcgggtaatacattaactacaaggaaccctagtgatgga
gttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggctc
cccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgag

<p>Экспрессионная кассета AAV для PKP2а человека (промотор PKP2, кодон- оптимизированн ая)</p>	<p>ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacct ttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtgcccaactccat cactaggggttcctttagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctct aggaagatcggaattcGCCCTTAACATCTCAGCATCATGGTTGG ATGTTTCCACCTGGCTACATAAGCAAGCTTTACACAAG GTGTAATTTGCCTAAATAGTGGTCCATTCTATTGGGGT GGGAGCAATTGCTTCCAGGACTCACATCCATATGGCT CCCCTTAGCCATGTGGCCTGCTGACAAAGGGTGGCG GAACTGTCACTACTCTGTTGTCCACGCTTTCAGTCCTT TGGTTTCCTCTTCACTCCCTGGACGCTCATGTAAAAAG GGAGGCCATATACCTGTGCATTGTGTGTCTAAGCATTC AGTGTGTGTCTAAAGGCAGAAGGGTGTGGGTAGGAAA ACAAAGACGAGGGAAGCTGCGTTCTCCAAACACTTCA GACTTGAGTAAGTGGGGTTTTGCAGCAATTGAGTGAT TTGAGGGAAAGTGAACATACAAACCCAAGCAATCAAA GGGAATATTATCTTAATACCAGGGATACATGTTTTTCT TTCTGCCTCTTAAGTCCAAAGAGGCAAATCAGGACAA GTGGCTTTGGTTGTAAACTTTAAGGTCAAGGATCCTTT CTGTTGAGCTTAGCTCTCAAGTTCTCAGTAGTCAACTG CGGTGAAACATAATTAATAGCACGATAAATACAAGTT GTGGAAGATTCGATTGAAAGTTGGAGGCCCTCTCCGT GGATCTCTCTACAAAGAGCCTGTAATAAAGAGGACTT AATCAACGTTAGCAGGGCTATTTAAAAGCATCGTCT ATTAATAATCATTCTTCTCTAGAGCCTCTTGTTGGAG TTTTCTGTGTGGGTGTGTTTCGTAAGAGAGGAATGGGT TAGCAAGAGTACTGGGTACAATTTGTGTATCCAAGAG AAAACAGAAGCTCTCAATGAGGAAGAACATATGTTTC TGGGACTGCATCTGTGCAAAAAGTACATAGTCCTGAC GTTGTAATAAGAAAAAAACACTCTCTTTAGAAAGTC TTTTATTTACACGTTATCTTCTTGGCACATTTCCCTCA TATTGCCCTTTCCGCCTGACCAAATAGCCCTTTCTCAC CCTCAGGTCCAGGAAAACCAGGAAACGTTTCCAACAG TGCGACAAAGCCTGACTAACCAGACATACTACTCGCT CGGGGATCCCGGAGGCAAGCCTCAGTCCAAGAACAGG AGTGACTCTCGAGGGCTCACCTGCCTGCAGGGCAGCC</p>	<p>6</p>
--	---	----------

CCTCCCTGCATCGAGCGGAAATCCATCCTGTCCAGCGC
GGGGCGTGGGCAGAGCGGGGCGCGGCCCCCGGCAGGC
GGTATCCGCTGGGACTCCGACAACGTGCGCGACCCCA
GGCGAACCGCGCCCCCTCTCCCCACCTCCCCGCGGGCG
GGTACAAGTCTCCAGGTGTCCGCGCGCTCAGCGGGTC
CGGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGGGCCCCACTGCG
CGTGCCCGGCCGGAGCCGCGCCCCCTCCTCAGGGAAG
GCCGGGCGTCCGGCCCACGAGGCCGAGCTCCCCCCG
GCCCGGGCCTCTACCGGGCGCGGGGGGCGGGCCAGGG
GCGGGGCCGGACTCGAGCGGGGCGGGGCTCGCGCCA
GCGCCCCAGCTCCGTGGCGGCTTCGCCCCGAGTCC
AGAGGCAGGCGAGCAGCTCGGTGCCCCACCGGCC
CATGGCTGCTCCTGGTGCTCCTGCCGAGTACGGCTACA
TCAGAACAGTGCTGGGCCAGCAGATCCTGGGACAGCT
GGATTCTAGCTCTCTGGCCCTGCCTTCTGAGGCCAAGC
TGAAACTGGCCGGCAGTTCTGGAAGAGGCGGCCAGAC
AGTGAAGTCCCTGCGGATCCAAGAACAGGTGCAGCAG
ACCCTGGCCAGAAAGGGCAGATCTTCTGTCGGCAACG
GCAACCTGCACAGAACCAGCTCTGTGCCCCGAGTACGT
GTACAATCTGCACCTGGTGGAAAACGACTTCGTCCGC
GGCAGATCCCCTGTGCCTAAGACCTACGATATGCTGA
AGGCCGGCACCAACCGCCACCTATGAAGGCAGATGGGG
AAGAGGCACAGCCCAGTACAGCAGCCAGAAAAGCGT
GGAAGAGAGAAGCCTGCGGCACCCTCTGCGGAGACTG
GAAATCAGCCCTGATAGCAGCCCAGAGAGAGCCCCT
ACACCCACAGCGACTACCAGTACTCCCAGAGATCTCA
GGCCGGCCACACACTGCACCACCAAGAGTCTAGAAGG
GCCGCTCTGCTGGTGCCTCCTAGATACGCCAGATCTGA
GATCGTGGGCGTGTCCAGAGCCGGCACAACAAGCAGA
CAGAGACACTTCGACACCTACCACCGGCAGTATCAGC
ACGGCAGCGTGTCCGATACCGTGTTTCGATAGCATCCC
CGCCAATCCTGCTCTGCTGACATACCCTAGACCTGGCA
CCTCCAGATCCATGGGCAATCTGCTGGAAAAGAGAA
CTACCTGACCGCCGGACTGACCGTGGGACAAGTTCGA
CCTCTGGTTCCTCTGCAGCCCGTGACACAGAACAGAG

CCAGCAGAAGCAGCTGGCACCCAGTCCAGCTTCCACAG
CACCAGAACACTGAGAGAAGCTGGCCCTAGCGTGGCC
GTGGATTCTTCTGGTAGAAGGGCTCACCTGACAGTTG
GCCAAGCAGCTGCAGGCGGAAGCGGAAATCTGCTGAC
CGAGAGAAGCACCTTCACCGACAGCCAGCTGGGCAAC
GCCGACATGGAAATGACACTGGAACGGGCCGTGTCCA
TGCTGGAAGCCGATCACATGCTGCCCAGCAGAATTAG
CGCCGCTGCCACCTTTATCCAGCACGAGTGCTTCCAGA
AGTCTGAGGCCCGGAAGAGAGTGAACCAGCTGAGAG
GCATCCTGAAGCTGCTGCAGCTCCTGAAGGTGCAGAA
CGAGGATGTGCAGAGGGCTGTGTGTGGGGCCCTGAGA
AATCTGGTGTTCGAGGACAACGACAACAAGCTGGAAG
TGGCCGAGCTGAACGGCGTGCCAAGACTGCTGCAGGT
TCTGAAACAGACCCGCGACCTGGAAACAAGAAGCA
GATCACCGGCCTGCTCTGGAACCTGAGCAGCAACGAC
AAGCTGAAGAACCTGATGATCACAGAGGCCCTGCTGA
CCCTGACAGAGAACATCATCATCCCTTTCAGCGGCTG
GCCCGAGGGCGATTACCCTAAAGCTAATGGCCTGCTG
GACTTCGACATCTTCTACAACGTGACCGGCTGCCTGAG
AAACATGTCTAGCGCTGGCGCCGATGGCAGAAAGGCC
ATGAGAAGATGTGACGGCCTGATCGACAGCCTGGTGC
ACTATGTGCGGGGCACAATCGCCGATTACCAGCCTGA
TGATAAGGCCACCGAGAACTGCGTGTGCATCCTGCAC
AACCTGAGCTACCAGCTGGAAGCAGAGCTGCCCGAGA
AGTACAGCCAGAACATCTACATCCAGAACCGGAACAT
CCAGACCGACAACAACAAGAGCATCGGCTGCTTCGGC
AGCCGCAGCCGGAAGTGAAAGAACAGTACCAGGAC
GTGCCCATGCCTGAGGAAAAGTCTAACCCCAAAGGCG
TGGAATGGCTGTGGCACAGCATCGTGATCCGGATGTA
CCTGAGCCTGATCGCCAAGAGCGTGCGGAATTACACC
CAAGAGGCATCTCTGGGCGCCCTGCAGAATCTGACAG
CAGGATCTGGCCCTATGCCTACCTCTGTGGCTCAGACC
GTGGTGCAGAAAGAGTCTGGCCTGCAGCACACCCGGA
AGATGCTGCATGTGGGAGATCCCAGCGTGAAGAAAAC
CGCCATCAGCCTGCTGAGAAACCTGAGCCGGAATCTG

	<p>TCTCTGCAGAATGAGATCGCCAAAGAGACACTGCCCG ACCTGGTGTCTATCATCCCTGACACCGTGCCTAGCACC GACCTGCTGATTGAGACAACAGCCAGCGCCTGCTACA CCCTGAACAACATCATTCAGAACTCCTACCAGAACGC CCGCGATCTGCTGAACACAGGCGGCATCCAGAAAATC ATGGCCATCTCTGCCGGCGACGCCTACGCCTCTAACA AGGCCTCTAAAGCCGCCAGCGTGCTGCTGTATTCTCTG TGGGCCCATACCGAGCTGCACCATGCCTATAAGAAGG CCCAGTTCAAAAAGACCGACTTCGTGAACAGCCGGAC CGCCAAGGCCTACCACTCTCTGAAAGATGTTCGACGGA TCCGGTACCGATTACAAGGACGACGATGACAAGTGAA GCTTAATAAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTG TTGGTTTTTTGTGTGCTGGGGACTCGAGTTAAGGGCgaa ttcccataaggatcttctagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggtaaatcat taactacaaggaaccctagtgatggagtggccactccctctctgcegcgctcgcctcgc actgaggccgggaccaaaggctgccccgacgcccgggctttgccccgggagcctca gtgagcgagcgagcgcgcag</p>	
<p>Последовательно сть генома AAV9</p>	<p>ACGGCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCA GCGACCTTGACGAGCATCTGCCCGGCATTTCTGACAG CTTTGTGAACTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTG CCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGC AGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGA CTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCCG GAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGA GCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAACCACCGG GGTGAATCCATGGTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGA TTCGCGAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGAT CGAGCCGACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGTCACAAAG ACCAGAAATGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTG GATGAGTGCTACATCCCCAATTACTTGCTCCCCAAAAC CCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAA CAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAA ACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTTCGAG ACGCAGGAGCAGAACAAGAGAATCAGAATCCCAAT TCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAATTCAGCCA</p>	<p>7</p>

GGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGG
GATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAG
GCCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTCGCG
GTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAG
ATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCGACTACCTGG
TGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCG
GATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCC
CAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAA
AAAGTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGG
CCTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCA
TAGCCCACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGG
ACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTCGACA
AGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCG
CCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGG
AAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCTCG
GCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCA
ACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAAC
GACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATG
TTCAAATTTGAACTACCCGCCGTCTGGATCATGACTT
TGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTC
CGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATG
AATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACC
CGCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGG
GTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACG
CGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAA
CAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGT
TTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTC
AAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTA
GAGTGCTTTCCCGTGTGAGAATCTCAACCCGTTTCTGT
CGTCAAAAAGGCGTATCAGAACTGTGCTACATTCAT
CATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCCT
GCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTT
GAACAATAAatgacttaaccaggtATGGCTGCCGATGGTTATC
TTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTTAGTGAAGGAAT
TCGCGAGTGGTGGGCTTTGAAACCTGGAGCCCCTCAA

CCCAAGGCAAATCAACAACATCAAGACAACGCTCGAG
GTCTTGTGCTTCCGGGTACAAATACCTTGGACCCGGC
AACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGTCAACGCAGCA
GACGCGGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACC
AGCAGCTCAAGGCCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTA
CAACCACGCCGACGCCGAGTTCAGGAGCGGCTCAA
GAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAG
TCTTCCAGGCCAAAAGAGGGCTTCTTGAACCTCTTGGT
CTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGA
AGAGGCCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTC
CTCCGCGGGTATTGGCAAATCGGGTGCACAGCCCGCT
AAAAGAGACTCAATTTTCGGTCAGACTGGCGACACAG
AGTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCTCC
CGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAATGGCTT
CAGGTGGTGGCGCACCAGTGGCAGACAATAACGAAG
GTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCCTCGGGAAATTGGCA
TTGCGATTCCCAATGGCTGGGGGACAGAGTCATCACC
ACCAGCACCCGAACCTGGGGCCCTGCCACCTACAACA
ATCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGG
AGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGC
ACCCCCTGGGGGTATTTTACTTCAACAGATTCCACTG
CCTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAAC
AACAACTGGGGATTCCGGCCTAAGCGACTCAACTTCA
AGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAA
CAATGGAGTCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGC
ACGGTCCAGGTCTTACGGACTCAGACTATCAGCTCCC
GTACGTGCTCGGGTTCGGCTCACGAGGGCTGCCTCCCG
CCGTTCCCAGCGGACGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGG
GTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGTGGGT
CGTTCGTCCTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCGTCGCA
AATGCTAAGAACGGGTAACAACCTTCCAGTTCAGCTAC
GAGTTTGAGAACGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCA
CAGCCAAAGCCTGGACCGACTAATGAATCCACTCATC
GACCAATACTTGTACTATCTCTCAAAGACTATTAACGG
TTCTGGACAGAATCAACAACGCTAAAATTCAGTGTG

	<p>GCCGGACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAAGAACT ACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTC AACCCTGTGACTCAAAACAACAACAGCGAATTTGCT TGGCCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAA TAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCAC AAAGAAGGAGAGGACCGTTTCTTTCTTTGTCTGGATC TTAATTTTTGGCAAACAAGGAACTGGAAGAGACAAC GTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAA GAAATTA AAACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTCCT ATGGACAAGTGGCCACAAACCACCAGAGTGCCCAAGC ACAGGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAACCAAGGAATA CTTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACC TGCAAGGACCCATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGA CGGCAACTTTCACCCTTCTCCGCTGATGGGAGGGTTTG GAATGAAGCACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAA CACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGCCTTCAACA AGGACAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACT GGCCAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGA AGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAGT ACACTTCCA ACTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTT GCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCC CCATTGGCACCCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAA</p>	
Белок PKP2	<p>MAAPGAPAEYGYIRTVLGQQILGQLDSSSLALPSEAKLK LAGSSGRGGQTVKSLRIQEQVQQLARKGRSSVGNLNL HRTSSVPEYVYNLHLVENDFVGRSPVPKTYDMLKAGT TATYEGRWGRGTAQYSSQKSVEERSLRHPLRRLEISPDSS PERAHYTHSDYQYSQRSQAGHTLHHQESRRAALLVPPR YARSEIVGVSRA GTTSRQRHFDYHRQYQHGSVSDTVFD SIPANPALLTYPRPGTSRSMGNLLEKENYLTAGLTVGQV RPLVPLQPVTQNRASRSSHQSSFHSTRTLREAGPSVAV DSSGRR AHLTVGQAAAGGSGNLLTERSTFTDSQLGNAD MEMTLERAVSMLEADHMLPSRISAAATFIQHECFQKSEA RKRVNQLRGILKLLQLLKVNEDVQRAVCGALRNLVFE DNDNKLEVAELNGVPRLLQVLKQTRDLETKKQITGLLW NLSSNDKLNLMITEALLTLTENIIPFSGWPEGDYPKAN</p>	8

	<p>GLLDFDIFYNVTGCLRNMSSAGADGRKAMRRCDDLIDS LVHYVRGTIADYQPDDKATENCVCILHNLSYQLEAEPE KYSQNIYIQNRNIQTDNNK SIGCFGSRSRKVKEQYQDVP MPEEKSNPKGVEWLWHSIVIRMYLSLIAKSVRNYTQEAS LGALQNLTAGSGPMPTVAQTVVQKESGLQHTRKMLHV GDPSVKKTAISLLRNLSRNLSLQNEIAKETLPDLVSIIPDT VPSTDLLIETTASACYTLNNIIQNSYQNARDLLNTGGIQKI MAISAGDAYASNKASKAASVLLYSLWAHTELHHAYKK AQFKKTDFVNSRTAKAYHSLKD</p>	
WPRE	<p>TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG GTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGAT ACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCC GTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGT TGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGG CAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAA CCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTC CTTCCGGGACTTTCGCTTCCCCCTCCCTATTGCCACG GCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGAC AGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTG TTGTGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGC CTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCT GCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCT TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCG TCTTCG</p>	9
ПолиА сигнал hGH	<p>CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT TGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGC CACTCCCACCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTG CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGACTGGGGA</p>	10
WPRE - кассета с полиА сигналом hGH	<p>TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG GTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGAT ACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCC GTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGT TGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGG</p>	11

	<p>CAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAA CCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTC CTTCCGGGACTTTCGCTTTCCTCCCTATTGCCACG GCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGAC AGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTG TTGTGCGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGC CTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCT GCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCT TCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTCCGCG TCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCA GCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTAC CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAA ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA TTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGG GACTGGGGACTCGAGTTAAGGGCGAATCCCGATAAG GATCTTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCAT GGCGGGTTAATCATTAATACTACA</p>	
<p>Аминокислотная последовательно сть капсида AAV9</p>	<p>MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQ HQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNAADAAALE HDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFG GNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQS PQEPDSSAGIGKSGAQPAAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIG EPPAAPSGVGSALTMASSGGAPVADNNEGADGVGSSSGN WHCDSQWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTS GGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRPDWQRLIN NNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTV QVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLT LNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV PFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQ TLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNN NSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFF PLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATE SYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRD VYLQGIWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGMKHPPPQILIKN</p>	<p>12</p>

	TPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKEN SKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTR YLTRNL	
--	---	--

Вирусные векторы

[0055] Подходящие вирусные векторы для способов и векторов для генной терапии, предложенных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, вирусные векторы (например, вирусные векторы на основе вируса осповакцины; полиовируса; аденовируса (например, Li et al. (1994) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2543-2549; Borrás et al. (1999) *Gene Ther* 6:515-524; Li and Davidson, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:7700-7704; Sakamoto et al. (1999) *Hum Gene Ther* 5: 1088-1097; WO 94/12649; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 и WO 95/00655); аденоассоциированного вируса (например, Ali et al. (1998) *Hum Gene Ther* 9(1):81-86, 1998, Flannery et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:6916-6921, Bennett et al. (1997) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2857-2863; Jomary et al. (1997) *Gene Ther* 4:683-690; Rolling et al. (1999), *Hum Gene Ther* 10:641-648; Ali et al. (1996) *Hum Mol Genet.* 5:591-594; WO 93/09239, Samulski et al. (1989) *J. Vir.* 63:3822-3828; Mendelson et al. (1988) *Viol.* 166:154-165; и Flotte et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10613-10617; SV40; вируса простого герпеса; вируса иммунодефицита человека (например, Miyoshi et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 10319-10323; Takahashi et al. (1999) *J Virol* 73: 7812-7816); ретровирусного вектора (например, вируса мышинового лейкоза, вируса некроза селезенки, и векторов, полученных из ретровирусов, таких как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус птичьего лейкоза, лентивирус, вирус иммунодефицита человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы); и тому подобные. Специалистам в данной области известны многочисленные подходящие экспрессионные векторы, и многие из них коммерчески доступны. Следующие векторы предложены в качестве примера; для эукариотических клеток: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia) и pAd (Life Technologies). Однако предусмотрено использование любого другого вектора, если он совместим со способами по настоящему изобретению.

[0056] Способность некоторых вирусов инфицировать клетки или проникать в клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, а также стабильно и эффективно экспрессировать вирусные гены сделала их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных нуклеиновых кислот в клетки (например, клетки млекопитающих). Предполагается, что вирусные векторы включают контрольные последовательности, такие как промоторы, для экспрессии интересующего полипептида. Хотя многие вирусные векторы интегрируются в геном клетки-хозяина, при желании сегменты, обеспечивающие такую интеграцию, могут быть удалены или изменены для предотвращения такой интеграции. Более того, в некоторых вариантах осуществления векторы не содержат точку начала репликации млекопитающих. Ниже приведены неограничивающие примеры

вирусных векторов, которые предполагается использовать для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих РКР2, в выбранную клетку. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор получен из вируса, дефектного по репликации.

[0057] Как правило, другие полезные вирусные векторы основаны на не цитопатических эукариотических вирусах, в которых несущественные гены заменены интересующим полипептидом. К не цитопатическим вирусам относятся некоторые ретровирусы, жизненный цикл которых включает обратную транскрипцию геномной вирусной РНК в ДНК, с последующей интеграцией провируса в клеточную ДНК хозяина. Как правило, ретровирусы дефектны по репликации (например, способны направлять синтез желаемых транскриптов, но неспособны производить инфекционную частицу). Такие генетически измененные ретровирусные экспрессионные векторы имеют общее применение для высокоэффективной трансдукции полинуклеотида *in vivo*.

[0058] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий РКР2, содержится в инфекционном вирусе, который был сконструирован для экспрессии специфического связывающего лиганда. Таким образом, вирусная частица будет специфически связываться с соответствующими рецепторами клетки-мишени и доставлять содержимое в клетку. В некоторых вариантах осуществления вирус модифицирован для придания ему конкретного вирусного тропизма, например, вирус преимущественно инфицирует фибробласты, клетки сердца или, более конкретно, сердечные фибробласты (CF). Для AAV в некоторых случаях капсидные белки подвергаются мутациям с целью изменения тропизма вирусного вектора. Например, тропизм лентивирусов часто модифицируют за счет использования других белков оболочки; это известно как «псевдотипирование».

[0059] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. Ретровирусы часто интегрируют свои гены в геном хозяина, переносят большое количество чужеродного генетического материала, инфицируют широкий спектр биологических видов и типов клеток, и часто упаковываются в специальных клеточных линиях (Miller et al., *Am. J. Clin. Oncol.*, 15(3):216-221, 1992). В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор изменен таким образом, что он не интегрируется в геном клетки-хозяина.

[0060] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный ретровирус содержит вирусный полипептид (например, ретровирусный env), способствующий проникновению в клетку-мишень. Такие вирусные полипептиды хорошо известны в данной области, например, описаны в патенте США № 5449614. В некоторых вариантах осуществления вирусный полипептид представляет собой амфотропный вирусный полипептид, например, амфотропный env, который способствует проникновению в клетки, полученные от разных биологических видов, включая клетки, не принадлежащие исходному виду-хозяину. В некоторых вариантах осуществления вирусный полипептид представляет собой ксенотропный вирусный полипептид, который способствует проникновению в клетки, не принадлежащие исходному виду-хозяину. В некоторых

вариантах осуществления вирусный полипептид представляет собой экотропный вирусный полипептид, например, экотропный env, который способствует проникновению в клетки исходного вида-хозяина.

[0061] Примеры вирусных полипептидов, которые могут способствовать проникновению ретровирусов в клетки, включают, но не ограничиваются ими: амфотропный env MMLV, экотропный env MMLV, ксенотропный env MMLV, g-белок вируса везикулярного стоматита (VSV-g), env HIV-1, env вируса лейкоза гиббонов (GALV), RD114, FeLV-C, FeLV-B, env 10A1 MLV, а также их варианты, включая химеры. Yee et al. (1994) *Methods Cell Biol*, Pt A:99-112 (VSV-G); патент США № 5449614. В некоторых случаях вирусный полипептид генетически модифицируют для стимуляции экспрессии или усиленного связывания с рецептором.

[0062] В некоторых вариантах осуществления ретровирусная конструкция получена из ряда ретровирусов, например, MMLV, HIV-1, SIV, FIV или другого ретровируса, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ретровирусная конструкция кодирует все вирусные полипептиды, необходимые для более чем одного цикла репликации конкретного вируса. В некоторых случаях эффективность проникновения вируса повышают путем добавления других факторов или других вирусных полипептидов. В других случаях вирусные полипептиды, кодируемые ретровирусной конструкцией, не поддерживают более одного цикла репликации, например, как описано в патенте США № 6872528. В таких обстоятельствах добавление других факторов или других вирусных полипептидов часто способствует проникновению вируса. В иллюстративном варианте осуществления рекомбинантный ретровирус представляет собой вирус HIV-1, содержащий полипептид VSV-g, но не содержащий полипептид env HIV-1.

[0063] В некоторых вариантах осуществления ретровирусная конструкция содержит: промотор, сайт множественного клонирования и/или ген устойчивости. Примеры промоторов включают, но не ограничиваются ими, промоторы CMV, SV40, EF1a, β -актина; ретровирусных LTR и индуцируемые промоторы. В некоторых вариантах осуществления ретровирусная конструкция содержит сигнал упаковки (например, сигнал упаковки, полученный из вектора MFG; сигнал упаковки psi). Примеры некоторых ретровирусных конструкций, известных в данной области, включают, но не ограничиваются ими: pMX, pBabeX или их производные. Onishi et al. (1996) *Experimental Hematology*, 24:324-329. В некоторых случаях ретровирусная конструкция представляет собой самоинактивирующийся лентивирусный вектор (SIN). Miyoshi et al. (1998) *J. Virol* 72(10):8150-8157. В некоторых случаях ретровирусная конструкция представляет собой LL-CG, LS-CG, CL-CG, CS-CG, CLG или MFG. Miyoshi et al. (1998) *J. Virol* 72(10):8150-8157; Onishi et al. (1996) *Experimental Hematology*, 24:324-329; Riviere et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:6733-6737.

[0064] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор конструируют путем встраивания нуклеиновой кислоты (например, кодирующей

интересующий полипептид или РНК) в вирусный геном вместо некоторых вирусных последовательностей для получения вируса, дефектного по репликации. Для получения вирионов создают линию клеток-упаковщиков, содержащих гены *gag*, *pol* и *env*, но без LTR и компонентов для упаковки (Mann et al., Cell 33:153-159, 1983). Когда рекомбинантную плазмиду, содержащую кДНК, вместе с ретровирусными LTR и упаковочными последовательностями вводят в клетки специальной линии (например, путем осаждения фосфатом кальция или липидной трансфекции), упаковочная последовательность позволяет упаковывать РНК-транскрипт рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем секретируются в культуральную среду (Nicolas and Rubinstein, в: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988; Temin, в: Gene Transfer, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986; Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983). Среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы, затем собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Ретровирусные векторы способны инфицировать широкий спектр типов клеток. Однако интеграция и стабильная экспрессия обычно включают деление клеток-хозяев (Paskind et al., Virology, 67:242-248, 1975).

[0065] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. Лентивирусы представляют собой сложные ретровирусы, которые, помимо общих ретровирусных генов *gag*, *pol* и *env*, содержат и другие гены с регуляторной или структурной функцией. Информация о лентивирусных векторах доступна, например, в Naldini et al., Science 272(5259):263-267, 1996; Zufferey et al., Nat Biotechnol 15(9):871-875, 1997; Blomer et al., J Virol. 71(9):6641-6649, 1997; патентах США №№ 6013516 и 5994136, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Некоторые примеры лентивирусов включают вирусы иммунодефицита человека: HIV-1, HIV-2 и вирус иммунодефицита обезьян: SIV. Лентивирусные векторы были созданы путем ослабления генов вирулентности HIV, например, гены *env*, *vif*, *vpr*, *vri* и *nef* удалены для биологической безопасности вектора. Используемый лентивирус иногда бывает дефектным по репликации и/или интеграции.

[0066] Рекомбинантные лентивирусные векторы способны инфицировать неделящиеся клетки, и их иногда используют для переноса генов как *in vivo*, так и *ex vivo*, и экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. Например, рекомбинантный лентивирус, способный инфицировать неделящуюся клетку, где подходящая клетка-хозяин трансфицирована двумя или более векторами, несущими функции упаковки, а именно *gag*, *pol* и *env*, а также *rev* и *tat*, описан в патенте США № 5994136, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вирус нацеливают за счет связывания оболочечного белка с антителом или конкретным лигандом для нацеливания на рецептор клеток определенного типа. Например, вектор, специфический для мишени, иногда получают путем вставки интересующего сегмента нуклеиновой кислоты (включая регуляторную область) в вирусный вектор вместе с другим геном, который кодирует

лиганд для рецептора на клетках-мишенях конкретного типа.

[0067] Лентивирусные векторы известны в данной области, смотри Naldini et al. (1996 и 1998); Zufferey et al. (1997); Dull et al., 1998, патенты США №№ 6013516 и 5994136, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Как правило, эти векторы основаны на плазмиде или вирусе и спроектированы для содержания последовательностей, необходимых для включения чужеродной нуклеиновой кислоты, для селекции и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. В некоторых случаях лентивирусный вектор вводят в клетку одновременно с одной или более плазмидами для упаковки лентивирусов, которые включают, без ограничения, pMD2.G, pRSV-*rev*, pMDLG-pRRE и pRRL-GOI. В некоторых вариантах осуществления введение лентивирусного вектора в клетку, отдельно или в сочетании с плазмидами для упаковки лентивируса, вызывает упаковку лентивирусного вектора в лентивирусную частицу. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор представляет собой не интегрирующий лентивирусный (NIL) вектор. Иллюстративные способы получения NIL векторов, такие как замена D64V в гене интегразы, описаны в US 8119119.

[0068] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор. Генетическая организация аденовируса включает примерно 36 т.п.н. линейной двухцепочечной ДНК вируса, что позволяет замещать большие фрагменты аденовирусной ДНК чужеродными последовательностями размером до 7 т.п.н. (Grunhaus et al., *Seminar in Virology* 200(2):535-546, 1992)). В некоторых случаях РКР2 вводят в клетку путем трансфекции аденовирусом. Сообщалось о повышении эффективности трансфекции в клеточных системах при использовании систем, связанных с аденовирусом (Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-7, 1994; Cotten et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(13):6094-6098, 1992; Curiel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64, 1994).

[0069] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор. AAV является привлекательной векторной системой, так как имеет низкую частоту интеграции и может инфицировать неделящиеся клетки, что делает его полезным для доставки полинуклеотидов в клетки млекопитающих, например, в культуре тканей (Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158:97-129, 1992) или *in vivo*. Подробности, касающиеся создания и применения rAAV векторов, описаны в патентах США №№ 5139941 и 4797368, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0070] AAV представляет собой дефектный по репликации парвовирус, одноцепочечный ДНК-геном которого имеет длину примерно 4,7 т.п.н., включая два 145-нуклеотидных инвертированных концевых повтора (ITR). Существует несколько серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV известны. Например, полный геном AAV-1 представлен в GenBank под регистрационным номером NC_002077; полный геном AAV-2 представлен в GenBank под регистрационным номером NC_001401 и в публикации Srivastava et al., *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983); полный геном AAV-3 представлен в GenBank под регистрационным номером NC_1829; полный геном

AAV-4 представлен в GenBank под регистрационным номером NC_001829; геном AAV-5 предоставлен в GenBank под регистрационным номером AF085716; полный геном AAV-6 представлен в GenBank под регистрационным номером NC_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 представлены в GenBank под регистрационными номерами AX753246 и AX753249, соответственно; геном AAV-9 приведен в Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 приведен в *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 приведен в *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). Последовательность генома AAV rh.74 приведена в патенте США 9434928, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Действующие в цис-положении последовательности, направляющие репликацию вирусной ДНК (rep), инкапсуляцию/упаковку и интеграцию в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ITR AAV. Три промотора AAV (названные p5, p19 и p40 на основании их относительного расположения на карте) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены rep и cap. Два промотора rep (p5 и p19) в сочетании с дифференциальным сплайсингом одного интрона AAV (в нуклеотидах 2107 и 2227) приводят к продуцированию четырех белков rep (rep 78, rep 68, rep 52 и rep 40) с гена rep. Белки Rep обладают множеством ферментативных свойств, которые в конечном итоге ответственны за репликацию вирусного генома. Ген cap экспрессируется с промотора p40 и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты начала трансляции ответственны за продуцирование трех родственных капсидных белков. Единственный консенсусный сайт полиаденилирования расположен в положении 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV описаны в публикации Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

[0071] AAV обладает уникальными свойствами, которые делают его привлекательным в качестве вектора для доставки чужеродной ДНК в клетки, например, в генной терапии. Инфицирование AAV клеток в культуре не является цитопатическим, а естественное инфицирование людей и других животных протекает бессимптомно. Кроме того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что позволяет нацеливать его на множество различных тканей *in vivo*. Кроме того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и неделящиеся клетки, и часто сохраняется практически в течение всего времени жизни этих клеток в виде транскрипционно-активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Особое значение для настоящего изобретения имеет то, что AAV и, в частности, AAV9 способны инфицировать клетки сердца, например, миокарда, эпикарда или и те, и другие (Prasad et al, 2011; Piras et al, 2016; Ambrosi et al., 2019). Провирусный геном AAV вставляют в виде клонированной ДНК в плазмиды, что делает возможным конструирование рекомбинантных геномов. Кроме того, поскольку сигналы, направляющие репликацию AAV и инкапсуляцию генома, содержатся в пределах ITR генома AAV, в некоторых случаях некоторые, или все, из внутренних примерно 4,3 т.п.н. генома (кодирующих репликационные и структурные капсидные белки, rep-cap) заменяют чужеродной ДНК. В некоторых случаях для создания векторов AAV белки rep и cap

предоставляют в транс-положении. Другая важная особенность AAV заключается в том, что он является чрезвычайно стабильным и активным вирусом. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (56-65°C в течение нескольких часов), что делает хранение AAV менее сложным. В некоторых случаях AAV даже подвергают лиофилизации. Наконец, инфицированные AAV клетки не устойчивы к суперинфекции. Векторы AAV по настоящему изобретению включают самокомплементарные, дуплексные векторы AAV, синтетические ITR и/или векторы AAV с повышенной компактностью упаковки. Иллюстративные способы описаны в US 8784799; US 8999678; US 9169494; US 9447433 и US 9783824, все из которых включены посредством ссылки в полном объеме.

[0072] Предполагается, что ДНК AAV в геномах rAAV происходит из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая, но не ограничиваясь ими, серотипы AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh74. Получение псевдотипированного rAAV описано, например, в WO 01/83692. Предусмотрены также и другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с капсидными мутациями. Смотри, например, Marsic et al., *Mol. Therapy*. 22:1900-09 (2014). Нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны в данной области. Векторы AAV по настоящему изобретению включают векторы AAV серотипов AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV39, AAV43, AAV.rh74 и AAV.rh8. Иллюстративные векторы AAV описаны в US 63/012703; US 7105345; US 15/782,980; US 7259151; US 6962815; US 7718424; US 6984517; US 7718424; US 6156303; US 8524446; US 7790449; US 7906111; US 9737618; патентной заявке США 15/433322; US 7198951, все из которых включены посредством ссылки в полном объеме.

[0073] В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор AAV псевдотипирован для улучшения нацеливания. Для стимулирования переноса генов и поддержания экспрессии в кардиомиоцитах предполагается использование AAV6, AAV8 и AAV9. В некоторых случаях геном AAV2 упаковывают в капсид, получая псевдотипированные векторы AAV2/5, AAV2/7 и AAV2/8, соответственно, как описано в публикации Balaji et al. *J Surg Res*. 184:691-98 (2013). В некоторых вариантах осуществления AAV9 используют для направленной экспрессии в миофибробласт-подобных линиях клеток, как описано в публикации Piras et al. *Gene Therapy* 23:469-478 (2016). В некоторых вариантах осуществления используют AAV1, AAV6 или AAV9, и в некоторых вариантах осуществления AAV сконструирован, как описано в публикациях Asokari et al. *Hum Gene Ther*. 24:906-13 (2013); Pozsgai et al. *Mol Ther*. 25:855-69 (2017); Kotterman et al. *Nature Reviews Genetics* 15:445-51 (2014); и патенте US20160340393A1, выданном Schaffer с соавторами. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой AAV, сконструированный для повышения способности к инфицированию клеток-мишеней, как описано в US 20180066285A1.

[0074] В некоторых вариантах осуществления векторы AAV по настоящему

изобретению содержат модифицированный капсид, в частности, капсид, сконструированный для усиления или стимулирования трансдукции *in vivo* или *ex vivo* клеток сердца или, более конкретно, кардиомиоцитов; или для ускользания от иммунной системы субъекта; или для улучшения биораспределения. Иллюстративные капсиды AAV описаны в US 7867484; US 9233131; US 10046016; WO 2016/133917; WO 2018/222503 и WO 20019/060454, все из которых включены посредством ссылки в полном объеме. В капсиде AAV (или, в частности, в капсиде AAV9) предусмотрены одна или более замен для повышения способности инфицировать клетки в миокарде, эпикарде или в обоих. Более конкретно, в некоторых вариантах осуществления векторы AAV по настоящему изобретению, необязательно, векторы на основе AAV9, содержат в своих капсидных белках одну или более замен. В некоторых вариантах осуществления векторы AAV по настоящему изобретению имеют капсид и/или серотип AAV-A9. Следует понимать, что эти замены и вставки предполагается объединять вместе для получения различных капсидных белков, полезных по настоящему изобретению.

Способы получения вирусных векторов

[0075] Как правило, вирусный вектор получают путем введения конструкции вирусной ДНК или РНК в клетку-продуцент. В некоторых случаях клетка-продуцент не экспрессирует экзогенные гены. В других случаях клетка-продуцент представляет собой «упаковывающую клетку», содержащую один или более экзогенных генов, например, гены, кодирующие один или более полипептидов *gag*, *pol* или *env* и/или один или более ретровирусных полипептидов *gag*, *pol* или *env*. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клетка для ретровируса содержит ген, кодирующий вирусный полипептид, например, VSV-g, который способствует проникновению в клетки-мишени. В некоторых случаях упаковывающая клетка содержит гены, кодирующие один или более лентивирусных белков, например, *gag*, *pol*, *env*, *vpr*, *vri*, *vpx*, *vif*, *tat*, *rev* или *nef*. В некоторых случаях упаковывающая клетка содержит гены, кодирующие аденовирусные белки, такие как E1-A или E1-B, или другие аденовирусные белки. Например, в некоторых случаях белки, поставляемые упаковывающими клетками, представляют собой белки ретровирусного происхождения, такие как *gag*, *pol* и *env*; белки лентивирусного происхождения, такие как *gag*, *pol*, *env*, *vpr*, *vri*, *vpx*, *vif*, *tat*, *rev* и *nef*; и белки аденовирусного происхождения, такие как E1 A и E1 B. Во многих примерах упаковывающие клетки поставляют белки из вируса, который отличается от вируса, из которого получен вирусный вектор. Способы получения рекомбинантных вирусов из упаковывающих клеток, и их применение, хорошо известны; смотри, например, патенты США №№ 5834256; 6910434; 5591624; 5817491; 7070994 и 6995009.

[0076] Линии упаковывающих клеток включают, но без ограничения, любую линию легко трансфицируемых клеток. Линии упаковывающих клеток часто основаны на линиях клеток 293T, NIH3T3, COS или HeLa. Упаковывающие клетки часто используют для упаковки вирусных векторных плазмид, дефицитных по меньшей мере по одному гену, кодирующему белок, необходимый для упаковки вируса. Любые клетки, которые

снабжают белком или полипептидом, отсутствующим среди белков, кодируемых такими вирусными векторами или плазмидами, предусмотрены для использования в качестве упаковывающих клеток. Примеры линий упаковывающих клеток включают, но не ограничиваются ими: Platinum-E (Plat-E), Platinum-A (Plat-A), BOSC 23 (ATCC CRL 11554) и Bing (ATCC CRL 11270). Morita et al. (2000) *Gene Therapy* 7(12): 1063-1066; Onishi et al. (1996) *Experimental Hematology*, 24:324-329; патент США № 6995009. Коммерческие линии упаковывающих клеток также полезны, например, линия клеток Ampho-Pak 293, линия клеток Eco-Pak 2-293, линия клеток RetroPack PT67 и универсальная упаковочная система Retro-X (все доступны от компании Clontech).

[0077] Вирусные векторные плазмиды (или конструкции) включают: рMXs, рMXs-IB, рMXs-puro, рMXs-neo (рMXs-IB представляет собой вектор, несущий ген устойчивости к бластицидину вместо гена устойчивости к пурамицину в рMXs-puro) Kimatura et al. (2003) *Experimental Hematology* 31: 1007-1014; MFG Riviere et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:6733-6737; pBabePuro; Morgenstern et al. (1990) *Nucleic Acids Research* 18:3587-3596; LL-CG, CL-CG, CS-CG, CLG Miyoshi et al. (1998) *J. Vir.* 72:8150-8157, и тому подобное, в качестве ретровирусной системы, а также рAdex1, Kanegae et al. (1995) *Nucleic Acids Research* 23:3816-3821, и тому подобное, в качестве аденовирусной системы. В иллюстративных вариантах осуществления ретровирусная конструкция содержит ген устойчивости к бластицидину (например, рMXs-IB), пурамицину (например, рMXs-puro, pBabePuro) или неомицину (например, рMXs-neo). Morgenstern et al. (1990) *Nucleic Acids Research* 18:3587-3596

Промоторы и энхансеры

[0078] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая РКР2, функционально связана с промотором и/или энхансером для облегчения экспрессии РКР2. В зависимости от используемой системы хозяин/вектор любые из ряда подходящих элементов контроля транскрипции и трансляции, включая конститутивные, тканеспецифические и индуцируемые промоторы, энхансеры транскрипции, терминаторы транскрипции и так далее, подходят для использования в экспрессионном векторе (например, Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153:516-544).

[0079] Неограничивающие примеры подходящих эукариотических промоторов (промоторов, функционирующих в эукариотической клетке) включают промотор CMV, немедленный ранний промотор CMV, промотор тимидинкиназы HSV, ранний и поздний промотор SV40, поздний промотор длинных концевых повторов (LTR) из ретровируса и мышинный поздний промотор металлотioneина I. В некоторых вариантах осуществления будут использованы промоторы, которые способны обеспечивать специфическую для сердца экспрессию, включая, но не ограничиваясь ими, промоторы, которые обеспечивают экспрессию в миокарде, эпикарде или в обоих (Prasad et al., 2011). Неограничивающие примеры подходящих специфических для сердца промоторов включают промоторы тяжелой цепи альфа миозина (α -MHC), легкой цепи миозина 2 (MLC-2), сердечного тропонина Т (сTnT) и сердечного тропонина С (сTnC). В некоторых

вариантах осуществления используют промотор РКР2 или десмина. В некоторых случаях используют химерный промотор со специфической для сердца экспрессией. В некоторых случаях с промотором объединяют специфический для сердца энхансер.

[0080] Примеры подходящих промоторов для управления экспрессией РКР2 включают, но не ограничиваются ими, элементы ретровирусных длинных концевых повторов (LTR); конститутивные промоторы, такие как промоторы CMV, HSV1-ТК, SV40, EF-1a, β -актина, фосфоглицеролкиназы (PGK); индуцируемые промоторы, такие как те, которые содержат элементы Tet-оператора; а также специфические для сердца промоторы, такие как промоторы тяжелой цепи альфа миозина (α -MHC), легкой цепи 2 миозина (MLC-2), сердечного тропонина Т (сTnT) и сердечного тропонина С (сTnC). В некоторых вариантах осуществления используют промотор РКР2 или десмина. В некоторых вариантах осуществления используют химерный промотор со специфической для сердца экспрессией. В некоторых случаях с промотором объединяют специфический для сердца энхансер.

[0081] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид функционально связан с элементом регуляции транскрипции (TRE), специфическим для типа клеток, где TRE включают промоторы и энхансеры. Подходящие TRE включают, но не ограничиваются ими, TRE из следующих генов: легкой цепи миозина 2, тяжелой цепи α миозина, AE3, сердечного тропонина С и сердечного актина. Franz et al. (1997) *Cardiovasc. Res.* 35:560-566; Robbins et al. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 752:492-505; Linn et al. (1995) *Circ. Res.* 76:584-591; Parmacek et al. (1994) *Cell. Biol.* 14: 1870-1885; Hunter et al. (1993) *Hypertension* 22:608-617; и Sartorelli et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4047-4051.

[0082] Альтернативно, определенные преимущества можно получить, помещая сегмент кодирующей нуклеиновой кислоты под контроль рекомбинантного или гетерологичного промотора, который представляет собой промотор, обычно не связанный с нуклеиновой кислотой в ее естественном окружении. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также представляет собой энхансер, обычно не связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Такие промоторы или энхансеры часто включают промоторы или энхансеры других генов, а также промоторы или энхансеры, выделенные из любой другой прокариотической, вирусной или эукариотической клетки, и промоторы или энхансеры, «не встречающиеся в природе», то есть, содержащие различные элементы различных областей регуляции транскрипции и/или мутации, которые изменяют экспрессию. Помимо получения нуклеотидных последовательностей промоторов и энхансеров синтетическим путем последовательности иногда получают с использованием технологий рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦР, в связи с композициями, раскрытыми в настоящем документе (смотри патент США № 4683202, патент США № 5928906, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки).

[0083] В некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему

изобретению включают один или более сигналов полиА. Иллюстративные сигналы полиА, полезные в векторах по настоящему изобретению, включают короткий сигнал полиА и сигнал полиА bGH. В некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению включают один или более 3'-элементов. Иллюстративные 3'-элементы включают посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE).

Композиции векторов для генной терапии

[0084] Для получения композиции создают векторы и/или клетки, и векторы или клетки очищают по мере необходимости или желательности. Векторы и/или другие средства иногда суспендируют в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления композиция является лиофилизированной. Эти соединения и клетки часто доводят до соответствующей концентрации и, необязательно, комбинируют с другими средствами. Абсолютная масса конкретного соединения и/или другого средства, включенного в стандартную дозу, варьируется в широких пределах. Предполагается, что дозу и количество введений будут оптимизировать специалисты в данной области.

[0085] В некоторых вариантах осуществления вводят, например, примерно 10^2 - 10^{10} векторных геномов (вг). В некоторых вариантах осуществления доза составляет по меньшей мере примерно 10^2 вг, примерно 10^3 вг, примерно 10^4 вг, примерно 10^5 вг, примерно 10^6 вг, примерно 10^7 вг, примерно 10^8 вг, примерно 10^9 вг, примерно 10^{10} вг или более векторных геномов. В некоторых вариантах осуществления доза составляет примерно 10^2 вг, примерно 10^3 вг, примерно 10^4 вг, примерно 10^5 вг, примерно 10^6 вг, примерно 10^7 вг, примерно 10^8 вг, примерно 10^9 вг, примерно 10^{10} вг или более векторных геномов.

[0086] Суточные дозы соединений также могут варьироваться. Такие суточные дозы часто находятся в диапазоне, например, по меньшей мере примерно 10^2 вг/сутки, примерно 10^3 вг/сутки, примерно 10^4 вг/сутки, примерно 10^5 вг/сутки, примерно 10^6 вг/сутки, примерно 10^7 вг/сутки, примерно 10^8 вг/сутки, примерно 10^9 вг/сутки, примерно 10^{10} вг/сутки или более векторных геномов в сутки.

[0087] В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению включает введение вектора или векторной системы по изобретению (например, вектора rAAV) путем интракардиальной инъекции, внутримиекардиальной инъекции, эндокардиальной инъекции, интракардиальной катетеризации или системного введения. В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, человека) лечат путем введения от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{15} ГК вектора (например, вектора AAV или лентивирусного вектора) путем интракардиальной инъекции, внутримиекардиальной инъекции, эндокардиальной инъекции, интракардиальной катетеризации или системного введения. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат путем введения от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{15} ГК, от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{15} ГК, от примерно 1×10^9 до примерно 1×10^{14} ГК, от примерно 1×10^{10} до примерно 1×10^{13} ГК, от

примерно 1×10^{11} до примерно 1×10^{12} ГК или от примерно 1×10^{12} до примерно 1×10^{13} ГК вектора. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат путем введения от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{10} ГК, от примерно 1×10^9 до примерно 1×10^{11} ГК, от примерно 1×10^{10} до примерно 1×10^{12} ГК, от примерно 1×10^{11} до примерно 1×10^{13} ГК, от примерно 1×10^{12} до примерно 1×10^{14} ГК или от примерно 1×10^{13} до примерно 1×10^{15} ГК вектора. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат путем введения по меньшей мере 1×10^8 , по меньшей мере примерно 1×10^9 , по меньшей мере примерно 1×10^{10} , по меньшей мере примерно 1×10^{11} , по меньшей мере примерно 1×10^{12} , по меньшей мере примерно 1×10^{13} или по меньшей мере примерно 1×10^{15} ГК вектора. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат путем введения не более 1×10^8 , не более примерно 1×10^9 , не более примерно 1×10^{10} , не более примерно 1×10^{11} , не более примерно 1×10^{12} , не более примерно 1×10^{13} или не более примерно 1×10^{15} ГК вектора. В некоторых вариантах осуществления субъекта (например, человека) лечат путем введения от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{15} ГК/кг вектора (например, вектора AAV или лентивирусного вектора) путем интракардиальной инъекции или системного введения. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат путем введения от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{15} ГК/кг, от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{15} ГК/кг, от примерно 1×10^9 до примерно 1×10^{14} ГК/кг, от примерно 1×10^{10} до примерно 1×10^{13} ГК/кг, от примерно 1×10^{11} до примерно 1×10^{12} ГК/кг или от примерно 1×10^{12} до примерно 1×10^{13} ГК/кг вектора. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат путем введения от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{10} ГК/кг, от примерно 1×10^9 до примерно 1×10^{11} ГК/кг, от примерно 1×10^{10} до примерно 1×10^{12} ГК/кг, от примерно 1×10^{11} до примерно 1×10^{13} ГК/кг, от примерно 1×10^{12} до примерно 1×10^{14} ГК/кг или от примерно 1×10^{13} до примерно 1×10^{15} ГК/кг вектора. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат путем введения по меньшей мере 1×10^8 , по меньшей мере примерно 1×10^9 , по меньшей мере примерно 1×10^{10} , по меньшей мере примерно 1×10^{11} , по меньшей мере примерно 1×10^{12} , по меньшей мере примерно 1×10^{13} или по меньшей мере примерно 1×10^{15} ГК/кг вектора. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат путем введения не более 1×10^8 , не более примерно 1×10^9 , не более примерно 1×10^{10} , не более примерно 1×10^{11} , не более примерно 1×10^{12} , не более примерно 1×10^{13} или не более примерно 1×10^{15} ГК/кг вектора. Следует понимать, что количество векторов для использования в лечении будет варьироваться не только в зависимости от конкретного выбранного носителя, но также и от пути введения, природы состояния, подвергаемого лечению, а также возраста и состояния здоровья пациента. В конечном счете, в некоторых вариантах осуществления лечащий врач будет определять правильную дозировку. Предполагается, что фармацевтическая композиция будет сформулирована с надлежащей пропорциональной долей каждого соединения в стандартной лекарственной форме для введения.

[0088] Композиции иногда формулируют для замедленного высвобождения (например, с использованием микроинкапсулирования, смотри WO 94/07529 и/или патент США № 4962091). Препараты, когда это целесообразно, обычно предоставляют в виде

дискретных стандартных лекарственных форм и, в некоторых вариантах осуществления, их получают любым из способов, хорошо известных в области фармацевтики. Такие способы часто включают этап смешивания терапевтического средства с жидкими носителями, твердыми матрицами, полутвердыми носителями, мелкоизмельченными твердыми носителями или их сочетаниями, с последующим, при необходимости, введением или заключением продукта в желаемую систему доставки.

[0089] В некоторых вариантах осуществления одну или более подходящих стандартных лекарственных форм, содержащих соединения, вводят различными путями, включая парентеральный (в том числе подкожный, внутривенный, внутримышечный и внутрибрюшинный), интракардиальный, перикардиальный, пероральный, ректальный, кожный, чрескожный, внутригрудной, внутрилегочный и интраназальный (респираторный) пути введения.

[0090] Предложенные в настоящем документе векторы для генной терапии изготавливают в различных формах, которые включают водные растворы, суспензии, таблетки, твердые или мягкие желатиновые капсулы, а также липосомы и другие препараты с замедленным высвобождением, такие как сформированные полимерные гели. Введение векторов для генной терапии часто включает парентеральное или местное введение в водном растворе. Аналогично, композиции, содержащие векторы для генной терапии, иногда вводят в устройстве, каркасе или в виде препарата с замедленным высвобождением. Различные типы процедур формулирования препаратов описаны в патенте США № 6306434 и в ссылках, содержащихся в нем.

[0091] В некоторых вариантах осуществления векторы формулируют для парентерального введения (например, путем инъекции, например, болюсной инъекции или непрерывной инфузии) и часто предоставляют в стандартной лекарственной форме в ампулах, предварительно заполненных шприцах, инфузионных контейнерах небольшого объема или многодозовых контейнерах с добавленным консервантом. Фармацевтические композиции часто имеют форму суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных растворителях, и иногда содержат вспомогательные средства, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Подходящие носители включают солевой раствор, фосфатно-солевой буфер и другие материалы, обычно используемые в данной области.

[0092] Иногда композиции также содержат другие ингредиенты, например, средства, полезные для лечения сердечных заболеваний, состояний и травм, такие как, например, антикоагулянт (например, далтепарин (фрагмин), данапароид (оргаран), эноксапарин (ловенокс), гепарин, тинзапарин (инногеп) и/или варфарин (кумадин)), антитромбоцитарное средство (например, аспирин, тиклопидин, клопидогрел или дипиридамо́л), ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (например, беназеприл (лотензин), каптоприл (капотен), эналаприл (вазотек), фозиноприл (моноприл), лизиноприл (принивил, зестрил), моэксиприл (униваск), периндоприл (ацеон), квинаприл (аккуприл), рамиприл (алтаце) и/или трандолаприл (мавик)), блокаторы рецепторов

ангиотензина II (например, кандесартан (атаканд), эпросартан (теветен), ирбесартан (авапро), лозартан (козаар), телмисартан (микардис) и/или валсартан (диован)), бета-блокатор (например, ацебутолол (сектрал), атенолол (тенормин), бетаксоллол (керлон), бисопролол/гидрохлоротиазид (зиак), бисопролол (зебета), картеолол (картрол), метопролол (лопрессор, топрол XL), надолол (коргард), пропранолол (индерал), соталола (бетапейс) и/или тимолол (блокадрен)), блокаторы кальциевых каналов (например, амлодипин (норваск, лотрел), бепридил (васкор), дилтиазем (кардизем, тиазак), фелодипин (плендил), нифедипин (адалат, прокардия), нимодипин (нимотоп), нисолдипин (сулар), верапамил (калан, изоптин, верелан), диуретики (например, амилорид (мидамор), буметанид (бумекс), хлоротиазид (диурил), хлорталидон (гигротон), фуросемид (лазикс), гидрохлоротиазид (эзидрикс, гидродиурил), индапамид (лозол) и/или спиронолактон (альдактон)), сосудорасширяющие средства (например, изосорбида динитрат (изордил), несиригид (натрекор), гидралазин (апрезолин), нитраты и/или миноксидил), статины, никотиновая кислота, гемфиброзил, клофибрат, дигоксин, дигитоксин, ланоксин или любое их сочетание.

[0093] Иногда включают дополнительные средства, такие как антибактериальные средства, противомикробные средства, противовирусные средства, модификаторы биологического ответа, факторы роста, иммуномодуляторы, моноклональные антитела и/или консерванты. Композиции, предложенные в настоящем документе, также предполагается использовать в сочетании с другими формами терапии.

[0094] Вирусные векторы, описанные в настоящем документе, подходят для введения субъекту с целью лечения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления такую композицию вводят в виде однократной дозы, в виде нескольких доз, непрерывным или прерывистым образом в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, от того, является ли целью введения реакция на травматическое повреждение или более устойчивые терапевтические цели, и от других факторов, известных практикующим специалистам. В некоторых вариантах осуществления введение соединений и композиций, предложенных в настоящем документе, выполняют непрерывно в течение предварительно выбранного периода времени или, альтернативно, вводят серией разнесенных во времени доз. Предусмотрено как местное, так и системное введение. В некоторых вариантах осуществления выполняют локальную доставку вирусного или невирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления локальную доставку клеток и/или векторов используют для создания популяции клеток в сердце. В некоторых вариантах осуществления такая локализованная популяция действует как «клетки кардиостимулятора» для сердца.

Определения

[0095] Используемый в настоящем документе термин «кардиомиопатия» относится к любому заболеванию или дисфункции миокарда (сердечной мышцы), при котором сердце аномально увеличено, утолщено и/или уплотнено. В результате способность сердечной мышцы перекачивать кровь обычно ослабевает. Этиология заболевания или

нарушения в некоторых случаях бывает воспалительной, метаболической, токсической, инфильтративной, фибропластической, гематологической, генетической или неизвестной. Различают два основных типа кардиомиопатий: ишемические (возникающие в результате недостатка кислорода) и не ишемические. В некоторых случаях кардиомиопатия представляет собой аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (АКМПЖ) или аритмогенную кардиомиопатию (АКМ).

[0096] «Сердечная недостаточность (СН)» представляет собой сложный клинический синдром, который часто возникает в результате любого структурного или функционального сердечно-сосудистого заболевания, вызывающего системную перфузию, неадекватную для удовлетворения метаболических потребностей организма без чрезмерного увеличения давления наполнения левого желудочка. Она характеризуется специфическими симптомами, такими как одышка и утомляемость, и такими признаками, как задержка жидкости. Используемые в настоящем документе термины «хроническая сердечная недостаточность», «застойная сердечная недостаточность» или «ЗСН» взаимозаменяемо относятся к текущим или стойким формам сердечной недостаточности. Общие факторы риска для сердечной недостаточности включают пожилой возраст, диабет, высокое кровяное давление и избыточную массу тела. ЗСН ориентировочно классифицируют в соответствии с систолической функцией левого желудочка как СН с пониженной или сохраненной фракцией выброса (СНнФВ и СНсФВ). Термин «сердечная недостаточность» означает не то, что сердце остановилось или полностью отказывает, а то, что оно слабее, чем обычно у здорового человека. В некоторых случаях состояние является легким, вызывая симптомы, заметные при физической нагрузке, в других случаях состояние является более тяжелым, вызывая симптомы, которые иногда опасны для жизни, даже в состоянии покоя. Наиболее распространенные симптомы хронической сердечной недостаточности включают одышку, усталость, отек ног и лодыжек, боль в груди и кашель. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению приводят к уменьшению, предотвращению или ослаблению одного или более симптомов ЗСН (например, СНнФВ) у субъекта, страдающего или подверженного риску ЗСН (например, СНнФВ). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения ЗСН и состояний, которые иногда приводят к ЗСН.

[0097] Используемые в настоящем документе термины «острая сердечная недостаточность» или «декомпенсированная сердечная недостаточность» взаимозаменяемо относятся к синдрому усугубления признаков и симптомов, отражающих неспособность сердца перекачивать кровь со скоростью, соответствующей потребностям организма при нормальном давлении наполнения. ОСН обычно развивается постепенно в течение нескольких дней или недель, а затем происходит декомпенсация, требующая срочной или неотложной терапии вследствие тяжести этих признаков или симптомов. В некоторых случаях ОСН является результатом первичного нарушения систолической или диастолической функции сердца или аномального венозного или артериального сужения сосудов, но обычно является следствием взаимодействия

множества факторов, включая перегрузку объема. У большинства пациентов с ОСН имеется декомпенсация хронической сердечной недостаточности (ХСН) и, следовательно, большая часть описания патофизиологии, клинических проявлений и диагностики ХСН имеет прямое отношение к пониманию ОСН. В других случаях ОСН возникает в результате инсульта сердца или события, нарушающего функцию сердца, такого как острый инфаркт миокарда, тяжелая гипертензия, повреждение сердечного клапана, нарушение сердечного ритма, воспаление или инфекция сердца, токсины и лекарственные препараты. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению приводят к уменьшению, предотвращению или ослаблению одного или более симптомов ОСН у субъекта, страдающего от ОСН или подверженного риску ее развития. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения ОСН и состояний, которые иногда приводят к ОСН. В ряде случаев ОСН является следствием ишемии, связанной с инфарктом миокарда.

[0098] Используемые в настоящем документе термины «субъект» или «индивидуум» относятся к любому животному, такому как домашнее животное, животное из зоопарка или человек. В некоторых случаях «субъект» или «индивидуум» представляет собой млекопитающее, такое как собака, кошка, лошадь, домашний скот, животное из зоопарка или человек. Альтернативно, или дополнительно, субъект или индивидуум представляет собой домашнее животное, такое как птица, домашний любимец или сельскохозяйственное животное. Конкретные примеры «субъектов» и «индивидуумов» включают, но не ограничиваются ими, индивидуумов с сердечным заболеванием или нарушением, а также индивидуумов с характеристиками или симптомами, связанными с сердечным заболеванием, такими как аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКМПЖ) или аритмогенная кардиомиопатия (АКМ).

[0099] При осуществлении на практике настоящего изобретения будут использованы, если не указано иное, обычные методы культивирования тканей, иммунологии, молекулярной биологии, клеточной биологии и рекомбинантных ДНК, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. См. например, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е издание; серию Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; серию *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5-е издание; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; патент США № 4683195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; IRL Press (1986) *Immobilized Cells and Enzymes*; Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical*

Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3-е издание (2002) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sohail (2004) Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application (CRC Press); Sell (2013) Stem Cells Handbook.

[00100] Если из контекста не следует иное, предполагается, что различные признаки изобретения, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в любом сочетании. Кроме того, по изобретению также предполагается, что в некоторых вариантах осуществления любой признак или сочетание признаков, изложенные в настоящем документе, могут быть исключены или опущены. Для иллюстрации, если в описании указано, что комплекс содержит компоненты А, В и С, конкретно подразумевается, что все из компонентов А, В или С, или их сочетание, могут быть опущены и исключены из описания отдельно или в любом сочетании.

[00101] Все числовые обозначения, например, рН, температура, время, концентрация и молекулярная масса, включая диапазоны значений, являются приблизительными значениями, которые варьируются (+) или (-) с шагом 1,0 или 0,1 в зависимости от обстоятельств, или альтернативно с изменением +/-15%, или альтернативно 10%, или альтернативно 5%, или альтернативно 2%. Следует понимать, хотя это не всегда прямо указано, что всем числовым обозначениям предшествует термин «примерно». Следует понимать, что такой формат диапазона использован для удобства и краткости, и его следует понимать гибко, с включением числовых значений, явно указанных в качестве пределов диапазона, но также и с включением всех отдельных числовых значений или поддиапазонов, входящих в этот диапазон, как если бы каждое числовое значение и поддиапазон были указаны явно. Например, соотношение в диапазоне от примерно 1 до примерно 200 следует понимать как включающее явно указанные пределы от примерно 1 до примерно 200, а также включающее отдельные соотношения, такие как примерно 2, примерно 3 и примерно 4, и поддиапазоны, такие как от примерно 10 до примерно 50, от примерно 20 до примерно 100, и так далее. Также следует понимать, хотя это не всегда прямо указано, что реагенты, описанные в настоящем документе, являются лишь иллюстративными и что их эквиваленты известны в данной области.

[00102] Следует отметить, что при использовании в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения термины в единственном числе также включают соответствующие термины во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на «кардиомиоцит» также подразумевает множество кардиомиоцитов.

[00103] Также в настоящем документе «и/или» относится к любым и всем возможным сочетаниям одного или более связанных перечисленных элементов, а также к отсутствию сочетаний при альтернативной интерпретации («или»).

[00104] Используемый в настоящем документе термин «введение», «вводить», и

тому подобные, применительно к вектору для генной терапии или его композиции, предложенным в настоящем документе, относится как к прямому введению, которое в некоторых случаях включает введение в не кардиомиоциты *in vitro*, введение в не кардиомиоциты *in vivo*, введение субъекту медицинским работником или самостоятельному введению субъектом, так и/или к непрямому введению, которое в некоторых случаях представляет собой акт назначения композиции, содержащей вектор для генной терапии, предложенный в настоящем документе. При использовании в настоящем документе применительно к клетке термин означает введение композиции в клетку. Как правило, вводят эффективное количество, которое часто определяет специалист в данной области. Предполагается использование любого подходящего способа введения. В некоторых случаях вектор для генной терапии вводят в клетки, например, путем добавления вектора для генной терапии в среду для культивирования клеток или инъекции *in vivo* в зону повреждения сердца. В некоторых случаях введение субъекту осуществляют, например, внутрисосудистой инъекцией, внутримиекардиальной доставкой и тому подобным.

[00105] Используемый в настоящем документе термин «сердечная клетка» относится к любой клетке, присутствующей в сердце, которая обеспечивает сердечную функцию, такую как сокращение сердца или кровоснабжение, или иным образом служит для поддержания структуры сердца. Сердечные клетки, используемые по настоящему изобретению, включают клетки, которые существуют в эпикарде, миокарде или эндокарде сердца. Сердечные клетки также включают, например, клетки сердечной мышцы или кардиомиоциты и клетки сердечной сосудистой сети, такие как клетки коронарной артерии или вены. Другие неограничивающие примеры сердечных клеток включают эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты, сердечные стволовые клетки или клетки-предшественники, сердечные проводящие клетки и сердечные клетки водителя ритма, которые составляют поддерживающую структуру сердечной мышцы, кровеносных сосудов и сердечных клеток. В некоторых случаях сердечные клетки происходят из стволовых клеток, включая, например, эмбриональные стволовые клетки или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[00106] Используемый в настоящем документе термин «кардиомиоцит», или «кардиомиоциты», относится к клеткам поперечнополосатой мускулатуры, содержащим саркомеры, естественным образом присутствующим в сердце млекопитающих, в отличие от клеток скелетных мышц. Кардиомиоциты характеризуются экспрессией специализированных молекул, например белков, таких как тяжелая цепь миозина, легкая цепь миозина, сердечный α -актинин. Используемый в настоящем документе термин «кардиомиоцит» представляет собой обобщающий термин, охватывающий любую субпопуляцию кардиомиоцитов или подтип кардиомиоцитов, например предсердные, желудочковые кардиомиоциты и кардиомиоциты водителя ритма.

[00107] Термин «культивирование» или «культивирование клеток» относится к поддержанию клеток в искусственной среде *in vitro*. В настоящем документе термин

«система культивирования клеток» используют для обозначения условий культивирования, в которых популяцию клеток выращивают в виде монослоев или в суспензии. В настоящем документе термин «культуральная среда» используют для обозначения питательного раствора для культивирования, роста или пролиферации клеток. Культуральная среда в некоторых случаях характеризуется функциональными свойствами, такими как, но без ограничения, способность поддерживать клетки в определенном состоянии (например, в плюрипотентном состоянии, в состоянии покоя и так далее) или способствовать созреванию клеток, например, в некоторых вариантах осуществления, стимулировать дифференциацию клеток-предшественников в клетки определенной линии (например, кардиомиоциты).

[00108] Используемый в настоящем документе термин «экспрессия», или «экспрессировать», относится к процессу, с помощью которого нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды транскрибируются в мРНК, и/или к процессу, с помощью которого транскрибируемая мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Если полинуклеотид или нуклеиновая кислота происходят из геномной ДНК, в некоторых случаях экспрессия включает сплайсинг мРНК в эукариотической клетке. В некоторых случаях уровень экспрессии гена определяют путем измерения количества мРНК или белка в образце клетки или ткани.

[00109] Используемый в настоящем документе термин «экспрессионная кассета» означает полинуклеотид ДНК, содержащий один или более полинуклеотидов или нуклеиновых кислот, кодирующих белок (белки) или нуклеиновую кислоту (нуклеиновые кислоты), который сконфигурирован для экспрессии полинуклеотида в клетке-хозяине. Как правило, экспрессия полинуклеотида(ов) находится под контролем определенных регуляторных элементов, включая конститутивные или индуцируемые промоторы, специфические для тканей регуляторные элементы и энхансеры. О таких полинуклеотидах говорят, что они «функционально связаны с» регуляторными элементами (например, промотором).

[00110] В настоящем документе выражение «фармацевтически приемлемый» используют для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

[00111] Используемые в настоящем документе термины «лечение», «терапия» и «лечить» относятся к воздействию на заболевание, нарушение или состояние с помощью средства для уменьшения или ослабления вредных или любых других нежелательных эффектов заболевания, нарушения, состояния и/или его симптомов.

[00112] Используемый в настоящем документе термин «эффективное количество», и тому подобное, относится к количеству, которое является достаточным для достижения желаемого физиологического результата (например, лечения заболевания). Эффективное

количество иногда вводят одним или более введениями, применениями или дозами. Такая доставка зависит от ряда факторов, включая период времени, в течение которого следует использовать индивидуальную стандартную дозу, биодоступность композиции, путь введения и так далее. Однако понятно, что конкретные количества композиций (например, векторов для генной терапии) для любого конкретного субъекта зависят от множества факторов, включая активность конкретного используемого средства, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету субъекта, время введения, скорость выведения, сочетание композиций, тяжесть конкретного заболевания, подвергаемого лечению, и форму введения.

[00113] Используемый в настоящем документе термин «их эквиваленты» применительно к последовательностям полипептида или нуклеиновой кислоты относится к полипептиду или нуклеиновой кислоте, которые отличаются от последовательности эталонного полипептида или нуклеиновой кислоты, но сохраняют основные свойства (например, биологическую активность). Типичный вариант полинуклеотида отличается по нуклеотидной последовательности от другого, эталонного полинуклеотида. Изменения в нуклеотидной последовательности варианта в некоторых случаях приводят к изменению аминокислотной последовательности полипептида, кодируемого эталонным полинуклеотидом. В некоторых случаях нуклеотидные замены приводят к аминокислотным заменам, делециям, добавлениям, слияниям и укорочениям полипептида, кодируемого эталонной последовательностью. Как правило, различия ограничены, так что последовательности эталонного полипептида и варианта в целом очень схожи и во многих областях идентичны.

[00114] В настоящем документе термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают линейные и кольцевые нуклеиновые кислоты, матричную РНК (мРНК), кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, векторы, зонды и праймеры. Используемый в настоящем документе термин «полинуклеотид», или «нуклеиновая кислота», за которым следует название гена (например, «нуклеиновая кислота РКР2»), относится к полинуклеотидной последовательности, кодирующей соответствующий белок (например, «белок РКР2»).

[00115] В настоящем документе термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая иногда включает кодируемые генетически и не кодируемые генетически аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты, а также полипептиды с модифицированными пептидными остовами. Термин охватывает слитые белки, включая, но не ограничиваясь ими, слитые белки с гетерологичной аминокислотной последовательностью, слитые белки с гетерологичными и гомологичными лидерными последовательностями, с N-концевыми остатками метионина или без них, белки с иммунологической меткой и тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин «белок», за которым следует название гена (например, «белок РКР2»), относится либо к нативному белку, либо к его функциональному варианту. «Нативный белок» представляет собой белок, кодируемый геномной копией гена организма, предпочтительно организма, для которого предназначен вектор (например, человека, грызуна, примата или животного, представляющего ветеринарный интерес), в любой из функциональных изоформ или функциональных аллельных вариаций гена.

[00116] Используемый в настоящем документе термин «функциональный вариант», или «вариант», белка означает вариант с любым количеством аминокислотных замен, вставок, укорочений или внутренних делеций, который сохраняет функциональные свойства белка, включая, например, способность белка индуцировать в сочетании с другими факторами организацию десмосом. В некоторых случаях функциональные варианты идентифицируют компьютерным способом, например варианты, имеющие только консервативные замены, или экспериментально с использованием анализов *in vitro* или *in vivo*.

[00117] Используемый в настоящем документе термин «кодоновый вариант» полинуклеотидной последовательности относится к полинуклеотидной последовательности, которая кодирует тот же белок, что и эталонная полинуклеотидная последовательность, и имеет одну или более синонимичных замен кодонов. Выбор синонимичных кодонов находится в пределах компетенции специалистов в данной области, кодирование в виде генетического кода известно. В некоторых случаях выполняют оптимизацию кодонов с использованием различных вычислительных инструментов (таких как инструмент оптимизации кодонов GENSMART™, доступный на сайте www.genscript.com). Как правило, оптимизацию кодонов используют для повышения экспрессии белка в гетерологичной системе, например, когда кодирующая последовательность человека экспрессируется в бактериальной системе. Предполагается, что термин «кодоновый вариант» охватывает как последовательности, оптимизированные таким образом, так и последовательности, оптимизированные для других целей, таких как удаление CpG-островков и/или криптических стартовых сайтов.

[00118] Термин «вектор» относится к макромолекуле или комплексу молекул, содержащих полинуклеотид или белок, который должен быть доставлен в клетку-хозяина либо *in vitro*, либо *in vivo*. Вектор иногда представляет собой модифицированную РНК, липидную наночастицу (инкапсулирующую либо ДНК, либо РНК), транспозон, аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор, аденовирус, ретровирус, интегрирующий лентивирусный вектор (LVV) или не интегрирующий LVV. Таким образом, используемые в настоящем документе «векторы» включают «голые» полинуклеотиды, используемые для трансформации (например, плазмиды), а также любую другую композицию, используемую для доставки полинуклеотида в клетку, включая векторы, способные трансдуцировать клетки, и векторы, применимые для трансфекции клеток.

[00119] Используемый в настоящем документе термин «вирусный вектор»

относится либо к молекуле нуклеиновой кислоты, которая включает элементы нуклеиновой кислоты вирусного происхождения, обычно облегчающие перенос молекулы нуклеиновой кислоты или ее интеграцию в геном клетки, либо к вирусной частице, которая опосредует перенос нуклеиновой кислоты. Вирусные частицы обычно включают различные вирусные компоненты, а иногда и клеточные компоненты, в дополнение к нуклеиновой кислоте (кислотам).

[00120] Термин «генетическая модификация» относится к постоянному или временному генетическому изменению, индуцированному в клетке после введения новой нуклеиновой кислоты (то есть, экзогенной по отношению к клетке нуклеиновой кислоты). Генетическое изменение часто достигается путем встраивания новой нуклеиновой кислоты в геном сердечной клетки, либо временным или стабильным сохранением новой нуклеиновой кислоты в виде внехромосомного элемента. Если клетка представляет собой эукариотическую клетку, постоянное генетическое изменение часто достигается путем встраивания нуклеиновой кислоты в геном клетки. Подходящие способы генетической модификации включают вирусную инфекцию, трансфекцию, конъюгацию, слияние протопластов, электропорацию, технологию генной пушки, осаждение фосфатом кальция, прямую микроинъекцию и тому подобное

[00121] На ФИГ. 1 показаны сердечные десмосомы, связывающие клетки воедино (Brodehl et al., 2018; Moncayo-Arlandi and Brugada, 2017). Красная линия на верхней панели изображает десмин, промежуточные филаменты, образующие сеть для стабилизации саркомеров и других органелл. ЭМ изображение десмосомы представлено в левом углу.

[00122] На ФИГ. 2 приведено краткое описание признаков заболевания и возможных механизмов заболевания АКМПЖ.

[00123] На ФИГ. 3А-3С представлены результаты кратковременного выключения РКР2 в иПСКМ в день 8, которые продемонстрировали значительные клеточные фенотипы. На ФИГ. 3А и ФИГ. 3С РКР2 зеленого цвета, DSP красного цвета и ядра синего цвета. На ФИГ. 3В саркомерный белок Actn2 зеленого цвета и MyBPC пурпурного цвета.

[00124] На ФИГ. 4 представлен количественный анализ мембранной локализации DSP при определении по совместной локализации с PKG, другим десмосомным белком, в ответ на диапазон доз киРКР2 в день 8 после выключения гена.

[00125] На ФИГ. 5 представлен иммуноблот, показывающий, что выключение РКР2 приводит к уменьшению общего количества белка DSP из десмосом, обнаруживаемого в основном в нерастворимой фракции в клетках, в которых РКР2 выключен, в сравнении с контролем по выключению гена, киОтр.

[00126] На ФИГ. 6А представлена карта вектора для генной терапии AAV-РКР2. На ФИГ. 6В показано восстановление мембранной локализации DSP в результате экспрессии трансгена РКР2 с использованием AAV-опосредованной доставки гена в иПСКМ в день 10 после выключения РКР2 и в день 8 после трансдукции AAV. GFP

экспрессируется совместно с РКР2, имеющим flag-метку. Flag-метка голубого цвета, DSP красного цвета, ядра синего цвета. На ФИГ. 6С показано восстановление за счет трансгена AAV-РКР2 экспрессии общего DSP после выключения РКР2 в иПСК кардиомиоцитах. Количественная оценка общей интенсивности DSP в иммунофлуоресцентном сигнале показана после выключения РКР2 в отсутствие или в присутствии восстанавливающего трансгена AAV-РКР2.

[00127] На ФИГ. 7А-7В показано, что экспрессия трансгена AAV РКР2 восстанавливала скорость сокращения иПСКМ после выключения РКР2. На ФИГ. 7А показан график выключения РКР2, трансдукции AAV и регистрации сократимости. На ФИГ. 7В показано, что трансген AAV-РКР2 частично восстанавливает скорость сокращения после выключения РКР2. Скорость сокращения, нормализованная к количеству ядер, показана после выключения РКР2 в отсутствие или в присутствии восстанавливающего трансгена AAV-РКР2.

[00128] На ФИГ. 8 представлено схематическое изображение экспрессионной кассеты AAV второго поколения для РКР2 α человека и мыши. В левой таблице представлены все элементы в экспрессионной кассете. На правой панели показаны мышинные и человеческие экспрессионные кассеты.

[00129] На ФИГ. 9А-9В представлены предварительные результаты, показывающие, что AAV-hРКР2 α второго поколения частично восстанавливает скорость сокращения после выключения РКР2 в иПСК кардиомиоцитах. На ФИГ. 9А показано, что трансген РКР2 α человека экспрессируется в иПСК кардиомиоцитах зависимым от дозы образом. На ФИГ. 9В показано, что трансген РКР2 α человека приводит к частичному восстановлению скорости сокращений после выключения РКР2 при МОИ 30000.

[00130] На ФИГ. 10 представлены результаты анализа экспрессии AAV9 второго поколения для РКР2 α человека и мыши у мышей C57BL/6 в возрасте 12 недель. На верхней панели показана экспрессия эндогенного мышинового РКР2 α у контрольных мышей с введенным HBSS и экспрессия как эндогенного, так и введенного трансдукцией при двух инъецированных дозах AAV9, 1E13 и 5E13, мышинового РКР2 α , соответственно. На нижней панели показан соответствующий анализ экспрессии введенного трансдукцией человеческого РКР2 α , немного более крупного гомолога.

[00131] На ФИГ. 11А-11G показаны результаты пилотных исследований безопасности экспрессии AAV9 второго поколения для РКР2 α человека и мыши у мышей C57BL/6 в возрасте 12 недель. На ФИГ. 11А показана масса тела до инъекции AAV9 и масса тела через 3 недели после инъекции AAV9. На ФИГ. 11В показаны результаты измерения сердечной функции в виде процентной доли фракции выброса через 3 недели после инъекции AAV9 для РКР2 α мыши или человека. На ФИГ. 11С и ФИГ. 11D показана структура ЛЖ, измеренная по внутренним диаметрам в конце диастолы и систолы. На ФИГ. 11Е-11G показана электрофизиологическая активность, измеренная в виде QRS (11Е), интервала QT (11F) и амплитуды P/R (11G).

[00132] На ФИГ. 12 представлена кривая выживаемости Каплана-Мейера для

мышей РКР2-сКО после индукции тамоксифеном. Кривая показывает, что мыши РКР2-сКО начинают погибать через три недели после индукции, и только одна мышшь (из семи) дожила до шести недель.

[00133] На ФИГ. 13А-13В показана дилатационная кардиомиопатия правого желудочка (ПЖ) у мышшей РКР2-сКО. На ФИГ. 13А (левая панель) представлены изображения, иллюстрирующие увеличение внутреннего размера ПЖ в конце диастолы (ВРПЖД) у мышшей РКР2-сКО через три недели после индукции тамоксифеном в сравнении с контрольными мышшами. На ФИГ. 13А (правая панель) представлен график ВРПЖД с течением времени у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контрольными мышшами. На ФИГ. 13В (левая панель) представлены изображения, иллюстрирующие увеличение площади ПЖ у мышшей РКР2-сКО. Площадь ПЖ, показанная пунктирной линией, демонстрирует увеличение, начиная с одной недели после индукции, через три недели и через четыре недели после индукции. На ФИГ. 13В (правая панель) представлен график площади ПЖ с течением времени у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контрольными мышшами.

[00134] На ФИГ. 14А-14В показано развитие дилатационной кардиомиопатии левого желудочка (ЛЖ) у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контролем. На ФИГ. 14А (левая панель) представлены изображения, иллюстрирующие увеличение внутреннего размера ЛЖ в конце систолы (ВРЛЖс) и в конце диастолы (ВРЛЖД) у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контролем. ВРЛЖс показан желтой линией слева и ВРЛЖД показан красной линией справа. На ФИГ. 14А (правая панель) представлен график, показывающий увеличение ВРЛЖс и ВРЛЖД у мышшей РКР2-сКО с течением времени в сравнении с контрольными мышшами. На ФИГ. 14В представлен график производительности ЛЖ при измерении в виде процентной доли фракции выброса с течением времени в сравнении с контрольными мышшами.

[00135] На ФИГ. 15 показано развитие тяжелых электрофизиологических фенотипов у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контролем, в частности, удлинение интервала QRS и увеличение отношения амплитуд P/R у мышшей РКР2-сКО. На верхней панели представлена иллюстративная электрокардиограмма контрольных мышшей (вверху) и мышшей РКР2-сКО (внизу). Увеличенная амплитуда зубца P показана у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контролем. Электрокардиограмма также показывает снижение амплитуды зубца R у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контрольными мышшами. Кроме того, интервал QRS удлинен у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контролем. На нижней панели представлены графики увеличения интервала QRS и увеличения амплитуды P/R у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контролем.

[00136] На ФИГ. 16А-16С показана повышенная экспрессия генов фиброза, ремоделирования тканей и маркеров сердечной недостаточности. На ФИГ. 16А показана экспрессия РНК РКР2 в ПЖ и ЛЖ (вверху), а также экспрессия белка десмосомы и Сх43 (внизу) у мышшей РКР2-сКО в сравнении с контролем. У мышшей РКР2-сКО наблюдалась примерно половинная экспрессия РКР2 в сравнении с контролем как в ЛЖ, так и в ПЖ.

На нижней панели представлен иммуноблот, показывающий снижение в ЛЖ белковых уровней РКР2, DSP и PKG в десмосоме и Сх43 в щелевых контактах. На ФИГ. 16В показана повышенная экспрессия генов фиброза: TGF β 1, Col1a1 и Col3a1; а также генов ремоделирования тканей: Timp1 и Mmp2 у мышей РКР2-сКО в сравнении с контролем. Видно, что экспрессия TGF β 1 и Timp1 возрастает при сравнении контрольных мышей и мышей РКР2-сКО как в ПЖ, так и в ЛЖ. Экспрессия Col1a1 и Col3a1 также сильно увеличена у мышей РКР2-сКО в сравнении с контрольными мышами, с немного более повышенной экспрессией в ЛЖ в сравнении с ПЖ. Показано, что экспрессия Mmp2 увеличена у мышей РКР2-сКО в сравнении с контрольными мышами, с немного более повышенной экспрессией в ПЖ в сравнении с ЛЖ. Показано отсутствие разницы в экспрессии Mmp9 у контрольных мышей и мышей РКР2-сКО. На ФИГ. 16С показана повышенная экспрессия маркеров сердечной недостаточности, NPPA и NPPB, у мышей РКР2-сКО в сравнении с контрольными мышами. Экспрессия как NPPA, так и NPPB, немного более повышена в ЛЖ в сравнении с ПЖ у мышей РКР2-сКО.

[00137] На ФИГ. 17 показан дизайн эксперимента для оценки эффективности РКР2 в качестве генной терапии в модели АКМПЖ на мышах РКР2-сКО. Всего в исследовании было включено шесть отдельных групп лечения, и животные во всех группах получали тамоксифен в течение трех последовательных дней. В эксперименте были использованы: шесть мышей ДТ, получавших буфер HBSS; десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ, получавших буфер HBSS; десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ, получавших 3E13 вг/кг AAV9:РКР2 человека за 3 недели до индукции тамоксифеном; десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ, получавших 5E13 вг/кг AAV9:РКР2 мыши за 3 недели до индукции тамоксифеном; десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ, получавших 5E13 вг/кг AAV9:РКР2 мыши сразу после индукции тамоксифеном; и десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ, получавших 5E13 вг/кг AAV9:РКР2 мыши через 1 неделю после индукции тамоксифеном. До индукции тамоксифеном были собраны исходные показатели массы тела, эхокардиографии и ЭКГ. Все показатели после индукции тамоксифеном регистрировали еженедельно, включая эхокардиографию в В-режиме, М-режиме (ПЖ, ЛЖ), структуру (внутренние диаметры ЛЖ) и 30-мин ЭКГ, для количественной оценки аритмий и оценки электрофизиологических параметров.

[00138] На ФИГ. 18А представлено схематическое изображение экспрессионных кассет AAV для РКР2 α человека и мыши. AAV-pTnT600-mPKP2-WPRE имеет 4199 пар оснований, которые включают инвертированные концевые повторы (ITR) на 5'-конце и на 3'-конце, промотор pTNT, за которым следует кодирующая последовательность для РКР2 α мыши, затем WPRE и bGH на 3'-конце перед 3'-ITR. AAV-pTnT600-hPKP2 α -WPRE имеет 4324 пары оснований, которые включают инвертированные концевые повторы (ITR) на 5'-конце и на 3'-конце, промотор pTNT, за которым следует кодон-оптимизированная кодирующая последовательность для РКР2 α человека, затем WPRE и bGH на 3'-конце перед 3'-ITR. На ФИГ. 18В представлены иммуноблоты, показывающие белковую экспрессию РКР2 α мыши и человека у мышей дикого типа, получавших

AAV9:PKP2 (смотри полные блоты на ФИГ. 10). Результаты для получавших буфер мышей представлены на левой панели. На центральной панели представлен иммуноблот для мышей, получавших $1E13$ вирусных геномов на кг, с AAV9:mPKP2 на верхнем иммуноблоте и AAV9:hPKP2 (кодон-оптимизированная) на нижнем иммуноблоте. На правой панели представлены иммуноблоты для мышей, получавших $5E13$ вирусных геномов на кг, с AAV9:mPKP2 на верхнем иммуноблоте и AAV9:hPKP2 (кодон-оптимизированная) на нижнем иммуноблоте.

[00139] На ФИГ. 19 представлена кривая выживаемости Каплана-Мейера для мышей PKP2-сКО, получавших AAV9:PKP2. Результаты для мышей, получавших буфер, показаны красной линией, которая начинает снижаться через три недели после индукции тамоксифеном, с примерно нулевой вероятностью выживания через шесть недель после индукции тамоксифеном. Животные во всех группах, получавшие препарат, имели 90% или большую вероятность выживания через шесть недель после индукции тамоксифеном.

[00140] На ФИГ. 20А-20С показана эффективность введения AAV9:PKP2 у мышей PKP2-сКО для уменьшения дилатации ПЖ и ЛЖ, а также для поддержания сердечной функции. На ФИГ. 20А представлен график, показывающий улучшение фракции выброса у мышей, получавших AAV9:PKP2. На этом графике видно, что у получавших буфер мышей PKP2-сКО наблюдалось 34% уменьшение фракции выброса в сравнении как с мышами дикого типа, так и с мышами, получавшими AAV9:PKP2. На ФИГ. 20В представлен график, показывающий уменьшение дилатации ПЖ у мышей, получавших AAV9:PKP2, в сравнении с мышами, получавшими буфер, результаты для которых показаны красной линией, расположенной на графике выше, чем таковая для мышей дикого типа и мышей, получавших AAV9:PKP2. На ФИГ. 20С представлен график, показывающий улучшение ВРЛЖд (вверху) и ВРЛЖс (внизу). Результаты для каждой группы лечения представлены отдельной гистограммой, с результатами для мышей дикого типа и мышей PKP2-сКО, получавших буфер, показанными слева.

[00141] На ФИГ. 21А-21В показано улучшение параметров ЭКГ у мышей PKP2-сКО, получавших AAV:PKP2. На ФИГ. 21А представлены иллюстративные необработанные кривые ЭКГ контрольных мышей и мышей PKP2-сКО, получавших AAV9:mPKP2 и буфер. Кривые ЭКГ для получавших буфер контрольных мышей и мышей PKP2-сКО показаны на двух верхних панелях. Результаты для получавших AAV9:PKP2 мышей PKP2-сКО показаны на двух нижних кривых. На ФИГ. 21В представлены графики, показывающие улучшение отношения P/R (верхний график), интервала QT (центральный график) и интервала QRS (нижний график) у мышей PKP2-сКО, получавших AAV9:PKP2, в сравнении с введением буфера. В каждом случае мыши PKP2-сКО, получавшие буфер, отличаются от мышей, получавших препарат, и от мышей дикого типа.

[00142] На ФИГ. 22А-22В показано уменьшение тяжести аритмий за счет введения AAV9:PKP2 у мышей PKP2-сКО. На ФИГ. 22А (вверху) представлена таблица градаций тяжести аритмий. Степень 5 соответствует НЖТ/ЖФ/внезапной остановке сердца; 4

соответствует НУЖТ; 3 соответствует >100 ПЖС, куплетам и триплетам; 2 соответствует >50, <100 ПЖС; 1 соответствует <50 ПЖС, ПУС и АВ-блокаде; и 0 соответствует <10 ПЖС. На ФИГ. 22А (внизу) представлен график, демонстрирующий улучшение показателей тяжести аритмии у мышей РКР2-сКО, получавших AAV9:РКР2, в сравнении с контролем. У получавших буфер мышей РКР2-сКО наблюдается увеличение показателя желудочковой аритмии, начиная с трех недель после индукции тамоксифеном. На ФИГ. 22В представлен график распределения, показывающий уменьшение тяжести аритмии у мышей РКР2-сКО, получавших AAV9:РКР2, в сравнении с контролем. Результаты для мышей дикого типа показаны на самой левой гистограмме, затем следуют результаты для мышей РКР2-сКО, получавших буфер, средний балл для которых составляет 3. Результаты для мышей, получавших препарат, представлены четырьмя гистограммами, которые в среднем показывают резкое снижение показателя в баллах.

[00143] На ФИГ. 23 представлен дизайн эксперимента, использованного для оценки эффективности РКР2 человека в качестве генной терапии с использованием модели АКМПЖ на мышцах РКР2-сКО. Мышам РКР2-сКО вводили тамоксифен в течение трех последовательных дней, а затем вводили AAV9:hРКР2 в различных дозах или HBSS.

[00144] На ФИГ. 24А-24D представлены результаты генно-терапевтического лечения при помощи AAV9:hРКР2 мышей РКР2-сКО. На ФИГ. 24А показаны результаты для фракции выброса, где у контрольных мышей наблюдается высокая фракция выброса, которая уменьшается при индукции тамоксифеном и не зависит от введения HBSS. Введение возрастающих доз AAV9:hРКР2 приводит к значительному увеличению фракции выброса у получавших препарат мышей ($P<0,05$). На ФИГ. 24В показаны результаты для размеров правого желудочка. Контрольные мыши имеют относительно небольшой размер ПЖ, который увеличивается при индукции тамоксифеном и не зависит от введения HBSS. Введение AAV9:hРКР2 приводит к зависимому от дозы уменьшению размера ПЖ (более низкие две дозы $P<0,05$, самая высокая доза $P<0,01$). На ФИГ. 24С показана дилатация ЛЖ, измеренная по ВРЛЖд. На ФИГ. 24D показана дилатация ЛЖ, измеренная по ВРЛЖс. Введение AAV9:hРКР2 приводит к значительному снижению увеличения дилатации левого желудочка при измерении по ВРЛЖд ($P<0,05$) и ВРЛЖс ($P<0,05$, только для дозы $1e14$).

[00145] На ФИГ. 25 представлены результаты генно-терапевтического лечения при помощи AAV9:hРКР2 мышей РКР2-сКО в виде интервала QT (вверху), отношения R/R (в центре) и показателя тяжести аритмии (внизу). Введение AAV9:hРКР2 приводило к значительному уменьшению через 4 недели после индукции тамоксифеном интервала QT ($P<0,05$), к тенденции уменьшения отношения R/R и к тенденции уменьшения тяжести аритмий у мышей РКР2-сКО в сравнении с мышцами РКР2-сКО, получавшими HBSS, результаты для которых показаны красными столбиками.

[00146] На ФИГ. 26А-26В представлены результаты введения AAV9:hРКР2 мышам РКР2-сКО в виде уменьшения экспрессии маркеров сердечной недостаточности, маркеров фиброза и ремоделирования тканей в правом желудочке (ФИГ. 26А) и левом желудочке

(ФИГ. 26В). Введение AAV9:hPKP2 мышам РКР2-сКО было эффективным для уменьшения экспрессии генов маркеров сердечной недостаточности, фиброза и ремоделирования тканей как в правом, так и в левом, желудочке через 4 недели после индукции тамоксифеном. Уровни эндогенной и трансгенной мРНК РКР2 были оценены в сердце у контрольных мышей ДТ, мышей РКР2-сКО и мышей после трансдукции AAV9:hPKP2, соответственно. Маркерами сердечной недостаточности являются NPPA и NPPB. Генами фиброза являются Col1a1 и Col3a1. Геном ремоделирования тканей является Timp1.

[00147] На ФИГ. 27А-27В представлены результаты введения AAV9:hPKP2 мышам РКР2-сКО в виде уменьшения развития фиброза как в правом, так и в левом, желудочке через четыре недели после индукции тамоксифеном. На ФИГ. 27А показано окрашивание мышц в красный цвет и трихромное окрашивание фиброза в синий цвет. Желтыми стрелками отмечены области со значительным фиброзом в сердце мышей РКР2-сКО. На ФИГ. 27В представлен график количественной оценки положительной по коллагену ткани у контрольных мышей и мышей РКР2-сКО, которым вводили или не вводили AAV9:hPKP2. Не получавшие препарат мыши РКР2-сКО имели наибольшее количество положительной по коллагену ткани, тогда как мыши, получавшие 1e13, имели сниженные примерно наполовину уровни. У мышей, получавших 3e13 или 1e14, уровни коллагена были близки к таковым у контрольных мышей.

[00148] На ФИГ. 28А-28В показана экспрессия РКР2 и других белков десмосомы в растворимой фракции (ФИГ. 28А) и нерастворимой фракции (ФИГ. 28В). DSP отсутствовал в растворимых фракциях. Примечание: *Это животное было обнаружено мертвым еще до эхокардиографии. **Интенсивность белка РКР2 нормализована к интенсивности тубулина на том же вестерн-блоте. Для простоты показан только один из двух блотов тубулина. РКР2 показан в виде двух полос, эндогенного РКР2 мыши и более крупного РКР2 человека.

ПРИМЕРЫ

[00149] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации различных вариантов осуществления изобретения и не предназначены для какого-либо ограничения настоящего изобретения. Настоящие примеры вместе со способами, описанными в настоящем документе, на сегодняшний день представляют собой предпочтительные варианты осуществления, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема формулы изобретения. Изменения в нем и другие варианты применения, которые соответствуют сущности изобретения, определенной объемом формулы изобретения, будут очевидны для специалистов в данной области.

Пример 1: Клеточная модель истощения РКР2

[00150] В качестве первоначального доказательства концепции была создана клеточная модель истощения РКР2 с помощью киРНК. РКР2 был истощен в индуцированных полученных из плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитах (иПСКМ). Острое выключение РКР2 с помощью киРНК проводили с использованием

киРНК, приобретенных у компании Invitrogen, включая как киРКР2, так и киРНК отрицательного контроля (4390843, выбранная для выключения гена №1 киРНК отрицательного контроля; 4392420, идентификатор в анализе s531202, выбранная для выключения гена предварительно разработанная киРНК №1; 4392420, идентификатор в анализе s531203, выбранная для выключения гена предварительно разработанная киРНК №2; 4392420, идентификатор в анализе s531204, выбранная для выключения гена предварительно разработанная киРНК №3 и 4392420, идентификатор в анализе s10585, выбранная для выключения гена предварительно разработанная киРНК №4). Это выключение гена приводило к исчезновению DSP из клеточной мембраны в день 8, как показала иммунофлуоресценция на ФИГ. 3А. Мембранную локализацию DSP измеряли количественно (ФИГ. 4), что продемонстрировало значительное уменьшение совместной локализации DSP-PKG. Уменьшение плотности саркомеров также наблюдали методом иммунофлуоресценции (ФИГ. 3В). Кроме того, методом иммунофлуоресценции наблюдали нарушение уплотнения клеток в структурированных iPСКМ (ФИГ. 3С).

[00151] Проводили иммуноблоттинг лизата киРКР2 iPСКМ, который показал, что сниженное общее количество белка DSP из десмосом обнаруживается в основном в нерастворимой фракции клеток, в которых РКР2 выключен (ФИГ. 5).

Пример 2: AAV9-РКР2 восстанавливает фенотип после истощения РКР2

[00152] При доставке варианта AAV9 CR9-01 для экспрессии flag-маркированного РКР2, управляемой промотором сердечного тропонина (TnT) из 600 нуклеотидов с GFP для идентификации трансдуцированных клеток (ФИГ. 6А), наблюдали повторную локализацию DSP обратно на мембране в iPСКМ с выключенным РКР2 (ФИГ. 6В), с восстановлением тем самым структуры десмосомы. Трансген РКР2 был кодон-оптимизирован для устойчивости к опосредованному киРНК выключению гена. Из-за технической сложности было невозможно точно количественно определить, сколько DSP было специфически локализовано на мембране, где происходит клеточное соединение и существуют десмосомы. Поэтому количественно определяли общую интенсивность клеточного DSP вместо количества DSP, локализованного на мембране.

[00153] Для демонстрации того, что трансген РКР2 может функционально восстанавливать сократительную способность кардиомиоцитов, сокращение iPСКМ в светлом поле регистрировали с помощью инструмента визуализации SONY, и видеозаписи были проанализированы с помощью программного обеспечения для анализа пульса DANA Solutions. Временная шкала эксперимента показана на ФИГ. 7А. В этом эксперименте киРНК использовали для истощения эндогенной экспрессии РКР2 в клетках iPСКМ в день 1. киРНК в двух концентрациях, 5 и 1,25 нМ, использовали либо для киРНК отрицательного контроля, либо для киРКР2. Две киРКР2, №3 и №4, объединяли для выключения транскрипта. В день 3 AAV РКР2 использовали для трансдукции истощенных клеток, что приводило к восстановлению скорости сокращения, наблюдаемому в iPСКМ в ответ на экспрессию трансгена РКР2 (ФИГ. 7В). Сократимость регистрировали в дни 3, 4, 5, 6, 7 и 8 после трансдукции AAV. Скорость сокращения

усредняли по трем 96-луночным планшетами и по клеткам, трансдуцированным AAV либо при MOI 300000, либо при MOI 100000, соответственно, для киРНК в концентрации как 5, так и 1,25 нМ. Значение скорости было дополнительно нормализовано к среднему количеству ядер в случае MOI 300000 или 100000, соответственно.

Пример 3: Воздействие РКР2 α AAV9 второго поколения

[00154] Экспрессионная кассета AAV второго поколения была разработана для экспрессии РКР2 α человека или мыши. Кассета второго поколения включала посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH поли(A)). Вектор второго поколения представлен на ФИГ. 8.

[00155] Исследования восстановления за счет трансгена проводили в iPСК кардиомиоцитах с выключенным РКР2. Предварительные результаты показали, что AAV-hРКР2 α второго поколения частично восстанавливал скорость сокращения после выключения РКР2 в iPСК кардиомиоцитах. На ФИГ. 9А представлены результаты, показывающие, что трансген РКР2 α человека экспрессировался в iPСК кардиомиоцитах зависимым от дозы образом при различных MOI (множественность заражения, среднее количество вирусных частиц, инфицирующих каждую клетку). Экспрессию РКР2 и DSP (десмоплакин) оценивали как в растворимой, так и в нерастворимой фракциях клеток через 3 дня после трансдукции AAV. На ФИГ. 9В показано, что трансген РКР2 α человека приводил к частичному восстановлению скорости сокращения после выключения РКР2 при MOI 30000, что подтверждено t-критерием Стьюдента с р-значением=0,0103, в отличие от значения $p < 0,0001$ без трансгена AAV РКР2.

[00156] Был проведен эксперимент для анализа экспрессии AAV9 второго поколения для РКР2 α человека и мыши у 12-недельных мышей C57BL/6. Результаты этого эксперимента показаны на ФИГ. 10. Животным внутривенно вводили через ретроорбитальный синус AAV9-РКР2 α в дозах 1E13 и 5E13 гв/кг, соответственно. Ткани ЛЖ сердца собирали через 3,5 недели после инъекции. Растворимую фракцию тканей ЛЖ анализировали методом вестерн-блоттинга. На верхней панели показана экспрессия эндогенного РКР2 α мыши у контрольных мышей, получавших HBSS, и экспрессия как эндогенного, так и введенного трансдукцией, РКР2 α мыши при двух инъекцированных дозах AAV9, 1E13 и 5E13, соответственно. На нижней панели показан соответствующий анализ экспрессии введенного трансдукцией РКР2 α человека, гомолога немного большего размера. Этот человеческий гомолог является кодон-оптимизированным. Через 3,5 недели после инъекции AAV при исследовании методом эхокардиографии неблагоприятные сердечные явления отсутствовали.

[00157] На ФИГ. 11А-11G представлены результаты пилотных исследований безопасности экспрессии AAV9 второго поколения для РКР2 α человека и мыши у 12-недельных мышей C57BL/6, которые не показали каких-либо неблагоприятных явлений в сердце через 3 недели после инъекции AAV при исследовании методом эхокардиографии. Животным внутривенно вводили через ретроорбитальный синус AAV9-РКР2 α в дозах

1E13 и 5E13 гв/кг, соответственно. На ФИГ. 11А показана масса тела до инъекции AAV9 и масса тела через 3 недели после инъекции AAV9. На ФИГ. 11В показана функция сердца, измеренная в виде процентной доли фракции выброса, через 3 недели после инъекции AAV9 для РКР2 α либо мыши, либо человека. На ФИГ. 11С и 11D показана структура ЛЖ, измеренная по внутренним диаметрам в конце диастолы и систолы. На ФИГ. 11Е-11F показана электрофизиологическая активность в виде QRS, интервала QT и амплитуды P/R.

Пример 4: Характеристика модели АКМПЖ на мышцах РКР2-сКО

[00158] Четырем мышам дикого типа и семи мышам РКР2-сКО с АКМПЖ, α МУНС-Cre-ER(T2), РКР2^{fl/fl}, в возрасте примерно 3 месяцев вводили внутривентриальной инъекцией в течение четырех последовательных дней тамоксифен (20 мг/мл в кукурузном масле, 100 мкл/мышь (примерно 75 мг/кг)). До индукции тамоксифеном были собраны исходные показатели массы тела, эхокардиографии и ЭКГ. Все показатели после индукции тамоксифеном регистрировали еженедельно, включая эхокардиографию в В-режиме, М-режиме (ПЖ, ЛЖ), структуру (внутренние диаметры ЛЖ) и 30-мин ЭКГ, для количественной оценки аритмий и оценки электрофизиологических параметров. В конце исследования собирали ткани после аутопсии, включая сердце и легкое.

[00159] Проводили анализ выживаемости мышей (ФИГ. 12). Кривая выживаемости Каплана-Мейера показала резкое снижение выживаемости мышей РКР2-сКО через три недели после индукции тамоксифеном, и только одно животное прожило шесть недель после индукции тамоксифеном. Через три недели после индукции у животных наблюдались тяжелые клинические симптомы, включая внезапную смерть, отек, снижение активности, меньшую толерантность к изофлурану.

[00160] У мышей РКР2-сКО развивалась дилатационная кардиомиопатия ПЖ уже через неделю после индукции тамоксифеном. На левой панели ФИГ. 13А показано, что через три недели после индукции тамоксифеном у мышей РКР2-сКО развилось увеличение внутреннего размера ПЖ в конце диастолы (ВРПЖд). На правой панели ФИГ. 13А показано постоянное увеличение ВРПЖд, нормализованного к массе тела, в течение четырех недель после индукции тамоксифеном. На левой панели ФИГ. 13В представлены изображения еженедельного увеличения площади ПЖ, предполагающие дилатацию ПЖ. На правой панели ФИГ. 13В показано увеличение площади ПЖ, нормализованной к массе тела. Р-значение: критерий Стьюдента. Планка погрешностей: SEM *P<0,05, **P<0,01 против контроля.

[00161] У мышей РКР2-сКО развилась дилатационная кардиомиопатия ЛЖ после индукции тамоксифеном. На левой панели ФИГ. 14А показано, что через три недели после индукции тамоксифеном у мышей РКР2-сКО развилось увеличение внутреннего размера ЛЖ в конце систолы (ВРЛЖс) и в конце диастолы (ВРЛЖд). На правой панели ФИГ. 14А показано постоянное увеличение ВРЛЖс и ВРЛЖд, нормализованных к массе тела, в течение четырех недель после индукции тамоксифеном. На ФИГ. 14В показано резкое снижение производительности ЛЖ, измеренное по % фракции выброса, через две

недели после индукции тамоксифеном. Р-значение: критерий Стьюдента. Планка погрешностей: SEM *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 против контроля.

[00162] У мышей РКР2-сКО развивался удлинённый интервал QRS и увеличенное отношение амплитуд P/R, что свидетельствует о нарушении желудочковой проводимости и внутрижелудочковой блокаде. На верхней панели ФИГ. 15 показано, что через три недели после индукции тамоксифеном у мышей РКР2-сКО развивалась повышенная амплитуда зубца P и уменьшенная амплитуда зубца R. На нижнем левом графике ФИГ. 15 показано постоянное увеличение интервала QRS, и на нижнем правом графике показано увеличение отношения амплитуд P/R в течение четырех недель после индукции тамоксифеном. Р-значение: критерий Стьюдента. Планка погрешностей: SEM *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 против контроля.

[00163] У мышей РКР2-сКО развились спонтанные преждевременные желудочковые сокращения (ПЖС). В Таблице 2 приведены данные, полученные в течение 30 минут непрерывной регистрации; через одну неделю ПЖС практически отсутствовали, а через две недели у всех животных РКР2-сКО были обнаружены эпизодические экстрасистолы. Частота случаев ПЖС еще более увеличивалась в более поздние сроки, большинство животных испытывали более 100 ПЖС. Начиная с трех недель у животных РКР2-сКО наблюдалась внезапная остановка сердца.

Животное №	Неделя после индукции тамоксифеном			
	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4
121	0	5	>100	Погибло
125	0	12	12	Погибло
130	0	2	Погибло	Погибло
137	0	66	>100	Н/П
138	0	20	>100	Погибло
150	0	1	11	>100
152	4	5	>100	>100

[00164] У мышей РКР2-сКО наблюдалась повышенная экспрессия маркеров фиброза, генов ремоделирования тканей и маркеров сердечной недостаточности. На верхней панели ФИГ. 16А показана экспрессия мРНК РКР2 как в ПЖ, так и в ЛЖ, у мышей дикого типа и мышей РКР2-сКО. Красные и синие точки представляют каждую отдельную мышь. На нижней панели ФИГ. 16А представлены репрезентативные иммуноблоты, показывающие снижение в ЛЖ белковых уровней РКР2, DSP и PKG в десмосоме и Сx43 в щелевых контактах. На ФИГ. 16В показано, что у мышей РКР2-сКО наблюдалась повышенная экспрессия генов фиброза, TGFβ1, Colla1 и Col3a1, а также генов ремоделирования тканей, Timp1 и Mmp2. На ФИГ. 16С показано, что у мышей РКР2-сКО наблюдалась повышенная экспрессия маркеров сердечной недостаточности,

NPRA и NPВ.

Пример 5: Эффективность генной терапии с использованием РКР2 в модели АКМПЖ на мышах РКР2-сКО

[00165] На ФИГ. 17 представлен дизайн эксперимента, использованного для оценки эффективности РКР2 в качестве мишени для генной терапии с использованием модели АКМПЖ на мышах РКР2-сКО. Всего в исследовании было включено шесть отдельных групп лечения, и животные во всех группах получали тамоксифен в течение трех последовательных дней. Группы лечения были следующими: шесть мышей дикого типа получали буфер HBSS; десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ получали буфер HBSS; десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ получали 3E13 гв/кг AAV9:РКР2 человека за три недели до индукции тамоксифеном; десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ получали 5E13 гв/кг AAV9:РКР2 мыши за три недели до индукции тамоксифеном; десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ получали 5E13 гв/кг AAV9:РКР2 мыши сразу после индукции тамоксифеном и десять мышей РКР2-сКО с АКМПЖ получали 5E13 гв/кг AAV9:РКР2 мыши через одну неделю после индукции тамоксифеном.

[00166] До индукции тамоксифеном были собраны исходные показатели массы тела, эхокардиографии и ЭКГ. Все показатели после индукции тамоксифеном регистрировали еженедельно, включая эхокардиографию в В-режиме, М-режиме (ПЖ, ЛЖ), структуру (внутренние диаметры ЛЖ) и 30-мин ЭКГ, для количественной оценки аритмий и оценки электрофизиологических параметров. В конце исследования собирали ткани после аутопсии (сердце и легкое).

[00167] Экспрессия белка AAV9:РКР2 была обнаружена в ткани сердца ЛЖ у мышей дикого типа. На ФИГ. 18А представлено схематическое изображение экспрессионной кассеты AAV второго поколения для РКР2α человека и мыши. На ФИГ. 18В представлены репрезентативные иммуноблоты, показывающие экспрессию РКР2 мыши и человека через три недели после инъекции AAV9:РКР2 через ретроорбитальный синус (полные блоты представлены на ФИГ. 10). В общей сложности пяти мышам C57BL6 дикого типа в возрасте восьми недель вводили инъекцией для каждого вида воздействия: HBSS, 1E13 гв/кг или 5E13 гв/кг.

[00168] Кривая выживаемости Каплана-Мейера показала, что AAV9:РКР2 увеличивает продолжительность жизни мышей РКР2-сКО через 6 недель после индукции тамоксифеном во всех группах, получавших AAV9:РКР2. Как человеческий, так и мышинный, РКР2 продемонстрировал эффективность в увеличении продолжительности жизни получавших препарат мышей РКР2-сКО. На ФИГ. 19 красная линия, соответствующая мышам РКР2-сКО, получавшим буфер HBSS, демонстрирует резкое снижение через три недели после индукции тамоксифеном. Напротив, все мыши, получавшие AAV9-РКР2, выживали до 20 недель после индукции тамоксифеном.

[00169] Введение AAV9:РКР2 мышам РКР2-сКО показало эффективность в уменьшении дилатации ПЖ и ЛЖ, а также в поддержании сердечной функции. На ФИГ. 20А показано, что введение AAV9:РКР2 предотвращало снижение процентной доли

фракции выброса в сравнении с мышами, получавшими HBSS (показано красной линией). На ФИГ. 20В показано, что введение AAV9:PKP2 приводило к уменьшению дилатации ПЖ при еженедельной оценке по площади ПЖ, нормализованной к массе тела. На ФИГ. 20С показано, что через четыре недели после индукции тамоксифеном введение AAV9:PKP2 приводило к значительному уменьшению дилатации ЛЖ у мышей PKP2-сКО при измерении как по внутреннему размеру ЛЖ в конце диастолы (ВРЛЖд) (верхний график), так и по внутреннему размеру ЛЖ в конце систолы (ВРЛЖс) (нижний график), при нормировании обоих к массе тела. Планка погрешностей: SEM *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 против контроля.

[00170] Введение AAV9:PKP2 также приводило к значительному улучшению параметров ЭКГ у мышей PKP2-сКО. На ФИГ. 21А представлены иллюстративные необработанные кривые ЭКГ, демонстрирующие значительное улучшение электрофизиологических характеристик сердец мышей PKP2-сКО, получавших AAV9:PKP2. На ФИГ. 21В показано, что введение AAV9:PKP2 приводило к значительному улучшению отношения P/R (верхний график), интервала QT (центральный график) и интервала QRS (нижний график) в сравнении с результатами для мышей PKP2-сКО, получавших HBSS, показанными красными линиями.

[00171] Введение AAV9:PKP2 также приводило к значительному уменьшению тяжести аритмий у мышей PKP2-сКО. На ФИГ. 22А (вверху) представлена таблица градаций для классификации степени тяжести спонтанных аритмий в течение 30 минут регистрации у мышей PKP2-сКО под анестезией. Преждевременные желудочковые сокращения (ПЖС), преждевременные узловые комплексы (ПУЗ), АВ-блокада (атриовентрикулярная блокада), неустойчивая желудочковая тахикардия (НУЖТ), наджелудочковая тахикардия (НЖТ) и желудочковая фибрилляция. На ФИГ. 22А (внизу) представлены усредненные баллы, основанные на таблице градаций, которые показывают уменьшение тяжести аритмий у мышей PKP2-сКО, получавших AAV9:PKP2. На ФИГ. 22В показано распределение отдельных мышей в каждой группе лечения через четыре недели после индукции тамоксифеном. Введение AAV9:PKP2 приводило к снижению как частоты, так и тяжести, эпизодов аритмии, о чем свидетельствуют улучшенные показатели аритмии при сравнении с мышами PKP2-сКО, получавшими буфер HBSS, результаты для которых показаны красным столбиком.

Пример 6: Исследование эффективности генной терапии PKP2 с использованием AAV9:hPKP2 в модели АКМПЖ на мышах PKP2-сКО

[00172] Эффективность PKP2 человека в качестве мишени для генной терапии определяли в модели АКМПЖ на мышах PKP2-сКО. Всего в исследование было включено пять отдельных групп лечения. Животные во всех группах получали тамоксифен в течение трех последовательных дней. Группы были следующими: четыре мыши дикого типа, получавшие буфер HBSS; четыре мыши PKP2-сКО с АКМПЖ, получавшие буфер HBSS; четыре мыши PKP2-сКО с АКМПЖ, получавшие 1E13 гв/кг AAV9:PKP2 человека через одну неделю после индукции тамоксифеном; три мыши

РКР2-сКО с АКМПЖ, получавшие 3×10^3 гв/кг AAV9:РКР2 человека через одну неделю после индукции тамоксифеном и три мыши РКР2-сКО с АКМПЖ, получавшие 1×10^4 гв/кг AAV9:РКР2 человека через одну неделю после индукции тамоксифеном. До индукции тамоксифеном были собраны исходные показатели массы тела, эхокардиографии и ЭКГ. Все показатели после индукции тамоксифеном регистрировали еженедельно, включая эхокардиографию в В-режиме, М-режиме (ПЖ, ЛЖ), структуру (внутренние диаметры ЛЖ) и 30-мин ЭКГ, для количественной оценки аритмий и оценки электрофизиологических параметров. Ткани сердца при аутопсии собирали через четыре недели после индукции тамоксифеном. На ФИГ. 23 представлен дизайн эксперимента.

[00173] Введение AAV9:hРКР2 мышам РКР2-сКО продемонстрировало эффективность в уменьшении дилатации правого желудочка (ПЖ) и левого желудочка (ЛЖ) и в поддержании сердечной функции через четыре недели после индукции тамоксифеном. На ФИГ. 24А-24D представлены результаты этого анализа. Введение AAV9:hРКР2 предотвращало снижение процентной доли фракции выброса в сравнении с мышами, получавшими HBSS (ФИГ. 24А). Введение AAV9:hРКР2 приводило к уменьшению дилатации ПЖ при оценке по площади ПЖ, нормализованной к массе тела (ФИГ. 24В). Введение AAV9:hРКР2 приводило к значительному уменьшению дилатации ЛЖ у мышей РКР2-сКО при измерении как по внутреннему размеру ЛЖ в конце диастолы (ВРЛЖд) (Фиг. 24С), так и по внутреннему размеру ЛЖ в конце систолы (ВРЛЖс) (Фиг. 24D), оба из которых нормализованы к массе тела. Р-значение определяли с помощью t-критерия Стьюдента, планка погрешностей: SEM *P<0,05, **P<0,01 в сравнении с контролем.

[00174] Введение AAV9:hРКР2 вызывало значительное снижение через четыре недели после индукции тамоксифеном интервала QT (ФИГ. 25, верхняя панель), тенденцию к снижению отношения P/R (ФИГ. 25, центральная панель) и тенденцию к уменьшению тяжести аритмий (ФИГ. 25, нижняя панель) у мышей РКР2-сКО, в сравнении с мышами РКР2-сКО, получавшими HBSS. Р-значение определяли с помощью t-критерия Стьюдента, планка погрешностей: SEM *P<0,05 в сравнении с контролем. Из-за небольшого числа животных, включенных в это исследование, отношение P/R и показатель аритмии не достигли статистической значимости. Кроме того, одно животное в группе получения HBSS было гуманно умерщвлено примерно через 4 недели после индукции тамоксифеном после регистрации ЭКГ. Одно животное в группе дозы 1×10^3 было найдено мертвым перед проведением эхокардиографии. В целом, результаты данного исследования показывают, что оптимальная эффективная доза составляет 3×10^3 гв/кг.

[00175] Введение AAV9:hРКР2 мышам РКР2-сКО продемонстрировало эффективность в снижении экспрессии маркеров сердечной недостаточности, генов фиброза и ремоделирования ткани, как в правом желудочке (ФИГ. 26А), так и в левом желудочке (ФИГ. 26В), через четыре недели после индукции тамоксифеном. Уровни эндогенной и трансгенной мРНК РКР2 оценивали в сердцах у контрольных животных

дикого типа, РКР2-сКО и животных после трансдукции AAV9:hPKP2, соответственно. Маркерами сердечной недостаточности являются NРАА и NPPВ. Генами фиброза являются Col1a1 и Col3a1. Геном ремоделирования тканей является Timр1.

[00176] Введение AAV9:hPKP2 мышам РКР2-сКО продемонстрировало эффективность в уменьшении развития фиброза как в правом, так и в левом, желудочке через четыре недели после индукции тамоксифеном (ФИГ. 27А). Показано окрашивание мышц в красный цвет и трихромное окрашивание фиброза в синий цвет. Стрелками отмечены области со значительным фиброзом в сердце мышей РКР2-сКО. Результаты количественного определения коллагена представлены на ФИГ. 27В; видно, что введение AAV9:hPKP2 приводит к снижению уровня коллагена почти до контрольных уровней.

[00177] Введение AAV9:hPKP2 мышам РКР2-сКО продемонстрировало зависимость от дозы экспрессию трансгена РКР2 человека. Общий уровень экспрессии РКР2 и других белков десмосомы, DSP и PKG, оценивали как в растворимой (ФИГ. 28А), так и в нерастворимой (ФИГ. 28В), фракциях ткани ЛЖ через четыре недели после индукции тамоксифеном. В растворимых фракциях DSP не был обнаружен. Примечание: *Это животное было найдено мертвым до проведения эхокардиографии. **Интенсивность белка РКР2 нормализована к интенсивности тубулина на том же вестерн-блоте. Для простоты на ФИГ. 28А-В показан только один из двух блотов тубулина. РКР2 показан в виде двух полос, эндогенного РКР2 мышцы и более крупного РКР2 человека.

[00178] При том, что в настоящем документе были представлены и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены лишь в качестве примера. Для специалистов в данной области будут очевидны многочисленные вариации, изменения и замены без отклонения от сущности изобретения. Следует понимать, что могут быть использованы различные альтернативы вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Предполагается, что следующая далее формула изобретения определяет объем изобретения, и что ею охвачены способы и структуры в пределах объема этой формулы изобретения, а также их эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения сердечного заболевания или нарушения у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение композиции, содержащей вектор для генной терапии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид плакофиллин 2 (PKP2) или его фрагмент, функционально связанную с по меньшей мере одним промотором, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.
2. Способ по п. 1, где вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор.
3. Способ по п. 2, где вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса, аденовируса, лентивируса, поксвируса, вируса осповакцины и вируса герпеса.
4. Способ по п. 2 или п. 3, где вектор для генной терапии представляет собой аденоассоциированный вирус.
5. Способ по п. 4, где аденоассоциированный вирус выбран из группы, состоящей из AAV6, AAV8 и AAV9.
6. Способ по п. 5, где аденоассоциированный вирус представляет собой AAV9 или его производное.
7. Способ по п. 6, где AAV9 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 7.
8. Способ по любому из пунктов 1-7, где вектор для генной терапии нацелен на клетки в миокарде, эпикарде или в обоих.
9. Способ по любому из пунктов 1-8, где сердечное заболевание или нарушение представляет собой аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (АКМПЖ) или аритмогенную кардиомиопатию (АКМ).
10. Способ по любому из пунктов 1-9, где композицию вводят внутривенно, интракардиально, перикардиально или внутриаартериально.
11. Способ по любому из пунктов 1-10, где промотор представляет собой специфический для сердца промотор.
12. Способ по п. 11, где специфический для сердца промотор управляет экспрессией гена в миокарде, эпикарде или в обоих.
13. Способ по п. 11 или п. 12, где специфический для сердца промотор представляет собой промотор тропонина или промотор тяжелой цепи альфа миозина.
14. Способ по п. 13, где промотор тропонина имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3.
15. Способ по любому из пунктов 1-12, где промотор представляет собой промотор PKP2.
16. Способ по п. 15, где промотор PKP2 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4.
17. Способ по любому из пунктов 1-10, где промотор представляет собой конститутивный промотор.

18. Способ по п. 17, где конститутивный промотор представляет собой промотор бета-актина.

19. Способ по любому из пунктов 1-18, где вектор для генной терапии также содержит специфический для сердца энхансер.

20. Способ по любому из пунктов 1-19, где вектор для генной терапии также содержит 3'-элемент.

21. Способ по п. 20, где 3'-элемент включает посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH полиА) или их сочетание.

22. Способ по любому из пунктов 1-21, где нуклеиновая кислота, кодирующая ген РКР2, имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

23. Способ по любому из пунктов 1-22, где вектор для генной терапии содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 5.

24. Способ по любому из пунктов 1-23, где фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент включает буфер, полимер, соль или их сочетание.

25. Способ по любому из пунктов 1-24, который приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению по меньшей мере одного из: замещения фиброзно-жировой тканью; атрофии миокарда; преобладающей дилатации правого желудочка; желудочковых аритмий; внезапной остановки сердца или сердечных явлений, вызванных физической нагрузкой.

26. Способ по п. 25, который приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению замещения фиброзно-жировой тканью в миокарде, эпикарде или обоих.

27. Способ по любому из пунктов 1-26, который приводит к восстановлению структуры и/или функции десмосомы.

28. Способ по любому из пунктов 1-27, который приводит к восстановлению уровней белка и активности РКР2.

29. Способ по любому из пунктов 1-28, который приводит к восстановлению индуцированной экспрессии гена РКР2.

30. Способ по любому из пунктов 1-30, который приводит к восстановлению экспрессии одного или более из генов риадинового рецептора 2 (Ryr2), анкирина В (Ank2), Casna1c (CaV1.2), триадины (Trdn) или кальсеквестрина-2 (Casq2).

31. Способ по любому из пунктов 1-30, где индивидуум идентифицирован как имеющий по меньшей мере одну вариацию белка десмосомы.

32. Способ по п. 31, где белок десмосомы представляет собой РКР2.

33. Способ по п. 32, где вариация включает делецию, вставку, вариацию одного нуклеотида или вариацию количества копий.

34. Вектор для генной терапии, содержащий ген плакофиллина 2, функционально связанный с по меньшей мере одним промотором.

35. Вектор для генной терапии по п. 34, который представляет собой вирусный вектор.

36. Вектор для генной терапии по п. 35, который выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса, аденовируса, лентивируса, поксвируса, вируса осповакцины и вируса герпеса.

37. Вектор для генной терапии по п. 35 или п. 36, который представляет собой аденоассоциированный вирус.

38. Вектор для генной терапии по п. 37, где аденоассоциированный вирус выбран из группы, состоящей из AAV6, AAV8 и AAV9.

39. Вектор для генной терапии по п. 38, где аденоассоциированный вирус представляет собой AAV9 или его производное.

40. Вектор для генной терапии по п. 39, где AAV9 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 7.

41. Вектор для генной терапии по любому из пунктов 34-40, который нацелен на клетки в миокарде, эпикарде или обоих.

42. Вектор для генной терапии по любому из пунктов 34-41, где промотор представляет собой специфический для сердца промотор.

43. Вектор для генной терапии по п. 42, где специфический для сердца промотор управляет экспрессией гена в миокарде, эпикарде или обоих.

44. Вектор для генной терапии по п. 42 или п. 43, где специфический для сердца промотор представляет собой промотор тропонина или промотор тяжелой цепи альфа миозина.

45. Вектор для генной терапии по п. 43, где промотор тропонина имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3.

46. Вектор для генной терапии по любому из пунктов 34-45, где промотор представляет собой промотор РКР2.

47. Вектор для генной терапии по п. 46, где промотор РКР2 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4.

48. Вектор для генной терапии по любому из пунктов 34-41, где промотор представляет собой конститутивный промотор.

49. Вектор для генной терапии по п. 48, где конститутивный промотор представляет собой промотор бета-актина.

50. Вектор для генной терапии по любому из пунктов 34-49, дополнительно содержащий специфический для сердца энхансер.

51. Вектор для генной терапии по любому из пунктов 34-50, который дополнительно содержит 3'-элемент.

52. Вектор для генной терапии по п. 51, где 3'-элемент включает посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH полиА) или их

сочетание.

53. Вектор для генной терапии по любому из пунктов 34-52, где нуклеиновая кислота, кодирующая ген PKP2, имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

54. Вектор для генной терапии по любому из пунктов 34-53, который содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 5.

55. Вектор для генной терапии по любому из пунктов 34-54, который сформулирован в фармацевтически приемлемом носителе или эксципиенте, включающем буфер, полимер, соль или их сочетание.

56. Способ лечения сердечного заболевания или нарушения у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение композиции, содержащей (а) вектор для генной терапии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид плакофиллин 2 (PKP2) или его фрагмент, функционально связанную с промотором и 3'-элементом; и (b) фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

57. Способ по п. 56, где вектор для генной терапии представляет собой вирусный вектор, выбранный из группы, состоящей из аденоассоциированного вируса, аденовируса, лентивируса, поксвируса, вируса осповакцины и вируса герпеса.

58. Способ по п. 56, где вектор для генной терапии представляет собой аденоассоциированный вирус.

59. Способ по п. 58, где аденоассоциированный вирус выбран из группы, состоящей из AAV6, AAV8 и AAV9.

60. Способ по п. 59, где аденоассоциированный вирус нацелен на клетки в миокарде, эпикарде или обоих.

61. Способ по п. 59, где аденоассоциированный вирус представляет собой AAV9, содержащий нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 7.

62. Способ по п. 56, где сердечное заболевание или нарушение представляет собой аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (АКМПЖ) или аритмогенную кардиомиопатию (АКМ).

63. Способ по п. 56, где промотор представляет собой промотор, который вызывает экспрессию в тканях, включая сердце, или специфический для сердца промотор.

64. Способ по п. 63, где специфический для сердца промотор управляет экспрессией гена в миокарде, эпикарде или обоих.

65. Способ по п. 63, где специфический для сердца промотор представляет собой промотор PKP2, промотор тропонина или промотор тяжелой цепи альфа миозина.

66. Способ по п. 65, где промотор PKP2 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 4.

67. Способ по п. 65, где промотор тропонина имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 3.

68. Способ по п. 56, где 3'-элемент включает посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH полиА) или их сочетание.

69. Способ по п. 56, где вектор для генной терапии также содержит специфический для сердца энхансер.

70. Способ по п. 56, где нуклеиновая кислота, кодирующая ген РКР2, имеет последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

71. Способ по п. 56, где вектор для генной терапии содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 5.

72. Способ по п. 56, где нуклеиновая кислота имеет размер, меньший или равный примерно 4,7 т.п.н.

73. Способ по п. 56, где фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент включает буфер, полимер, соль или их сочетание.

74. Способ по п. 56, который приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению по меньшей мере одного из: замещения фиброзно-жировой тканью; атрофии миокарда; преобладающей дилатации правого желудочка; желудочковых аритмий; внезапной остановки сердца; сердечных явлений, вызванных физической нагрузкой; кардиомиопатии, дилатации или сердечной недостаточности правого желудочка; кардиомиопатии, дилатации или сердечной недостаточности левого желудочка; предсердных аритмий; обморока; сердцебиения; одышки или боли в груди.

75. Способ по п. 74, который приводит к обращению вспять, уменьшению или предотвращению замещения фиброзно-жировой тканью в миокарде, эпикарде или обоих.

76. Способ по п. 56, который приводит к восстановлению структуры и/или функции десмосомы.

77. Способ по п. 56, который приводит к восстановлению экспрессии мРНК РКР2 и/или уровней белка и активности РКР2.

78. Способ по п. 56, который приводит к восстановлению экспрессии одного или более генов, оказывающих прямое или косвенное влияние на один или более симптомов сердечного заболевания.

79. Способ по п. 78, где ген включает один или более из генов риадинового рецептора 2 (Ryr2), анкирина В (Ank2), Casn1c (CaV1.2), триадины (Trdn) или кальсеквестрина-2 (Casq2).

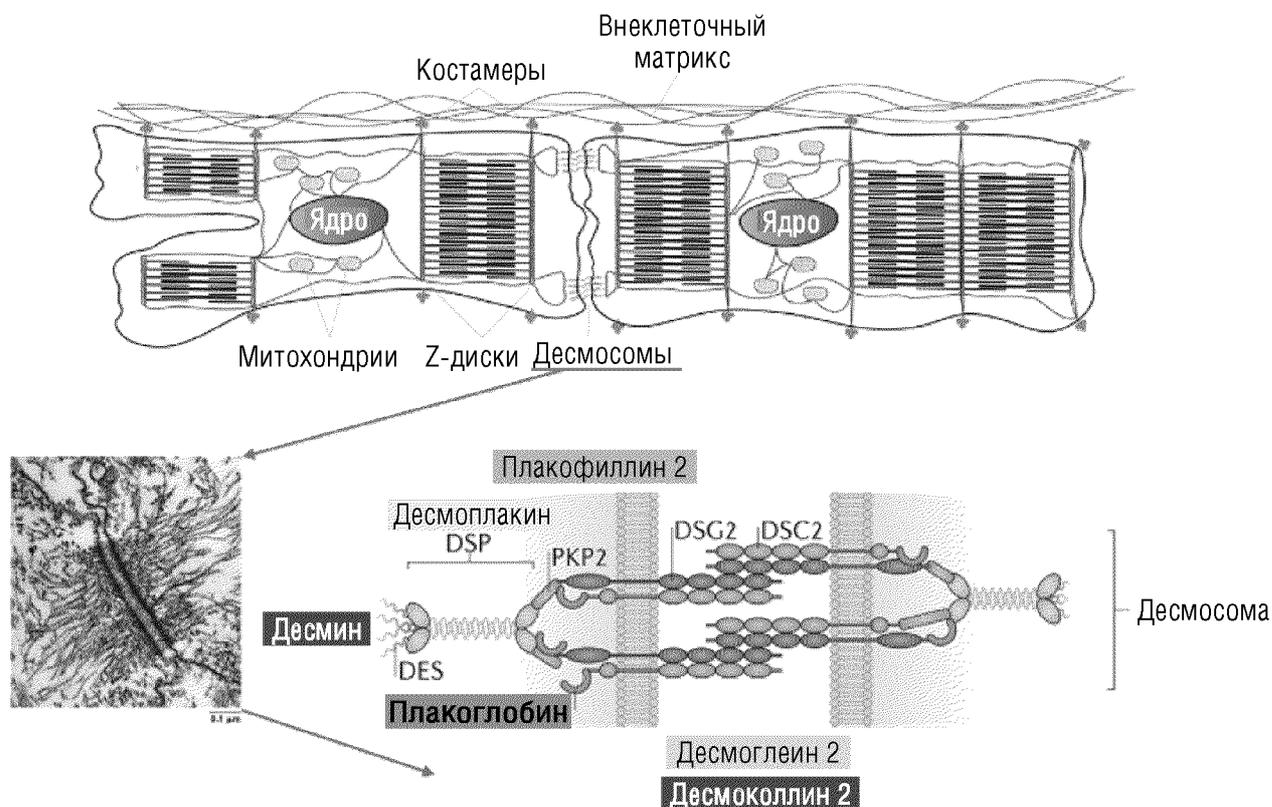
80. Способ по п. 56, где индивидуум идентифицирован как имеющий по меньшей мере одну вариацию белка десмосомы.

81. Способ по п. 80, где белок десмосомы представляет собой РКР2.

82. Способ по п. 81, где вариация включает делецию, вставку, вариацию одного нуклеотида или вариацию количества копий.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2

Дилатация и систолические/диастолические дефекты

- В основном поражают правый желудочек, но могут быть и двухжелудочковыми
 - Модель на мышцах сКО, характеризующаяся двухжелудочковой дилатацией и облегчающая изучение данных трансгена AAV
- Нарушенная опосредованная саркомерами генерация напряжения, сниженное межклеточное взаимодействие из-за ухудшения качества десмосом
 - Нарушение регуляции генов саркомеров влияет на качество саркомеров
 - Нарушение регуляции генов Ca^{2+} и Na^+ каналов влияет на электрическое соединение
- Гибель клеток
 - Атрофия миокарда
- Дедифференциация кардиомиоцитов или инфильтрация вследствие гибели кардиомиоцитов
 - Нарушение регуляции генов липогенеза и фиброза

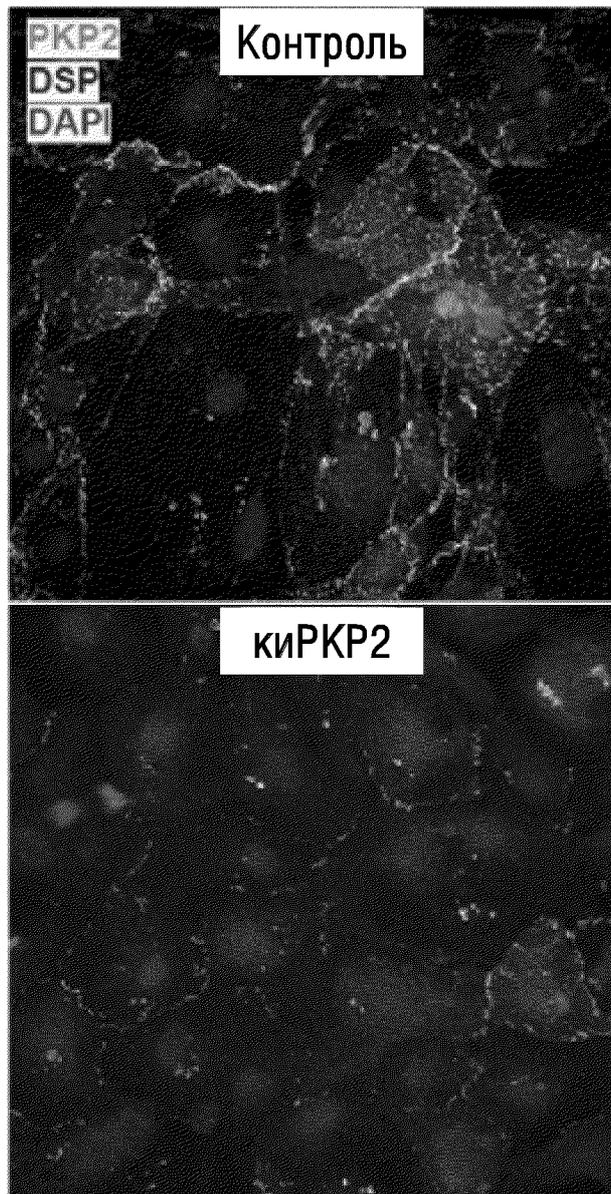
Аритмии, задержки проводимости, электрическая нестабильность

- Нарушение гомеостаза Ca^{2+} и другие дефекты ионных каналов
 - Мышиная модель РКР2 сКО имеет фенотип аритмии из-за неправильного гомеостаза Ca^{2+}
- Уменьшение количества белка ЩК коннексина 43
- Фиброзно-жировая ткань, приводящая к дефектам проводимости
 - Экспрессия генов липогенеза и фиброза в ИПСКМ

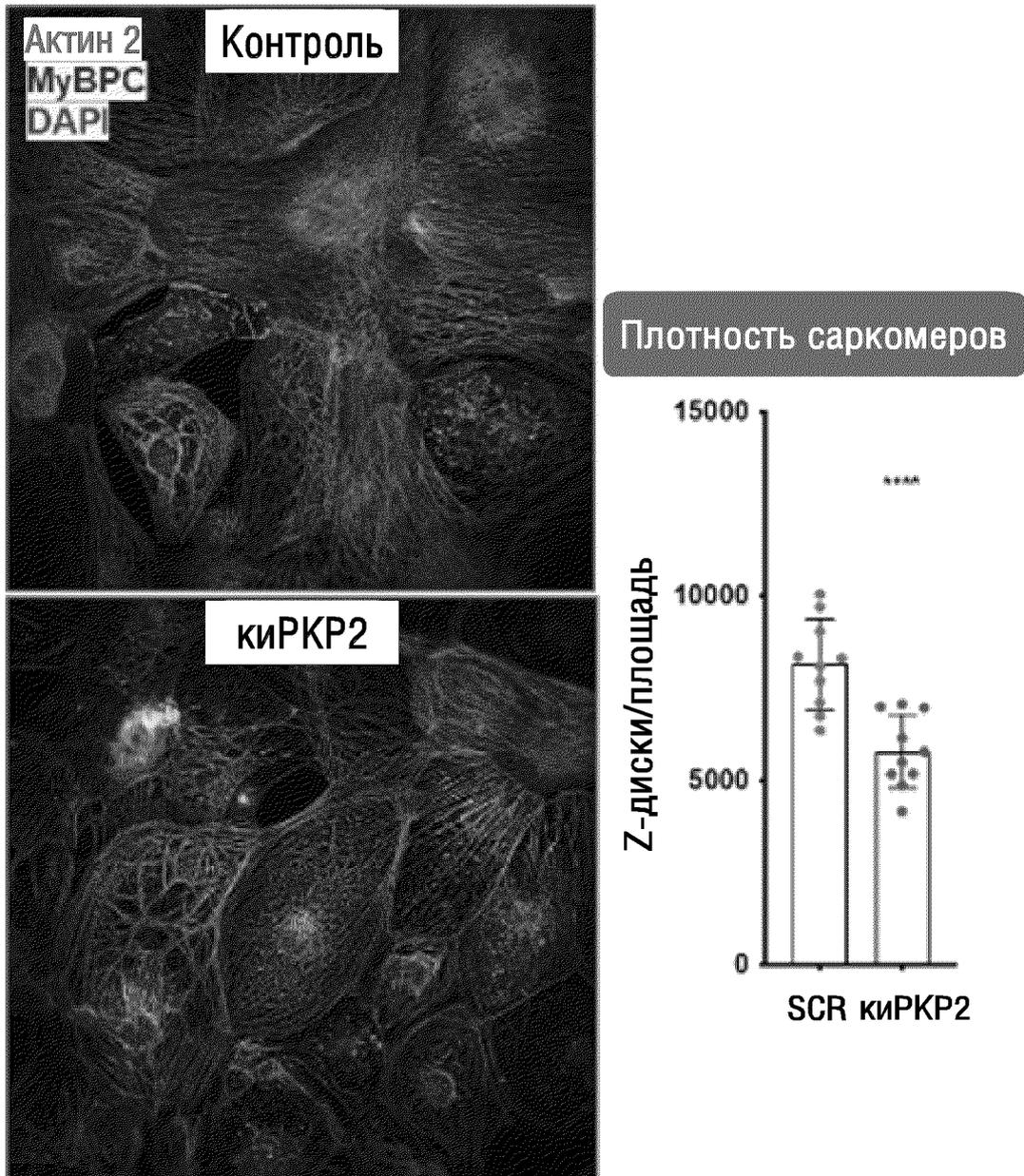
Замещение фиброзно-жировой тканью

- Липогенез в длительно культивируемых ИПСКМ, полученных от пациентов
- Мышь РКР2 сКО имеет только фиброзный фенотип

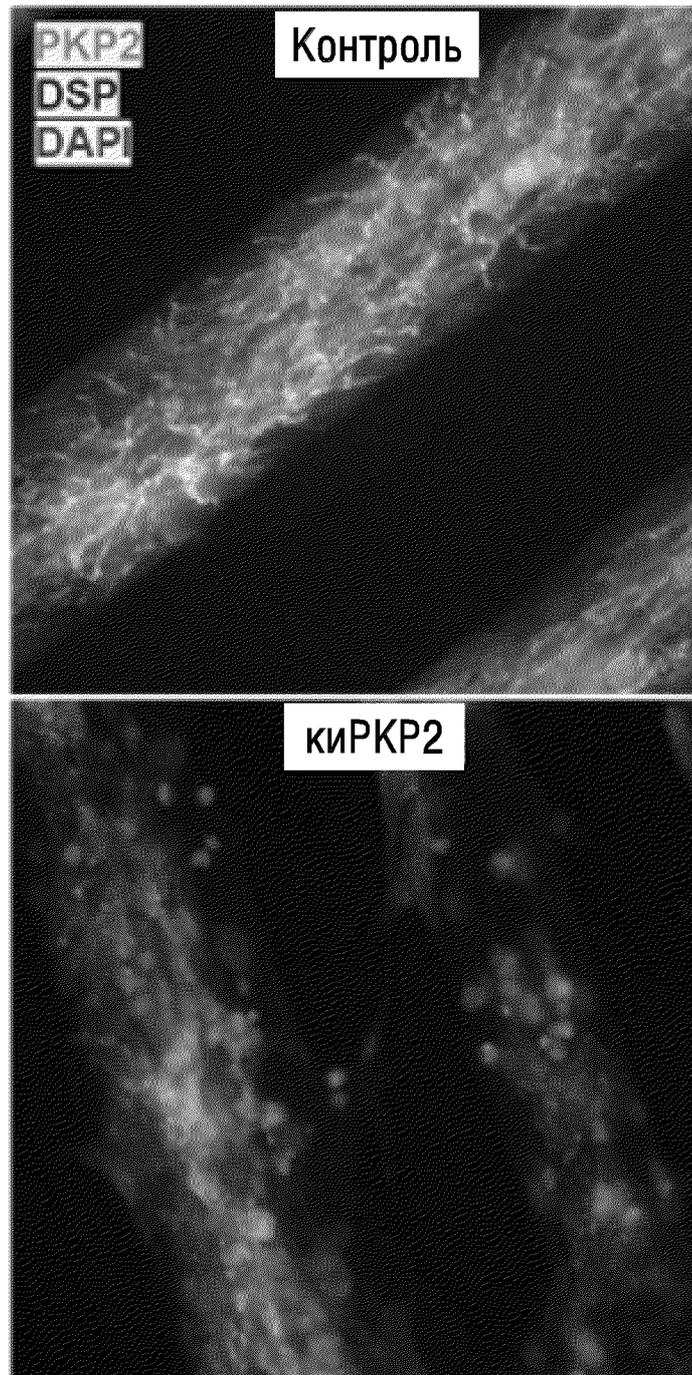
ФИГ.3А



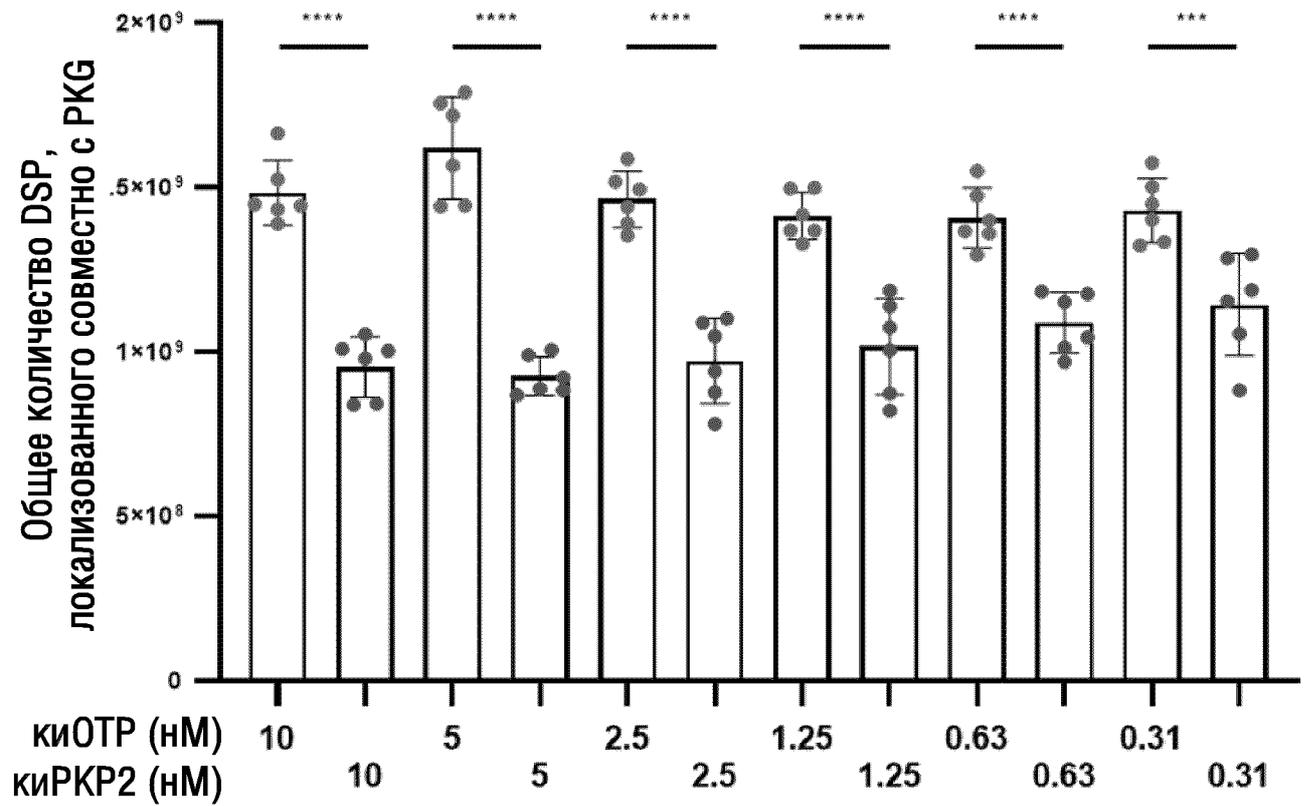
ФИГ.3В



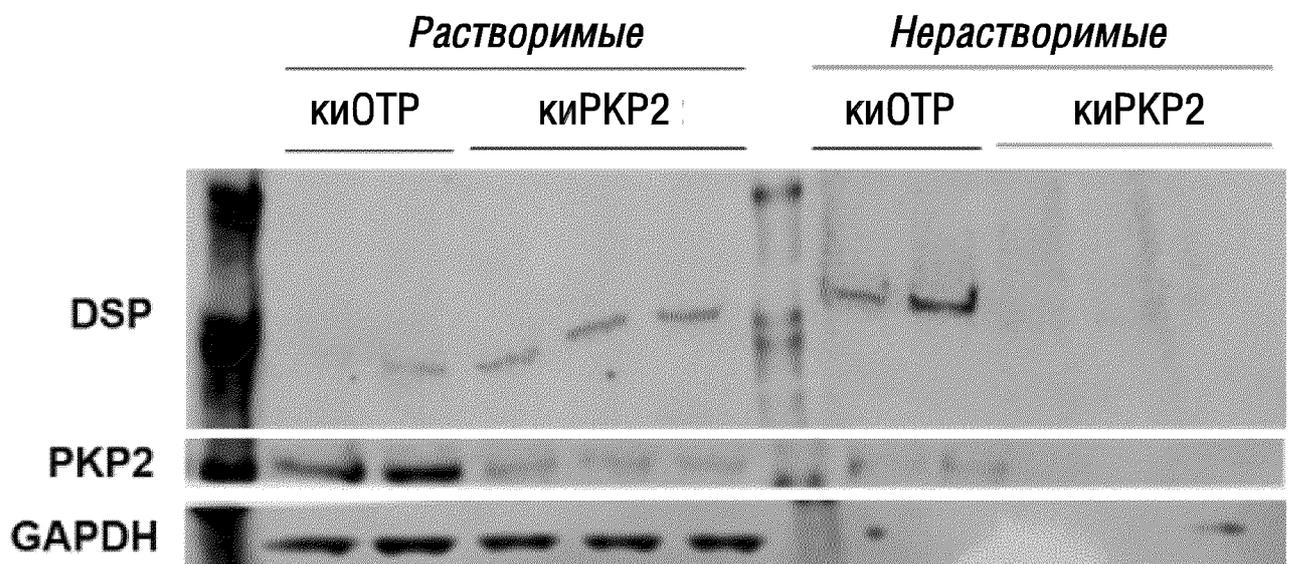
ФИГ.3С



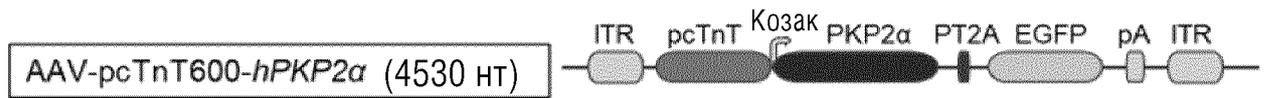
ФИГ.4



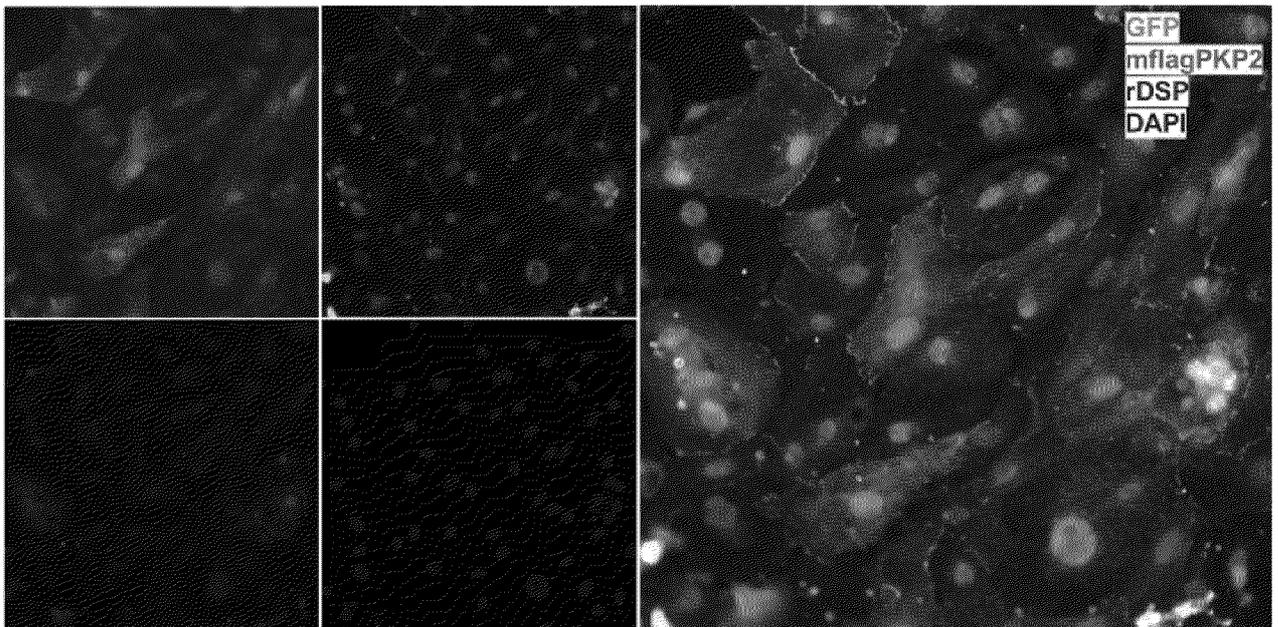
ФИГ.5



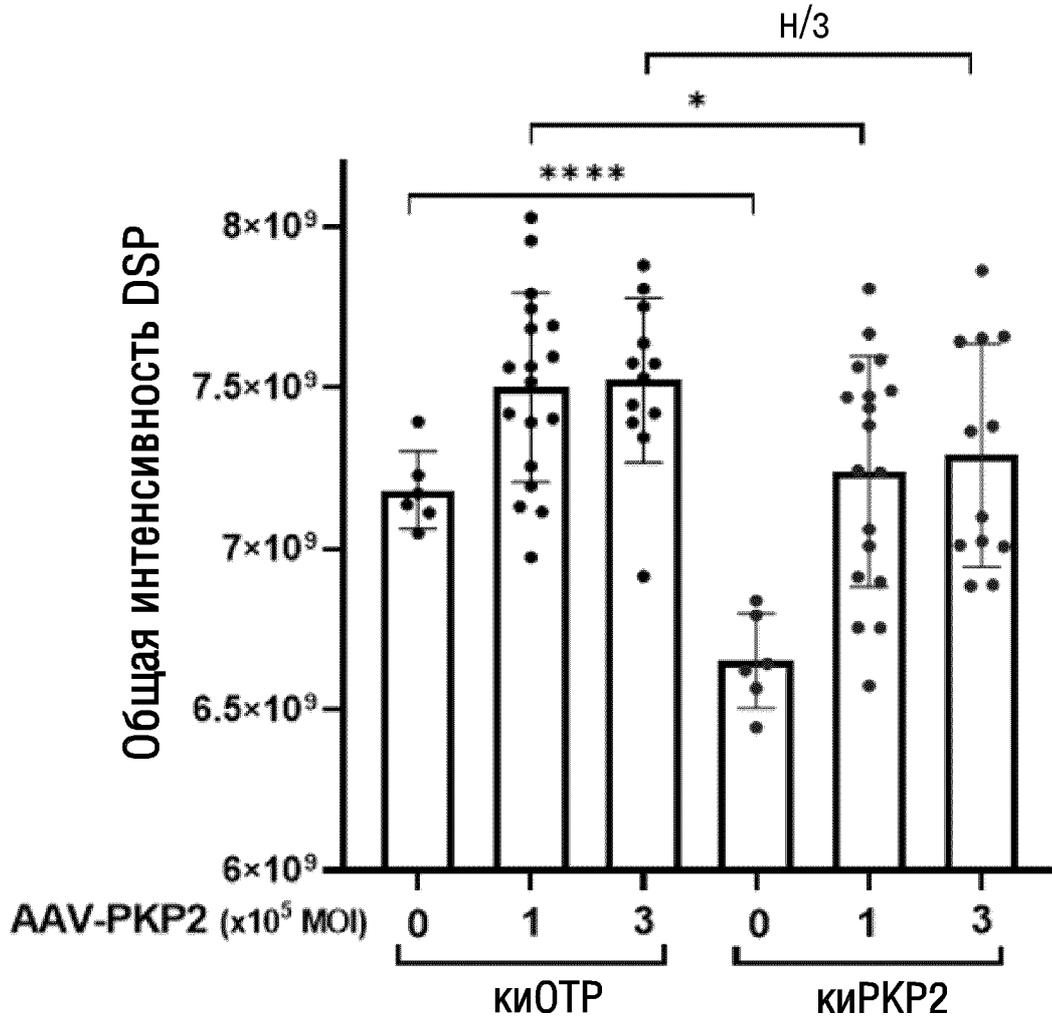
ФИГ.6А



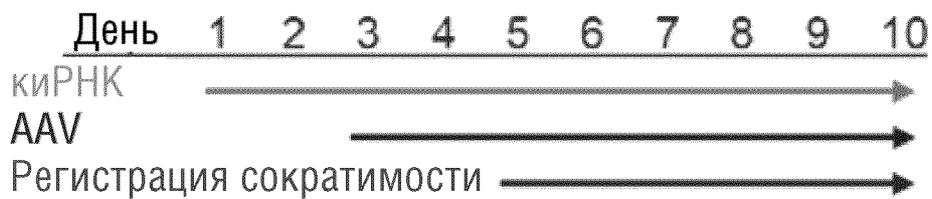
ФИГ.6В



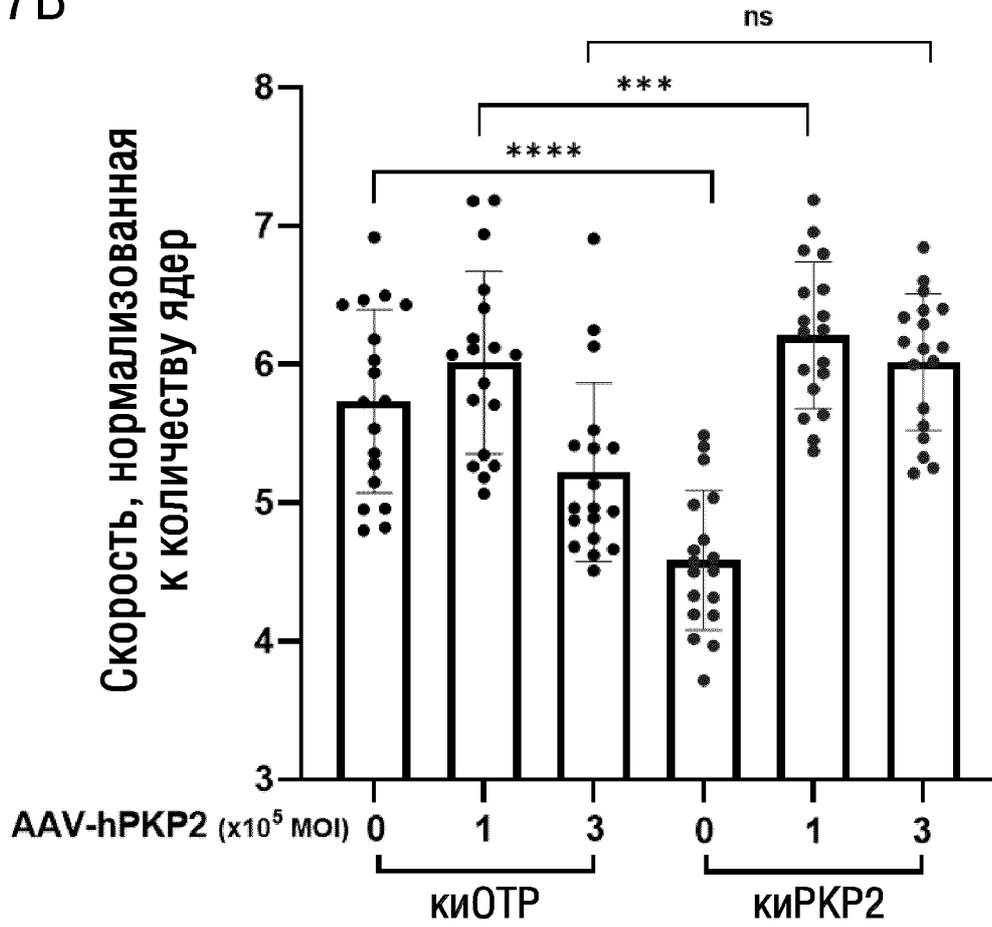
ФИГ.6С



ФИГ.7А

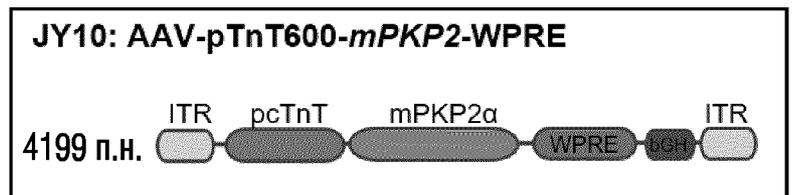
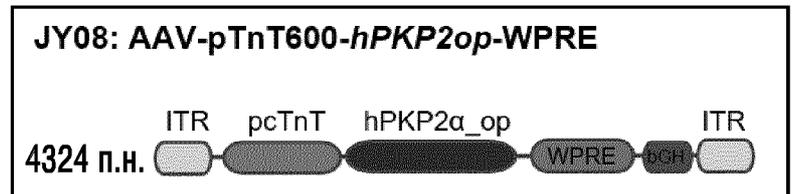


ФИГ.7В

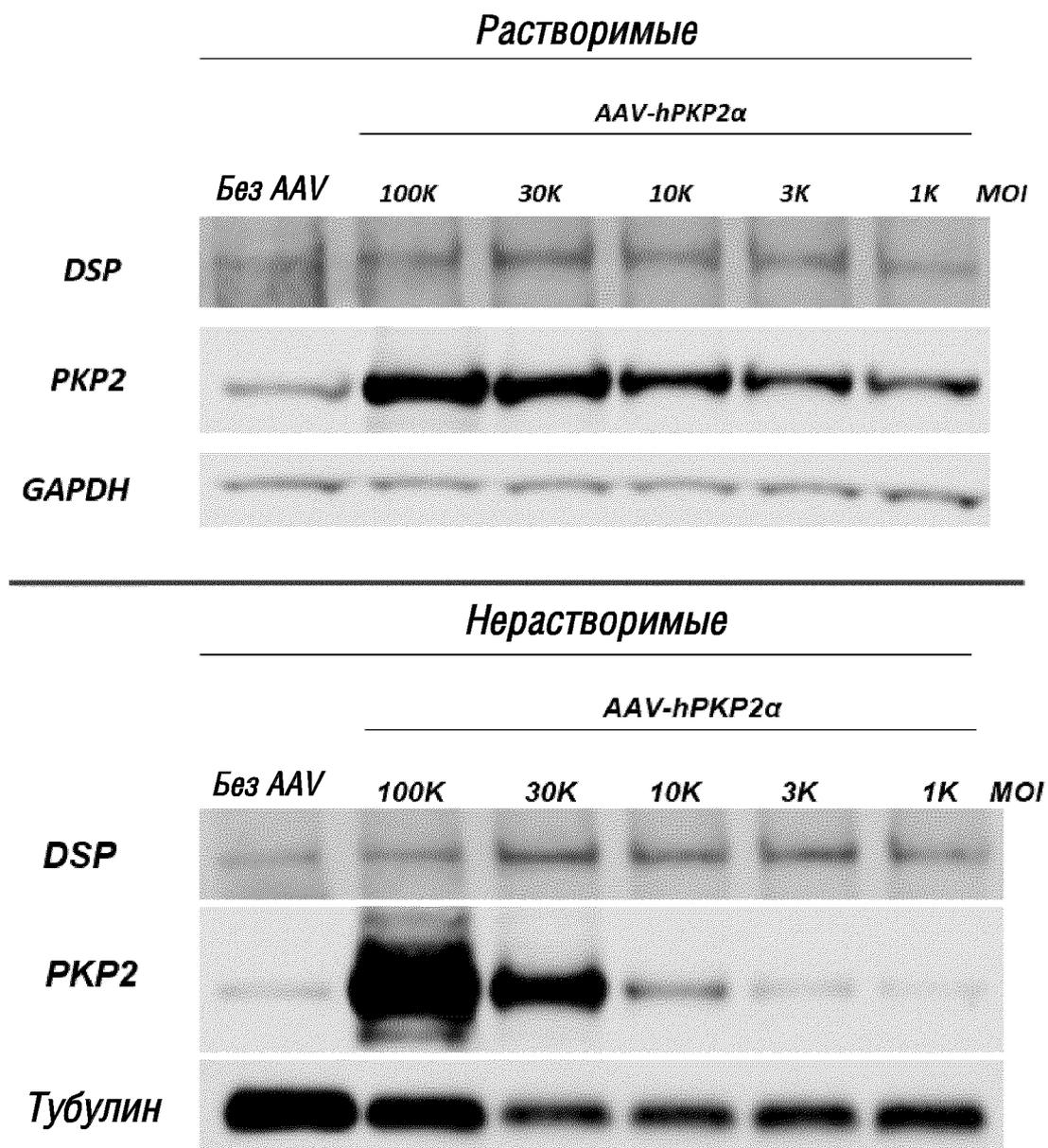


ФИГ.8

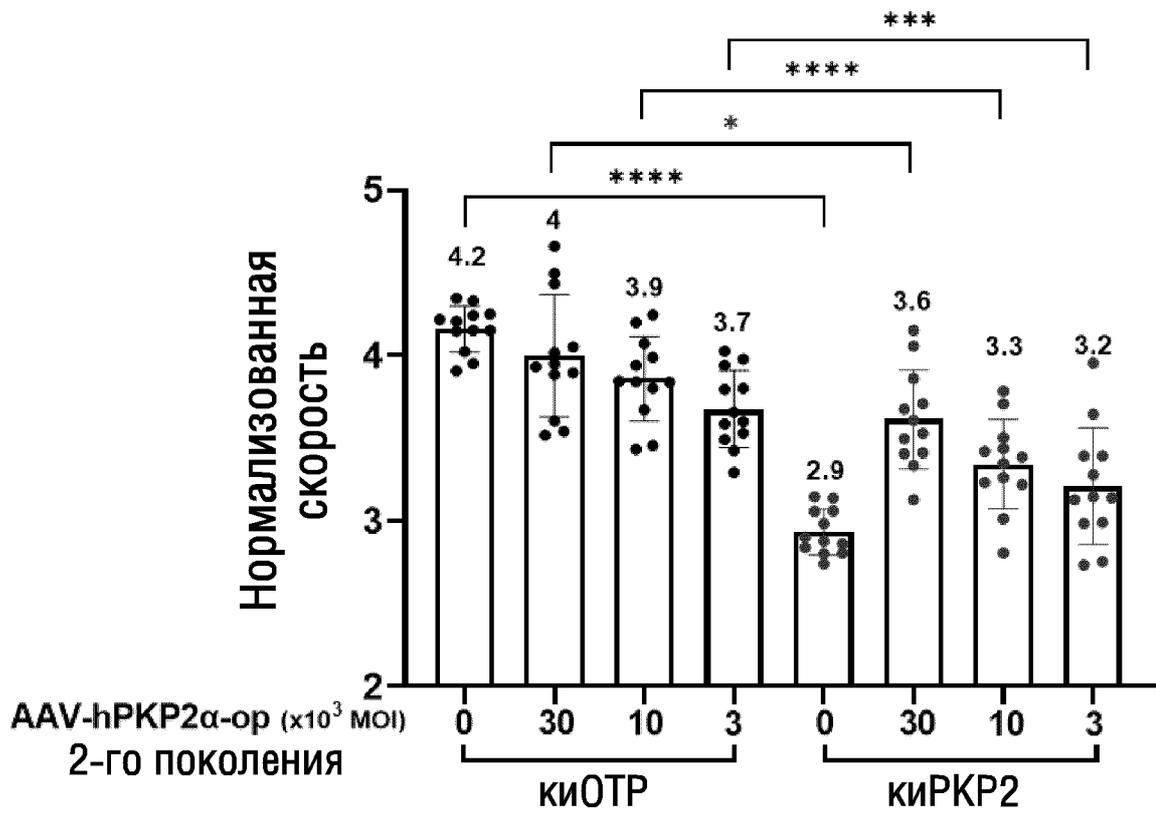
Элементы кассеты AAV	Размер (нт)
ITR	260
промотор cTnT	600
hPKP2 α _op	2514
mPKP2 α	2387
WPRE	540
bGH поли(A)	215



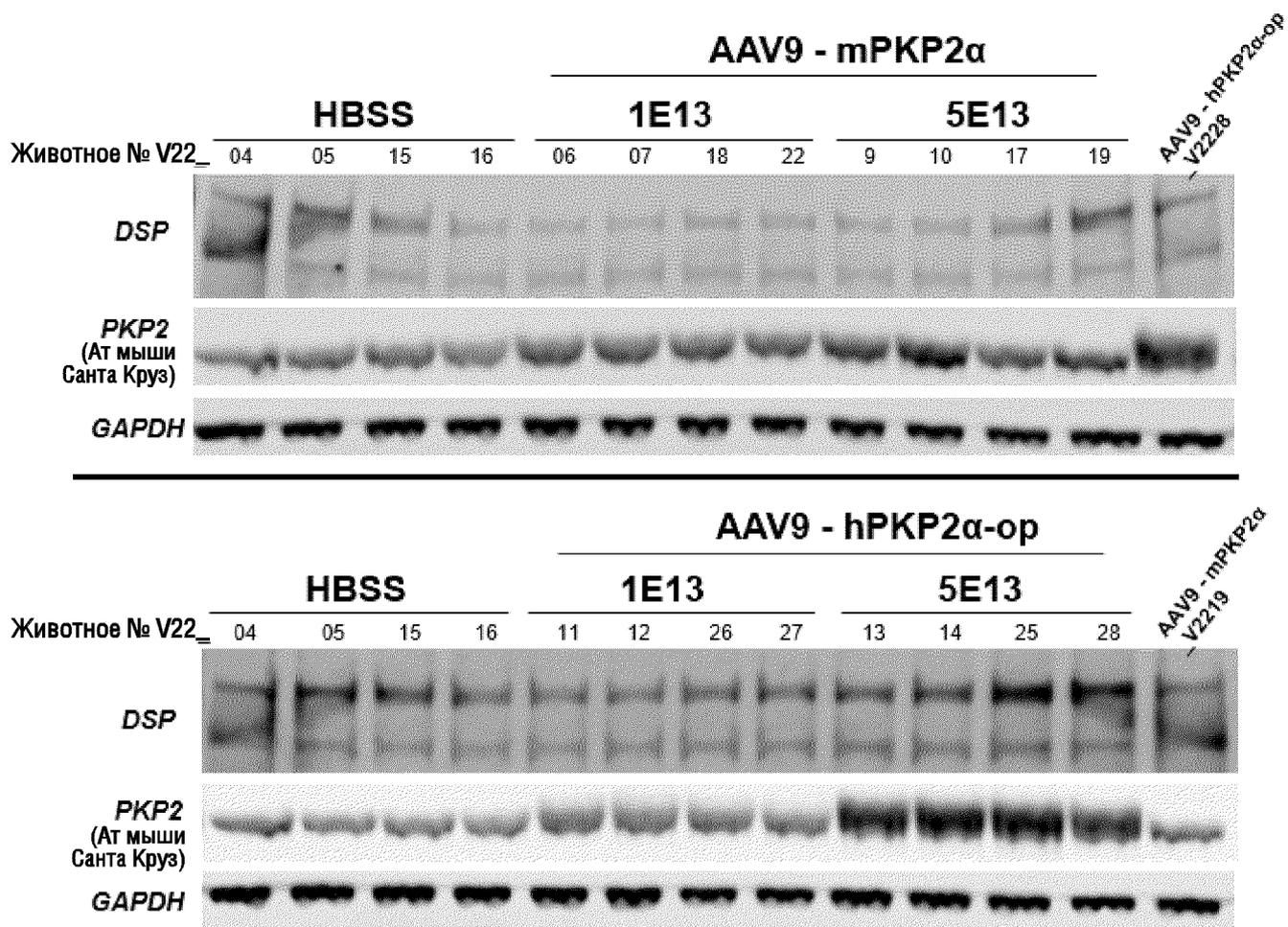
ФИГ.9А



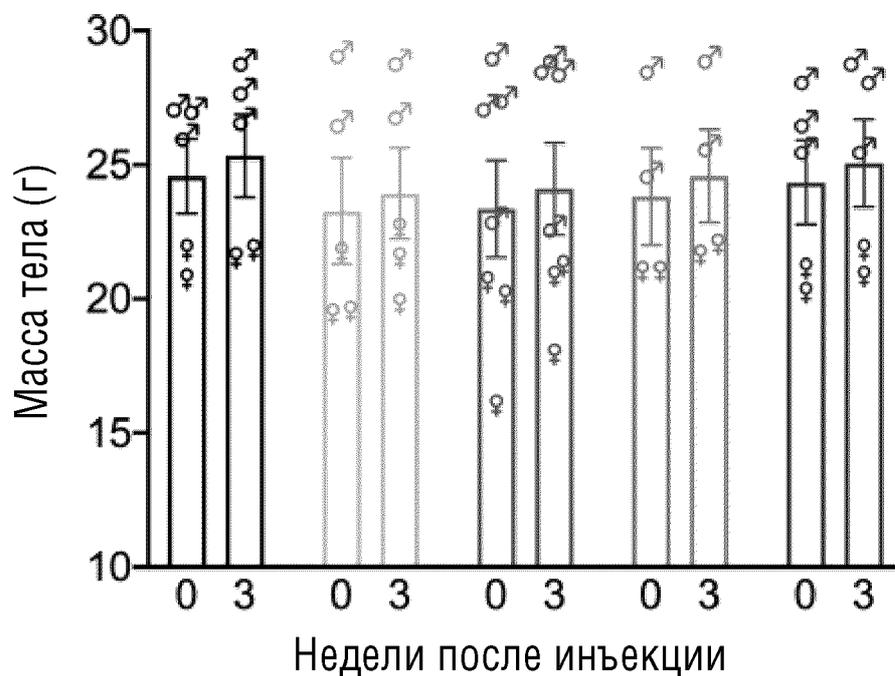
ФИГ.9В



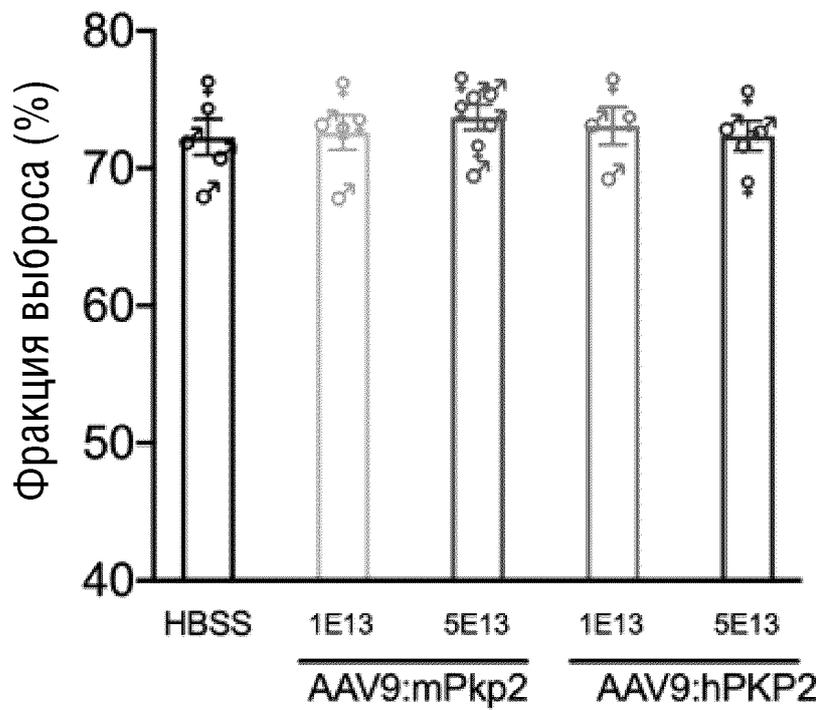
ФИГ.10



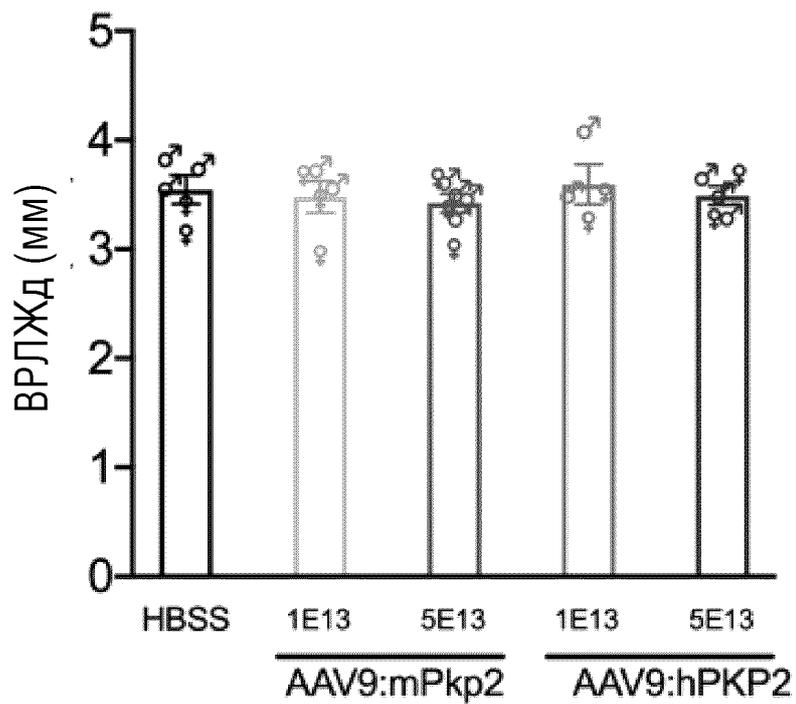
ФИГ.11А



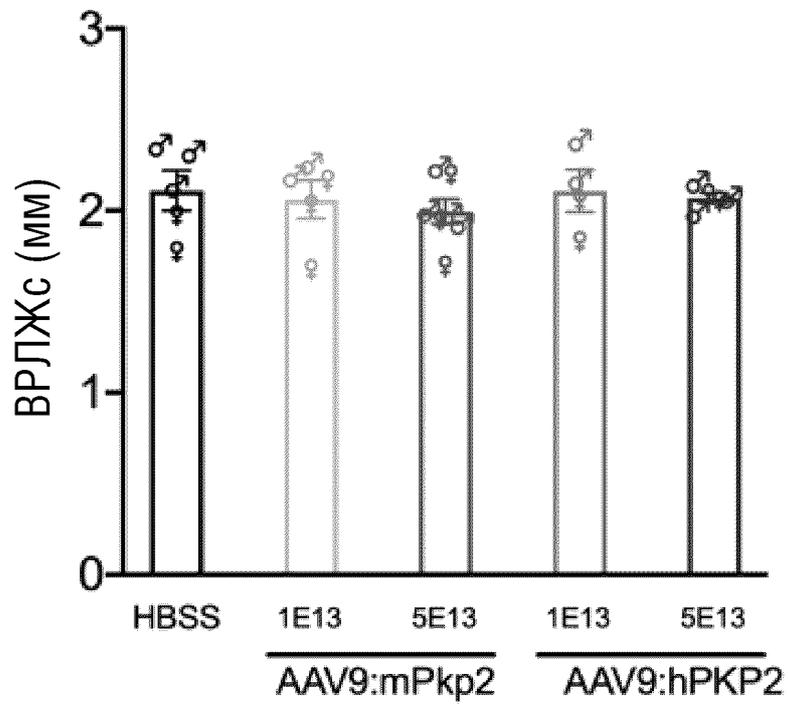
ФИГ.11В



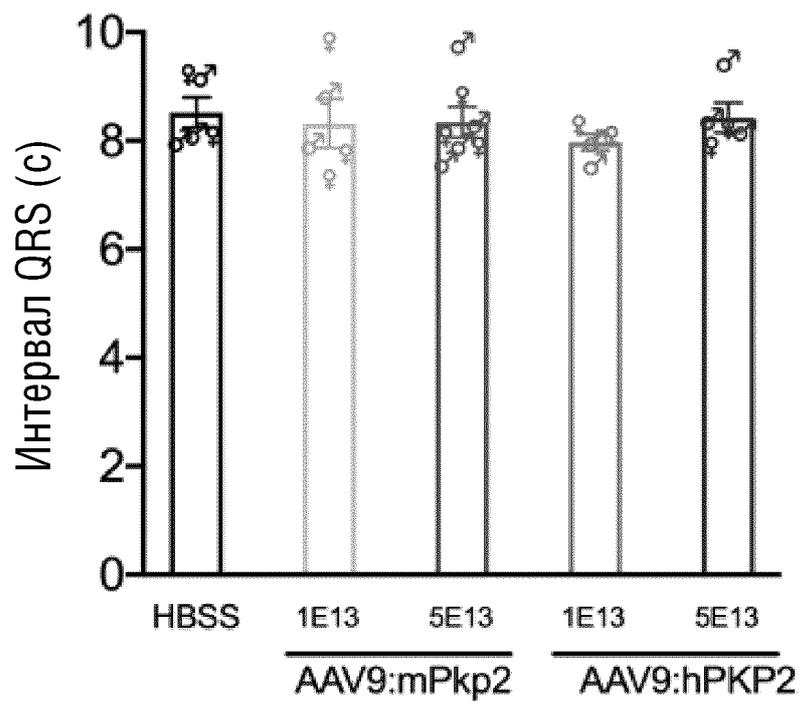
ФИГ.11С



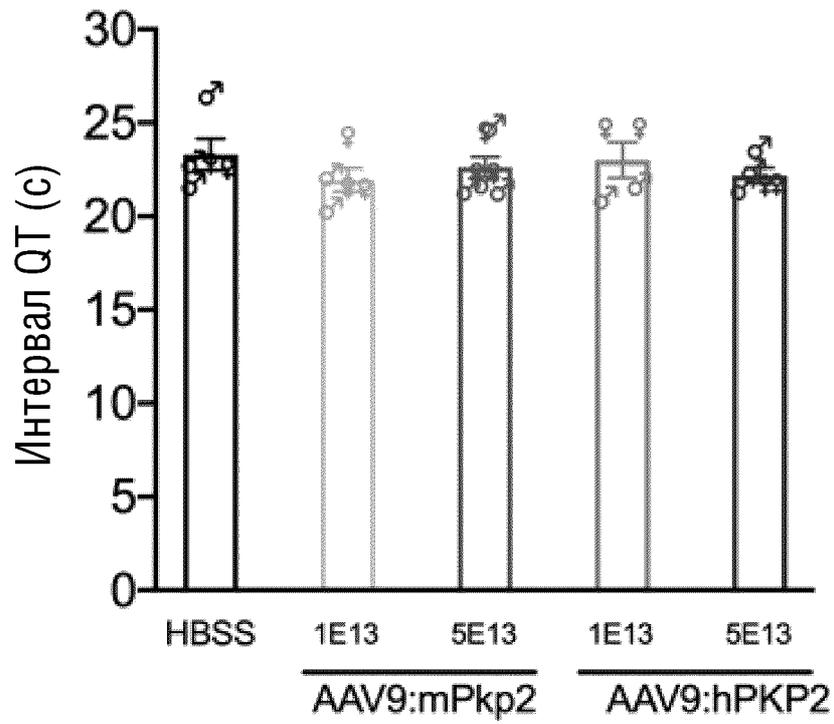
ФИГ.11D



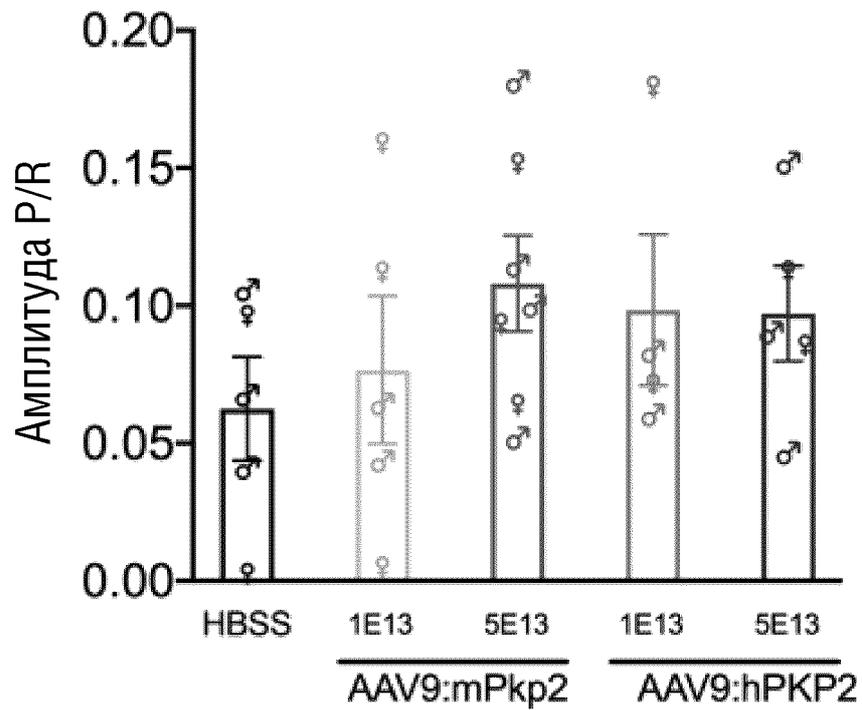
ФИГ.11E



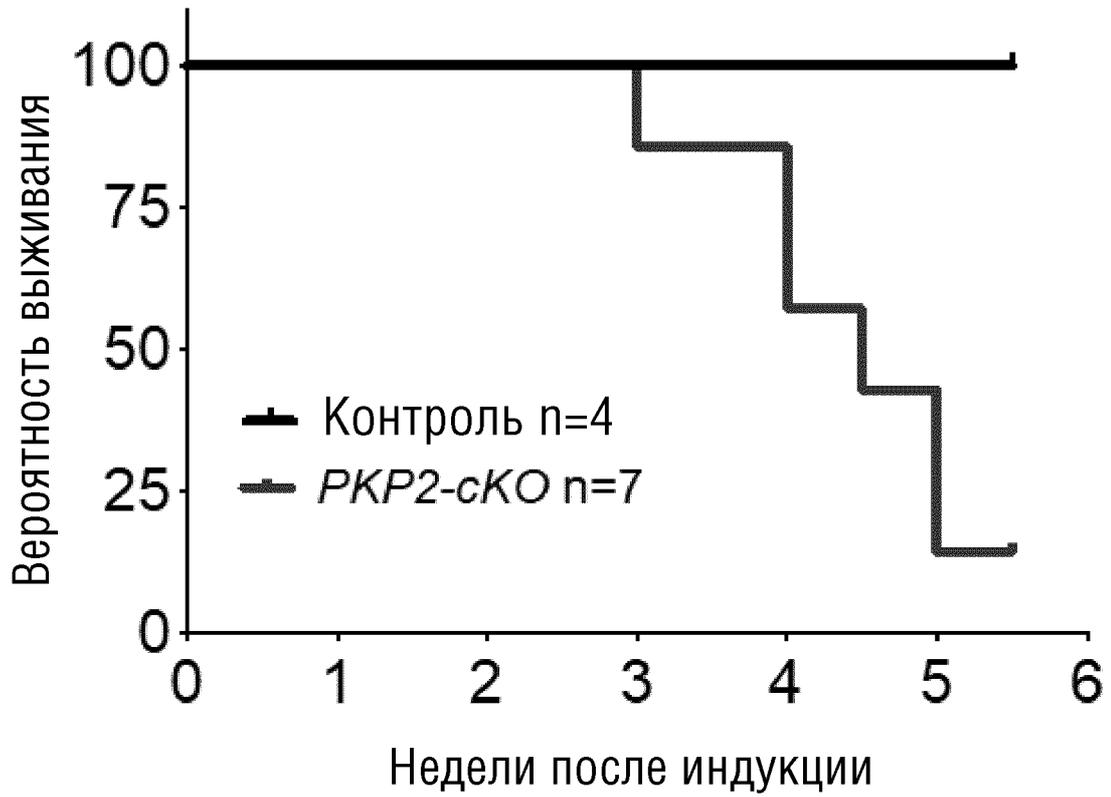
ФИГ.11F



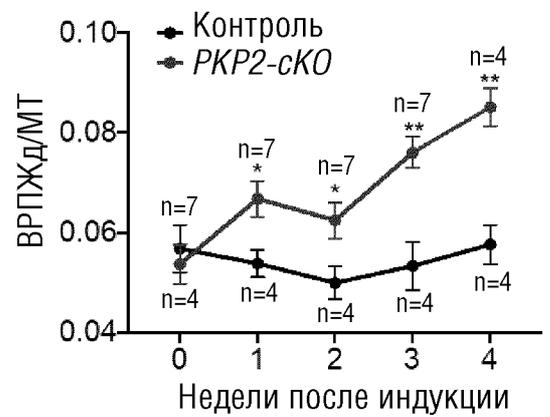
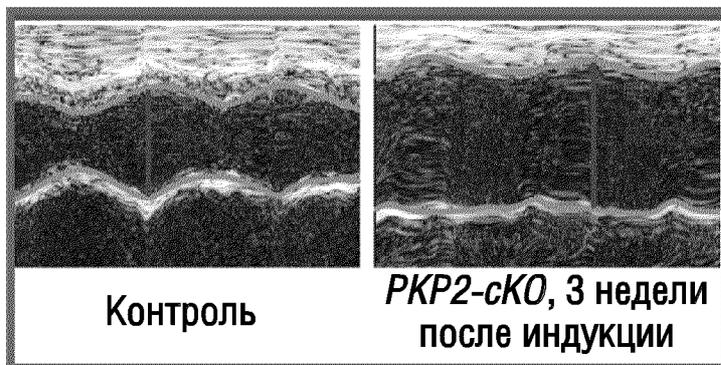
ФИГ.11G



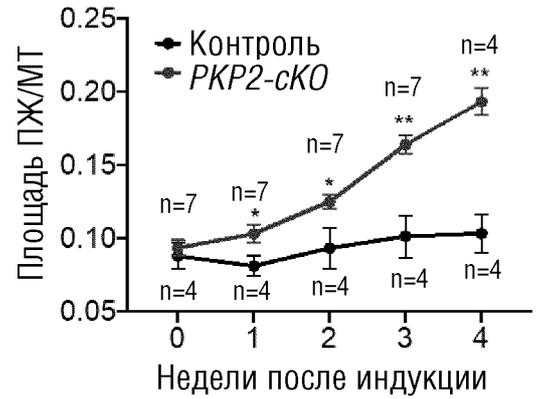
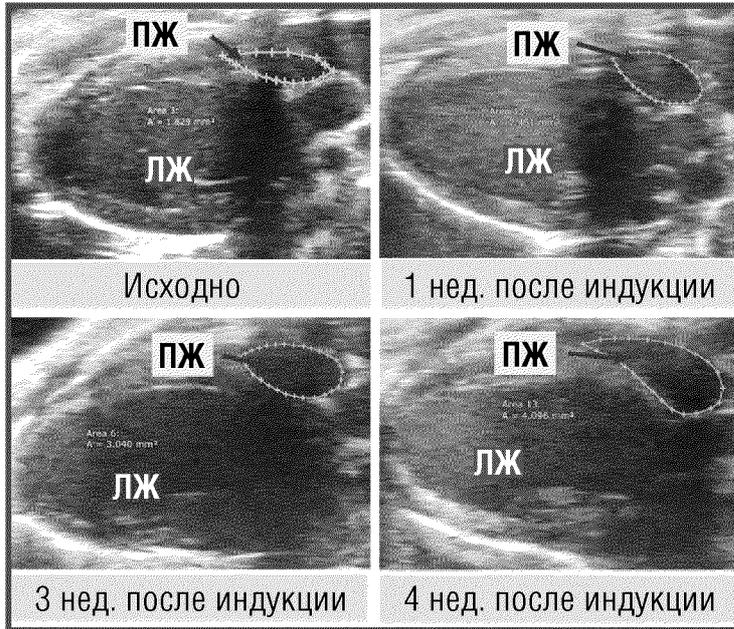
ФИГ.12



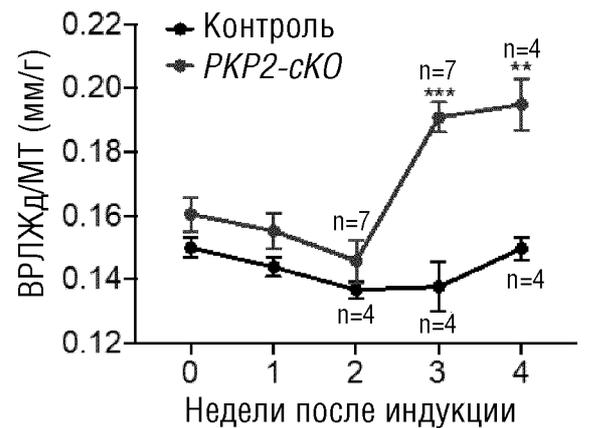
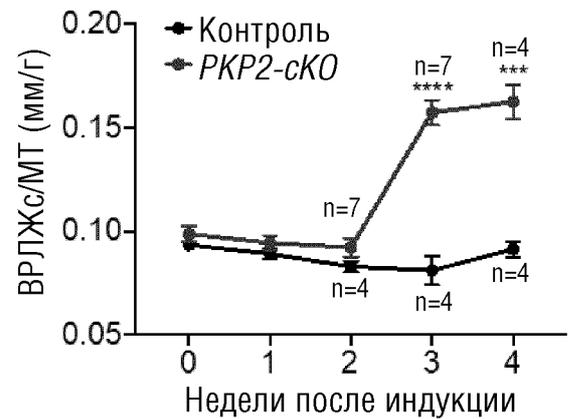
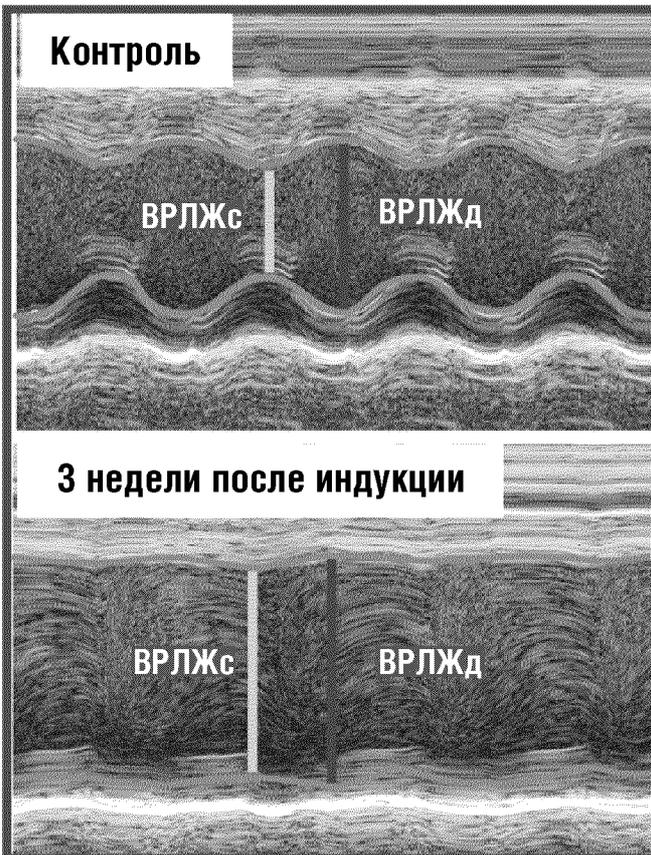
ФИГ.13А



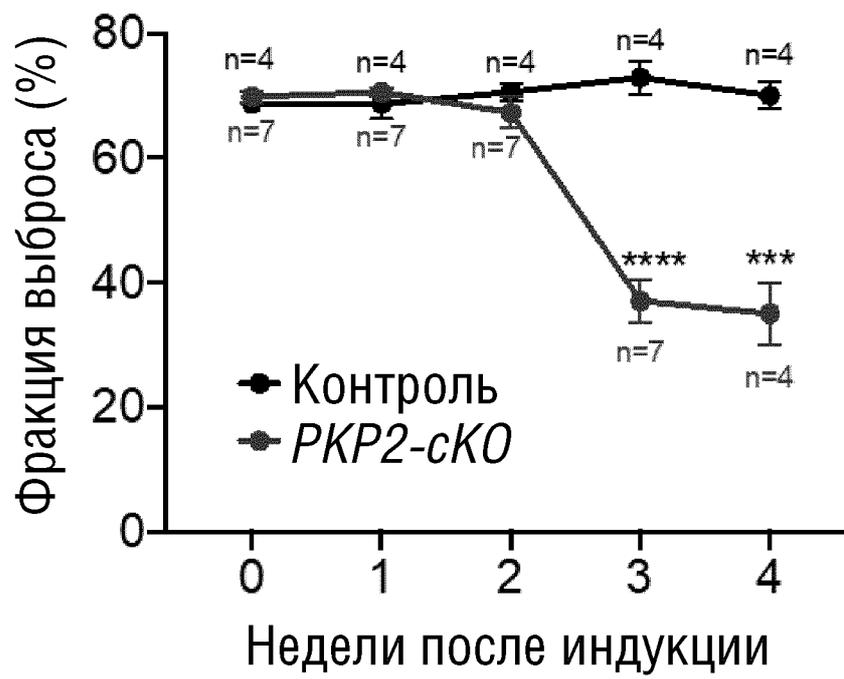
ФИГ.13В



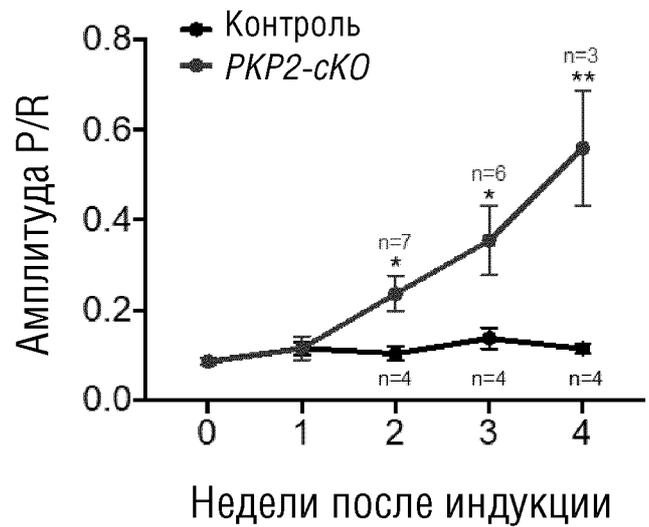
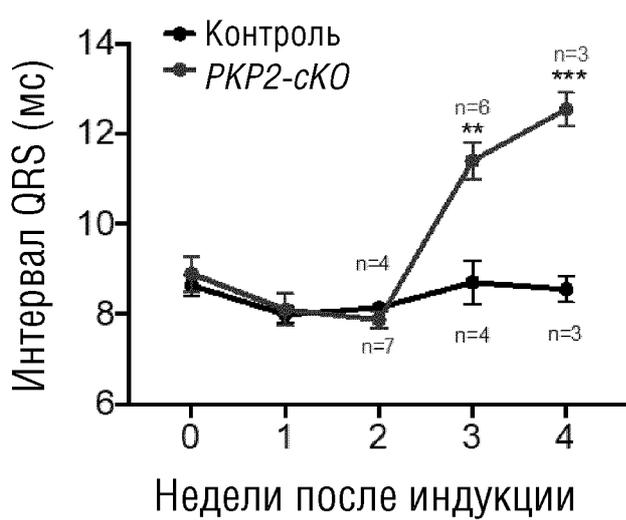
ФИГ.14А



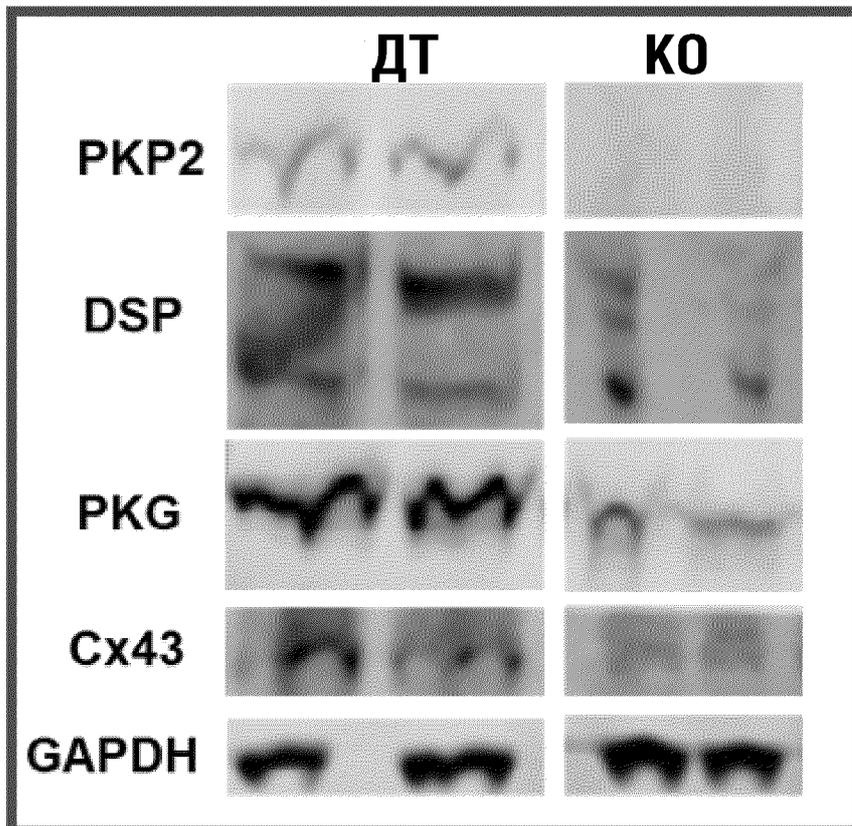
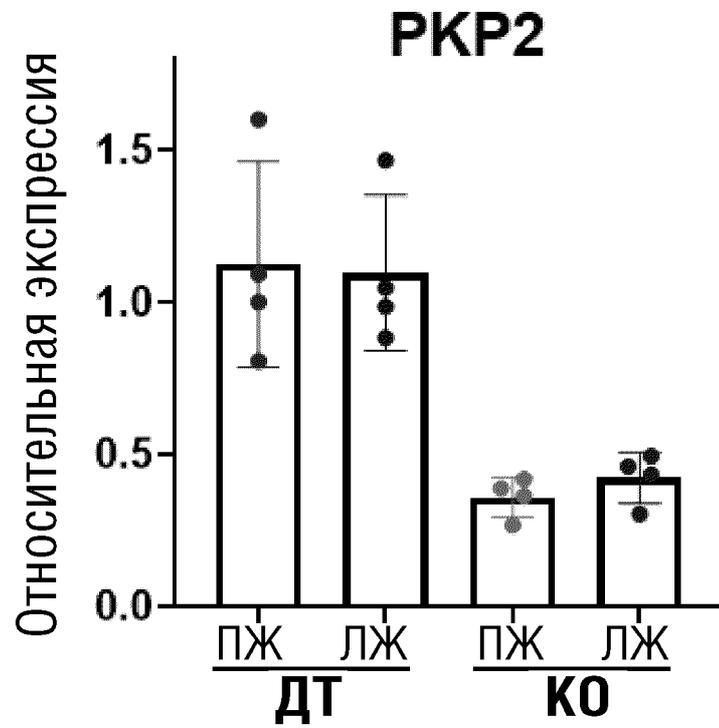
ФИГ.14В



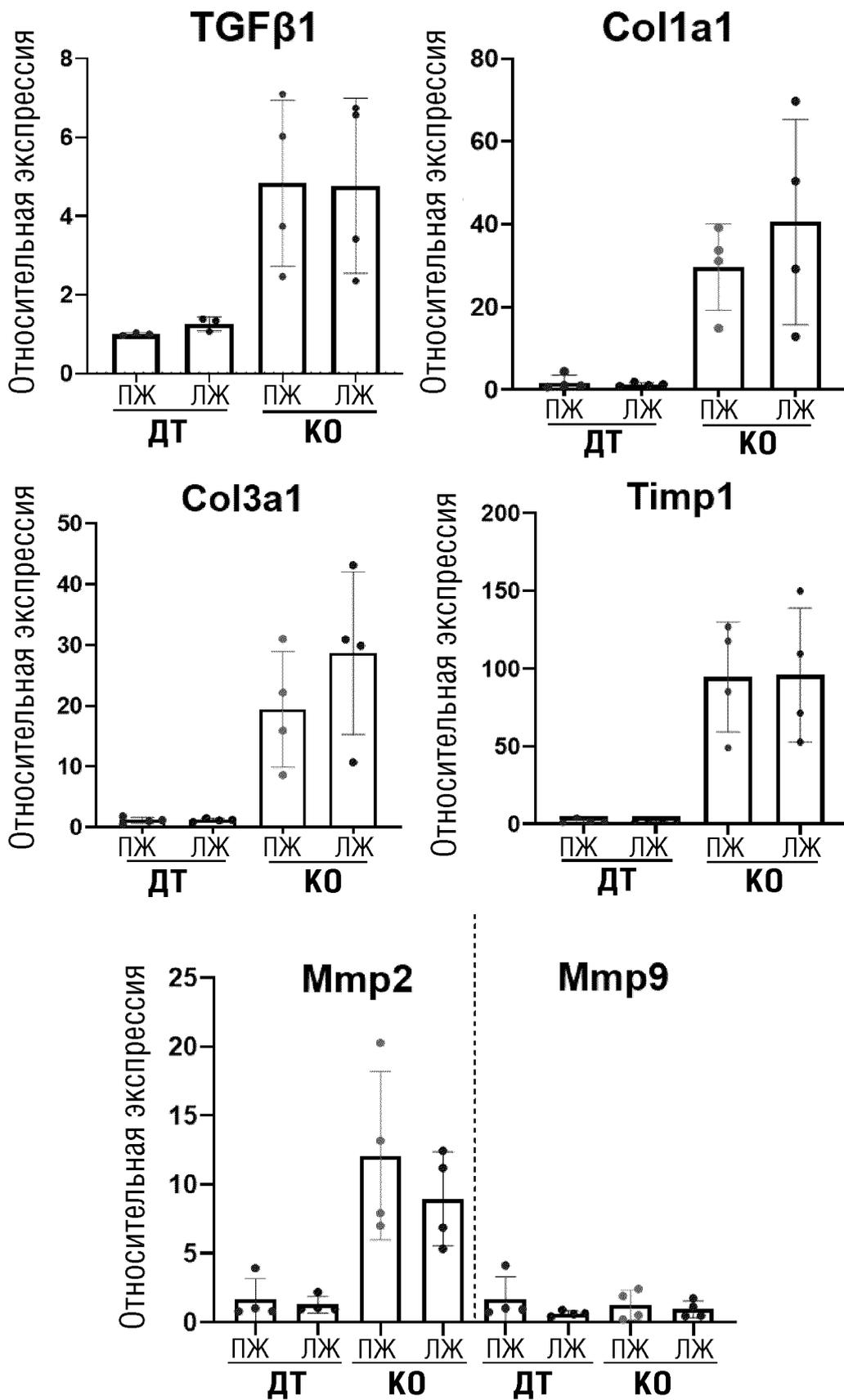
ФИГ.15



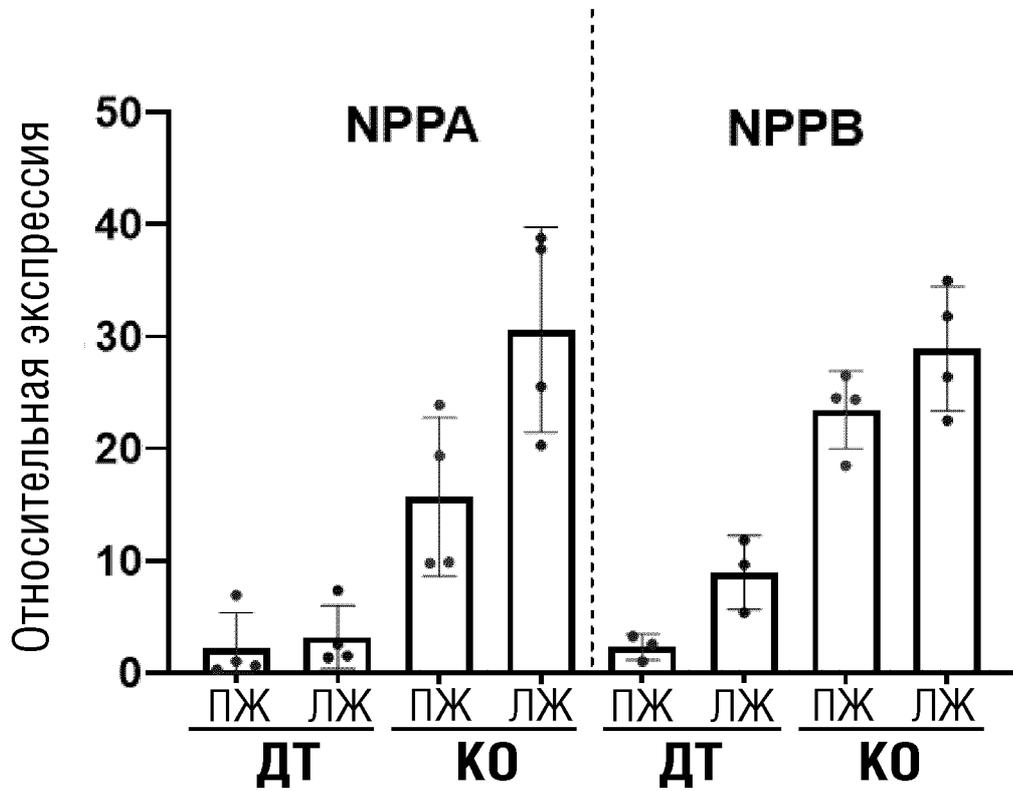
ФИГ.16А



ФИГ.16В



ФИГ.16С



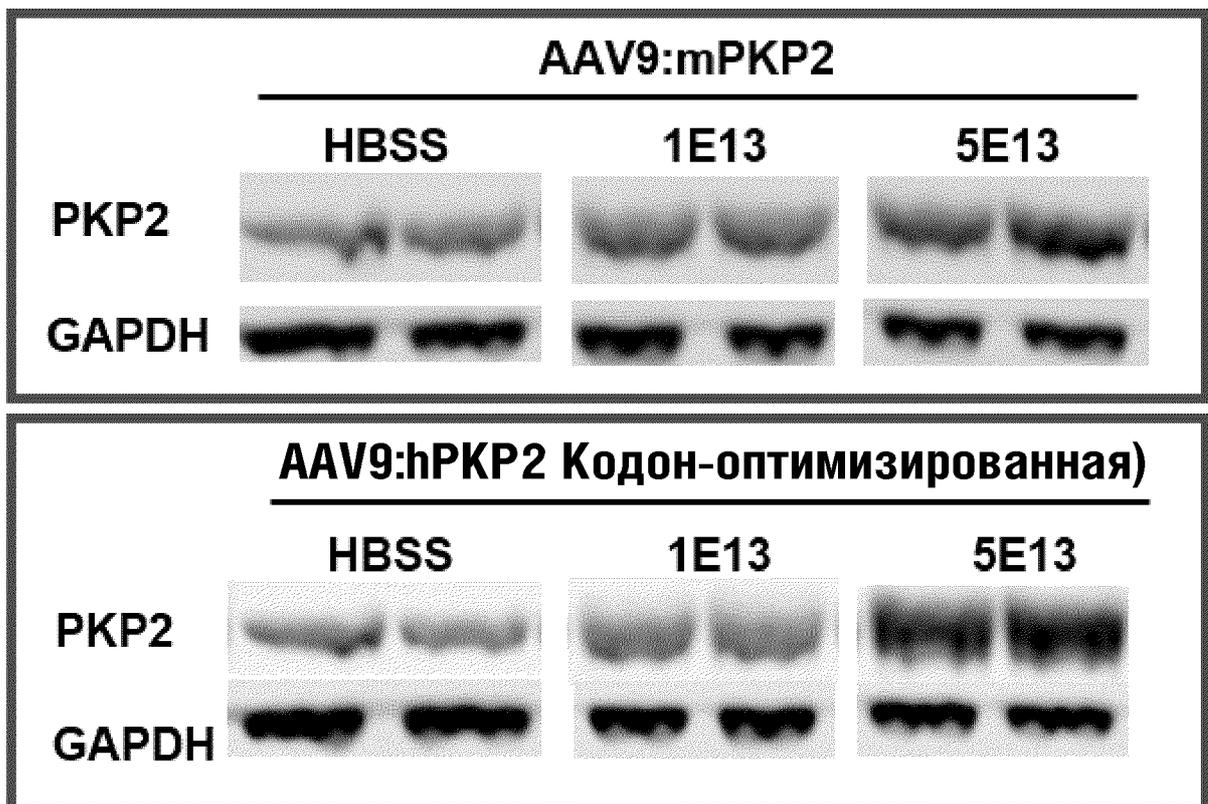
ФИГ.17



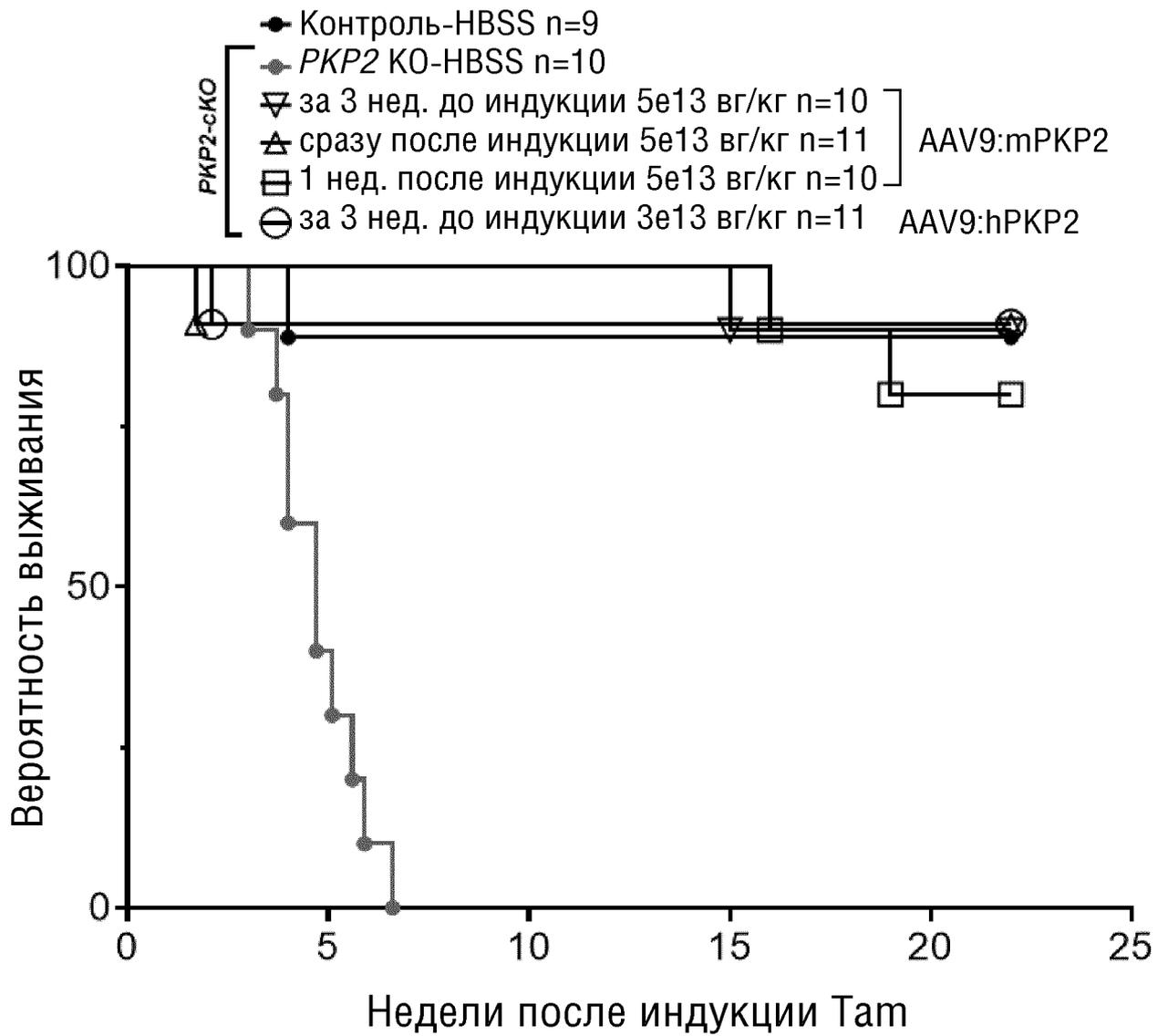
ФИГ.18А

AAV-pTnT600-mPKP2-WPREAAV-pTnT600-hPKP2op-WPRE

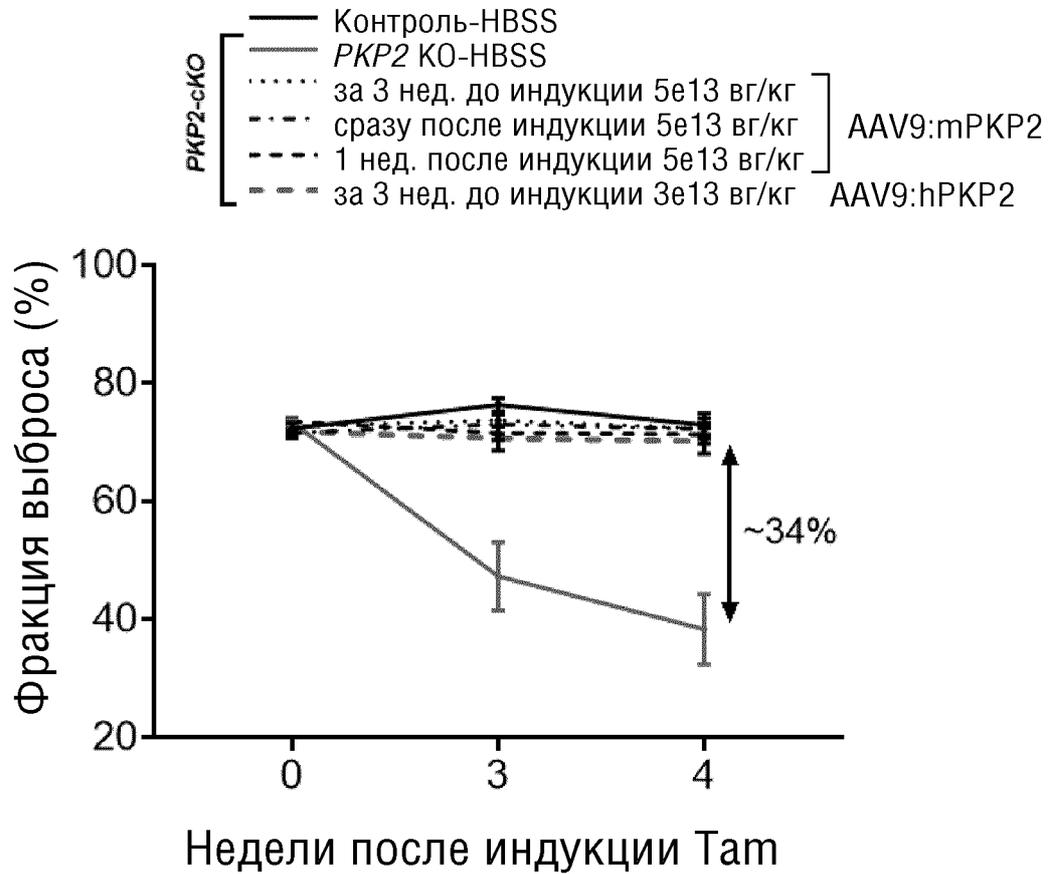
ФИГ.18В



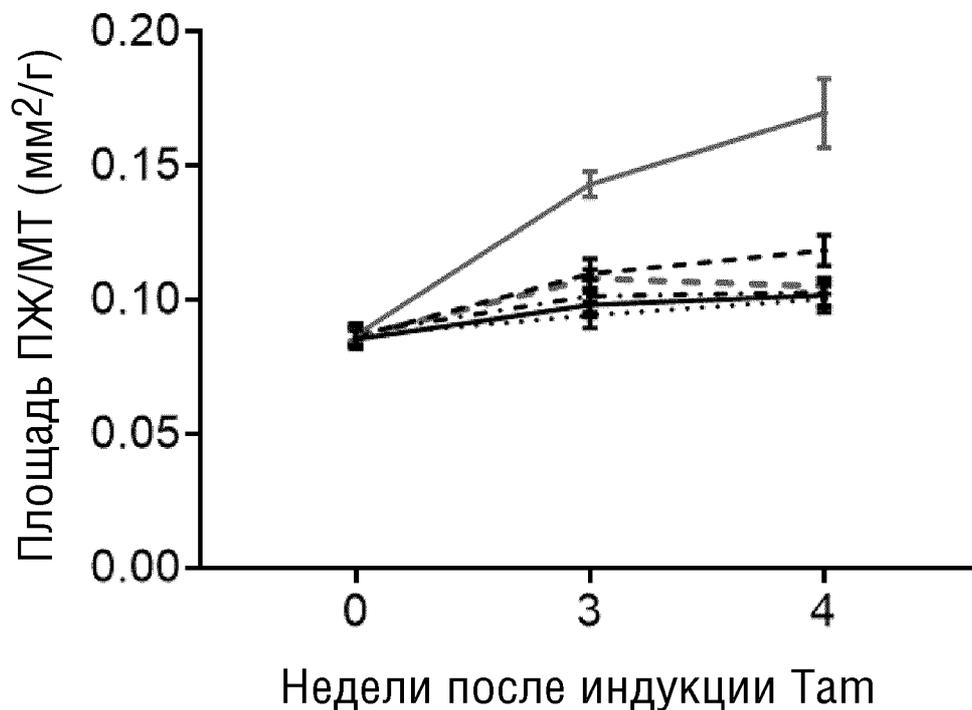
ФИГ.19



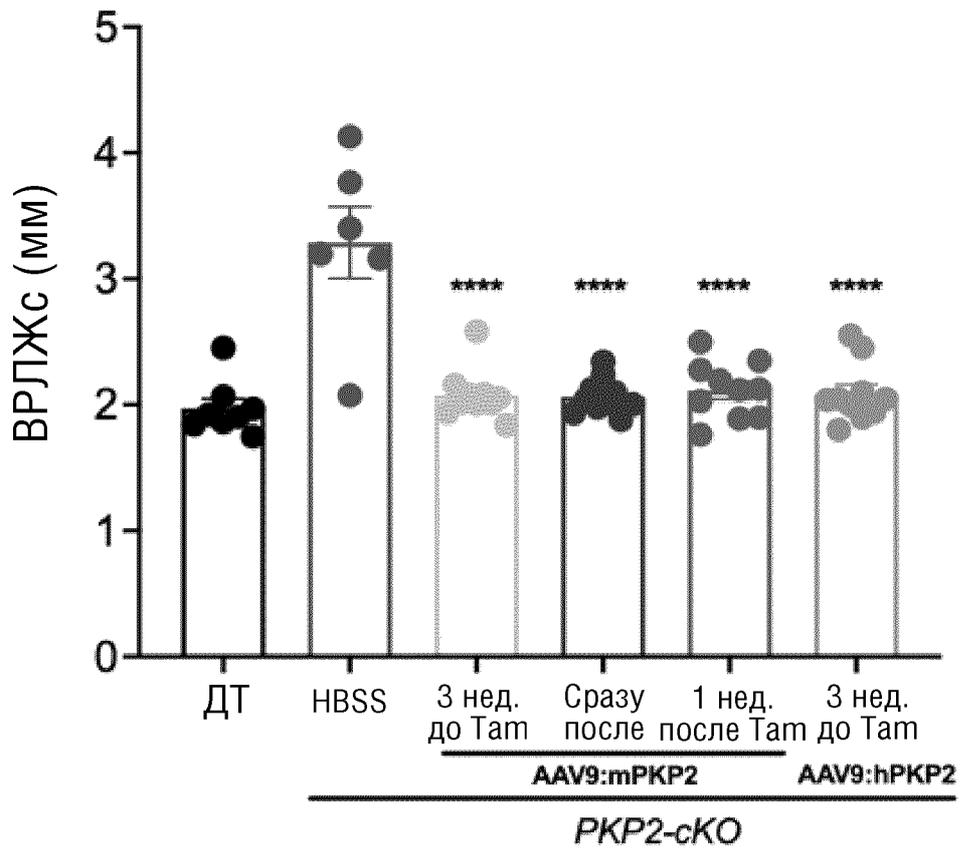
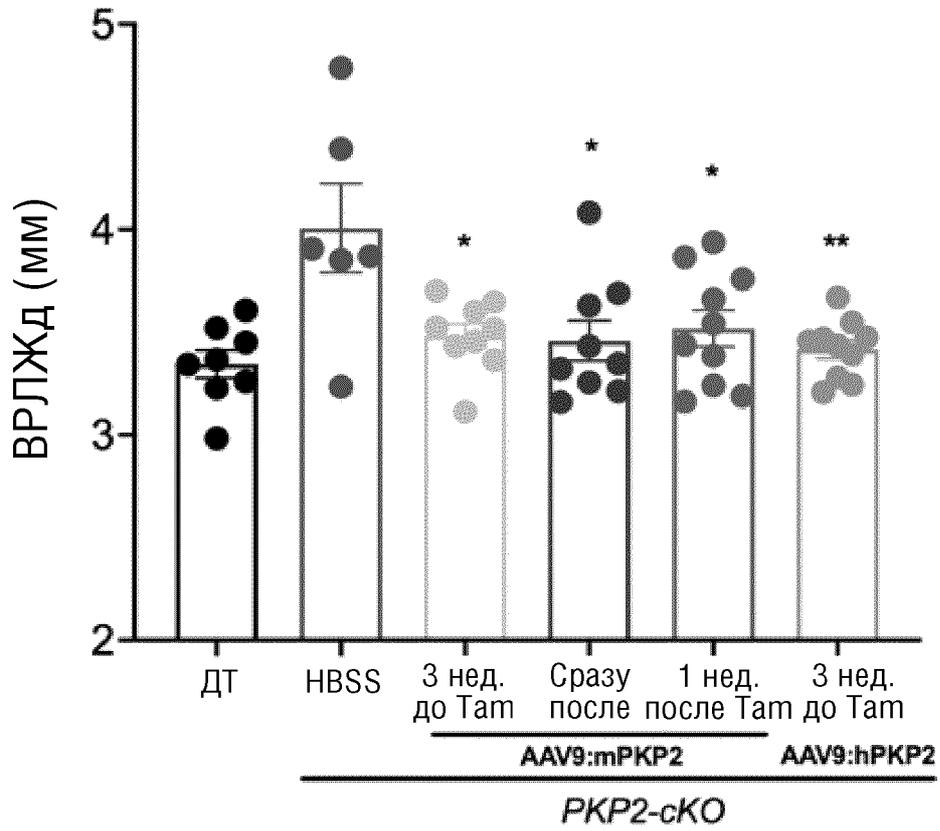
ФИГ.20А



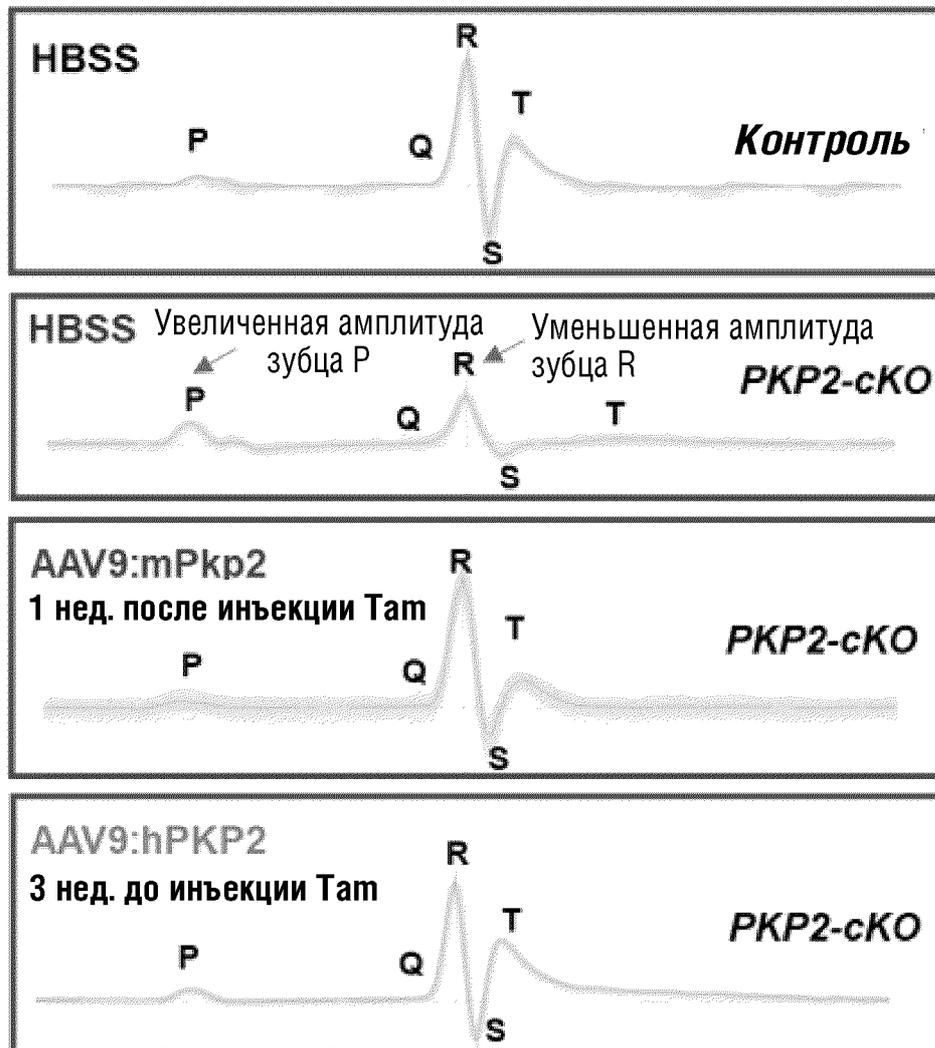
ФИГ.20В



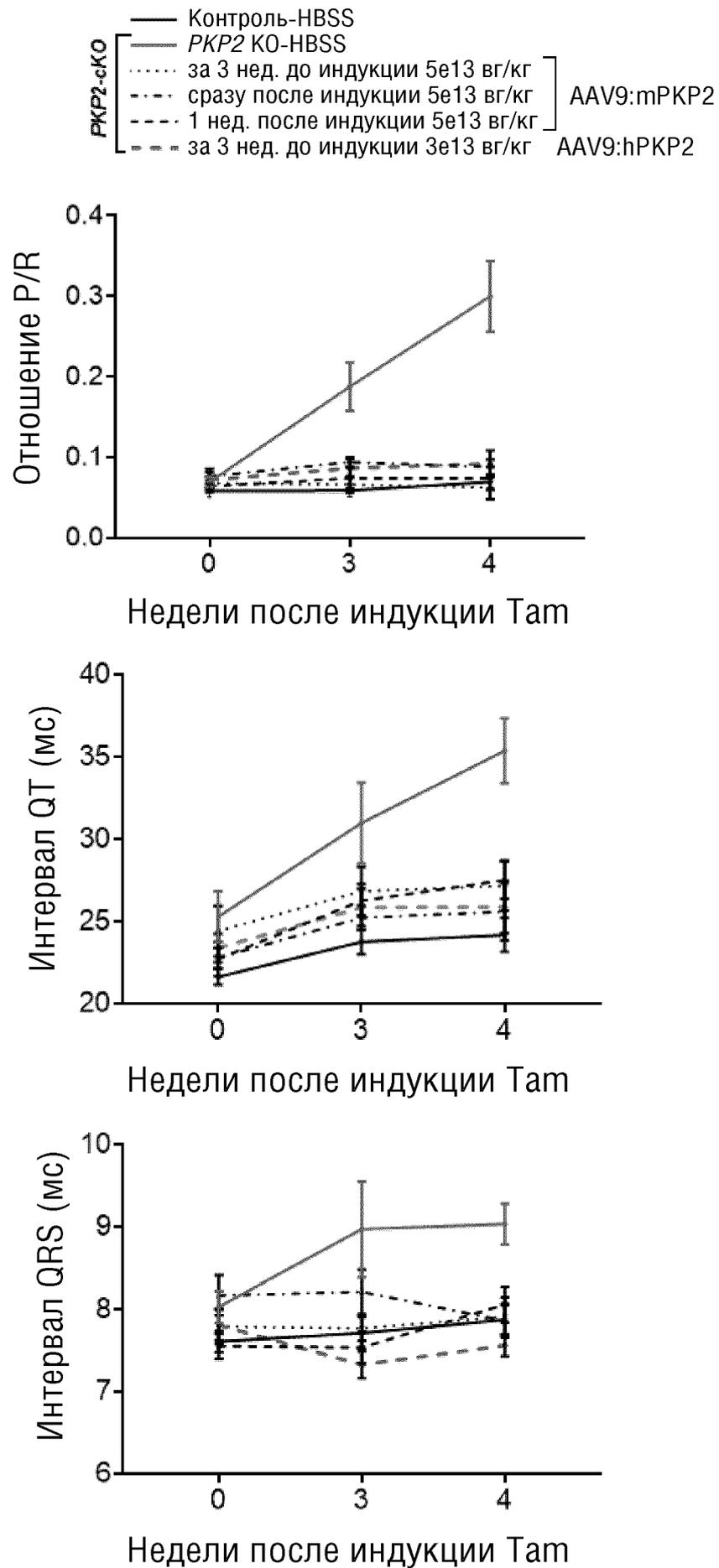
ФИГ.20С



ФИГ.21А

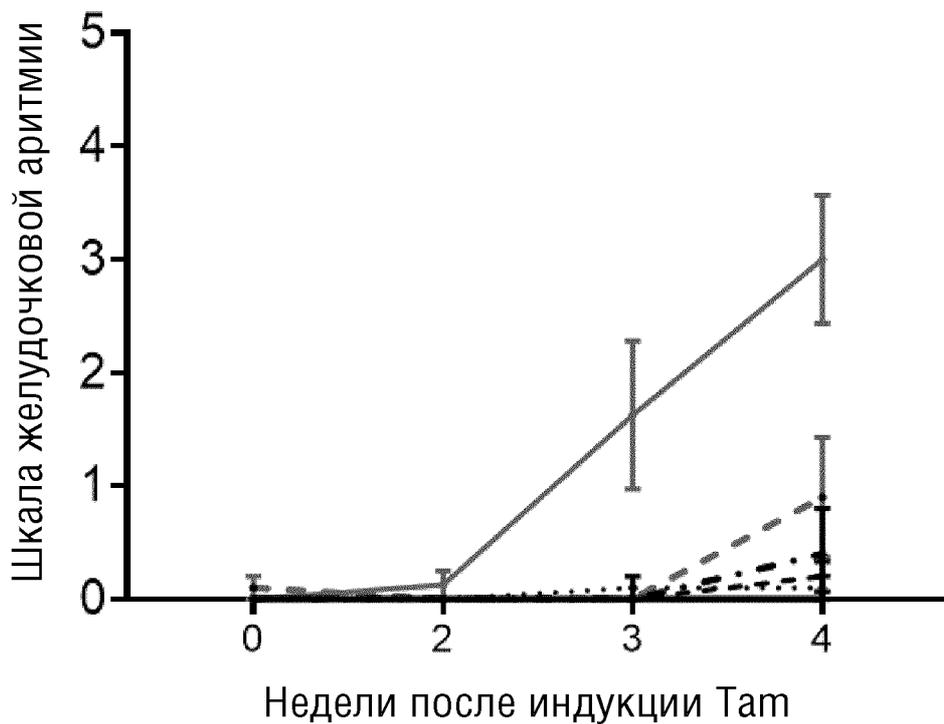
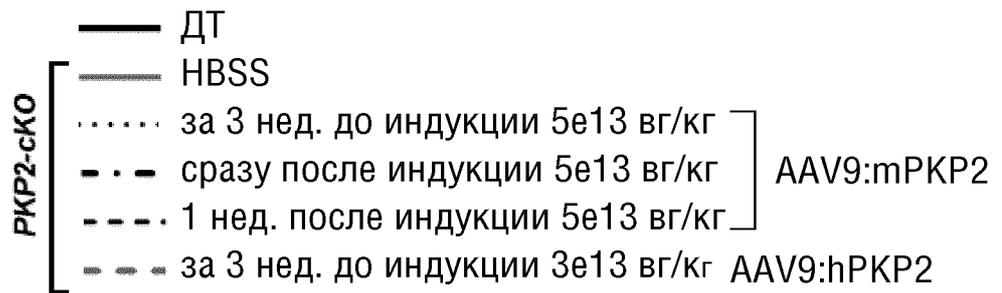


ФИГ.21В

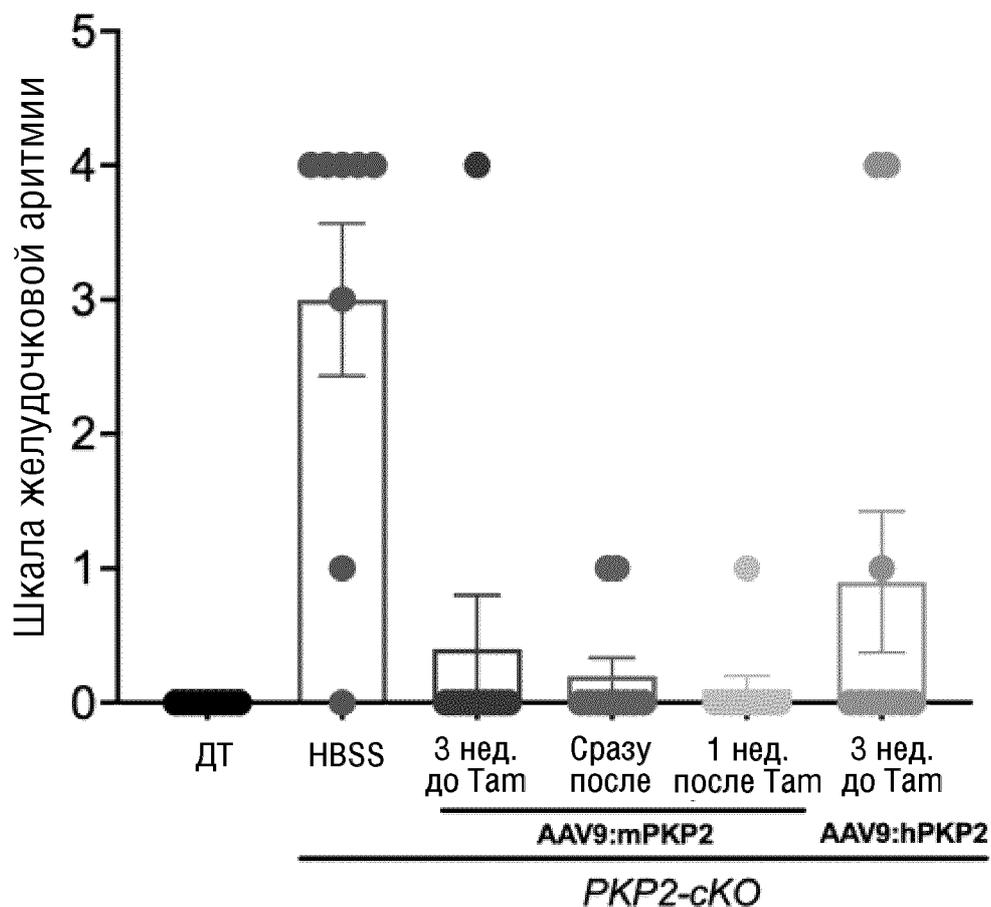


ФИГ.22А

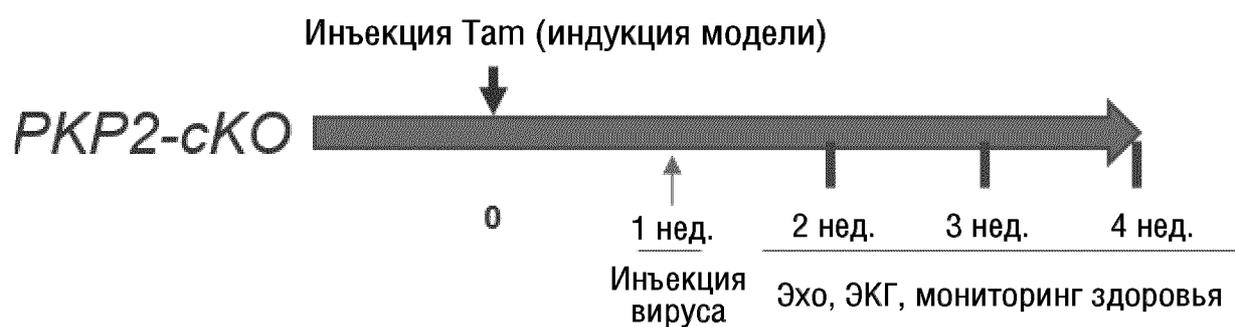
Степень	Аритмии
5	НЖТ/ЖФ/внезапная остановка сердца
4	НУЖТ
3	>100 ПЖС, куплеты и триплеты
2	>50, <100 ПЖС
1	<50 ПЖС, ПУС и АВ-блокада
0	<10 ПЖС



ФИГ.22В

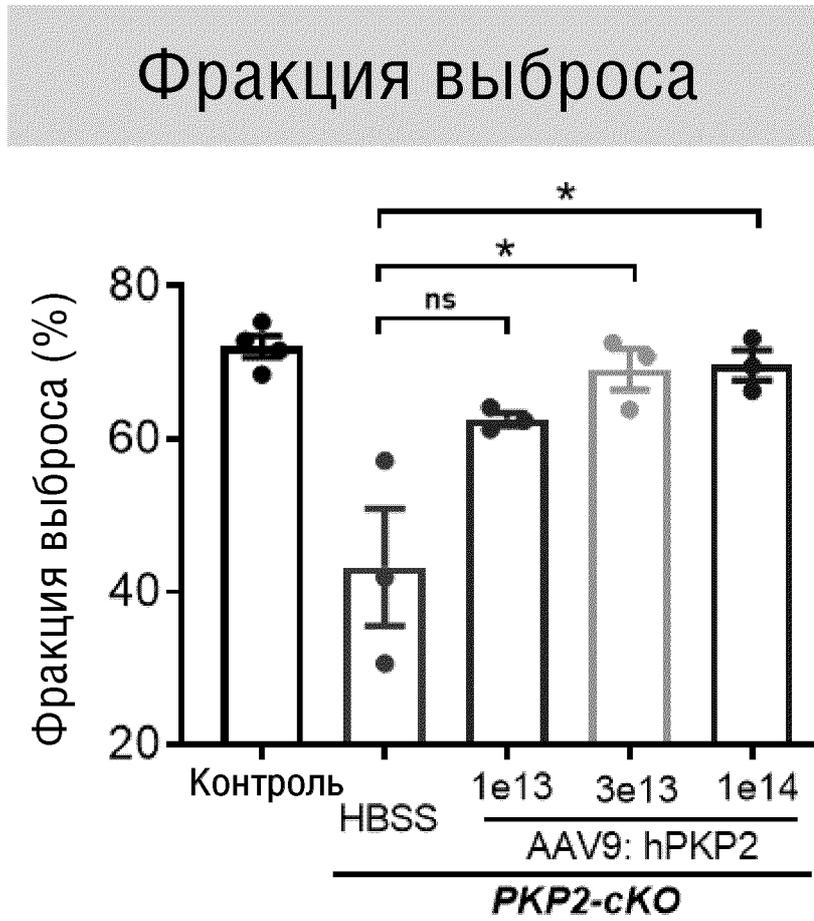


ФИГ.23

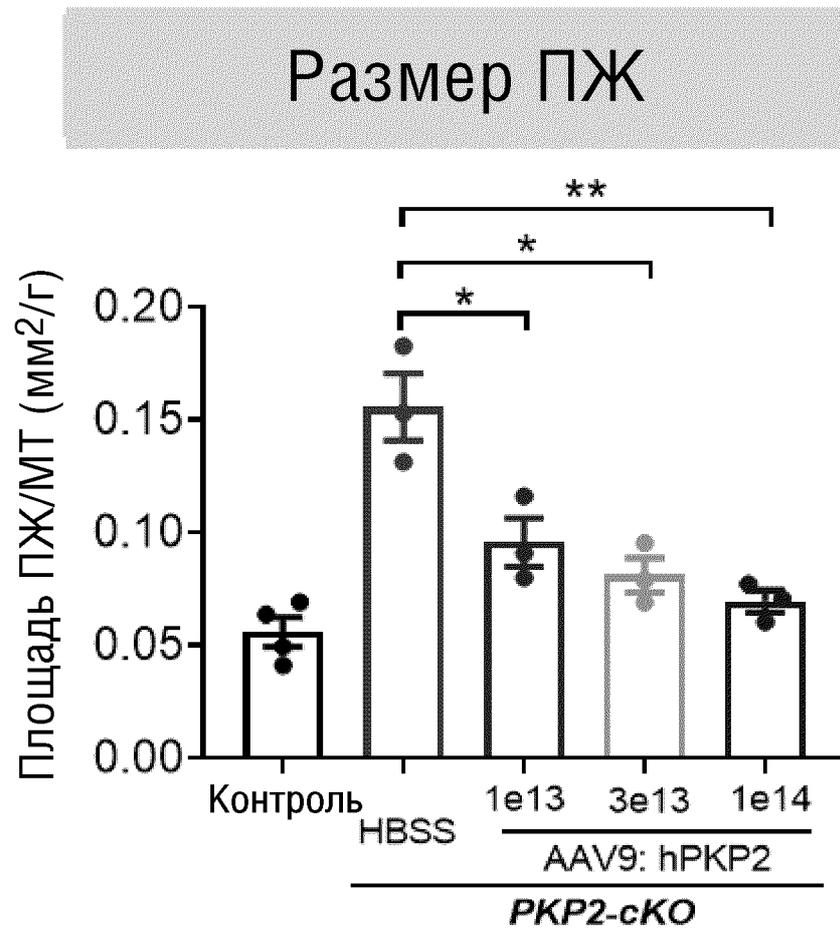


Группа	Тестируем. препарат	Доза	Кол-во
ДТ	HBSS	Н/П	4
PKP2-сКО АКМПЖ	HBSS	Н/П	4
	AAV9: hPKP2 (человеческий ортолог)	1e13	4
		3e13	3
		1e14	3

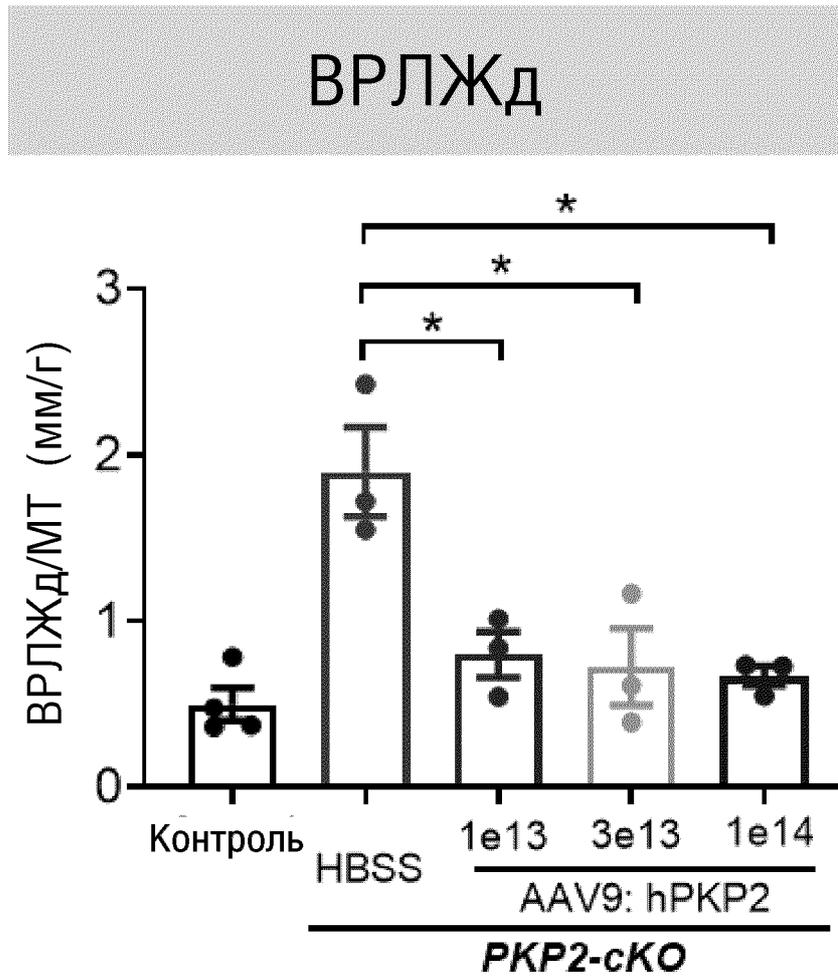
ФИГ.24А



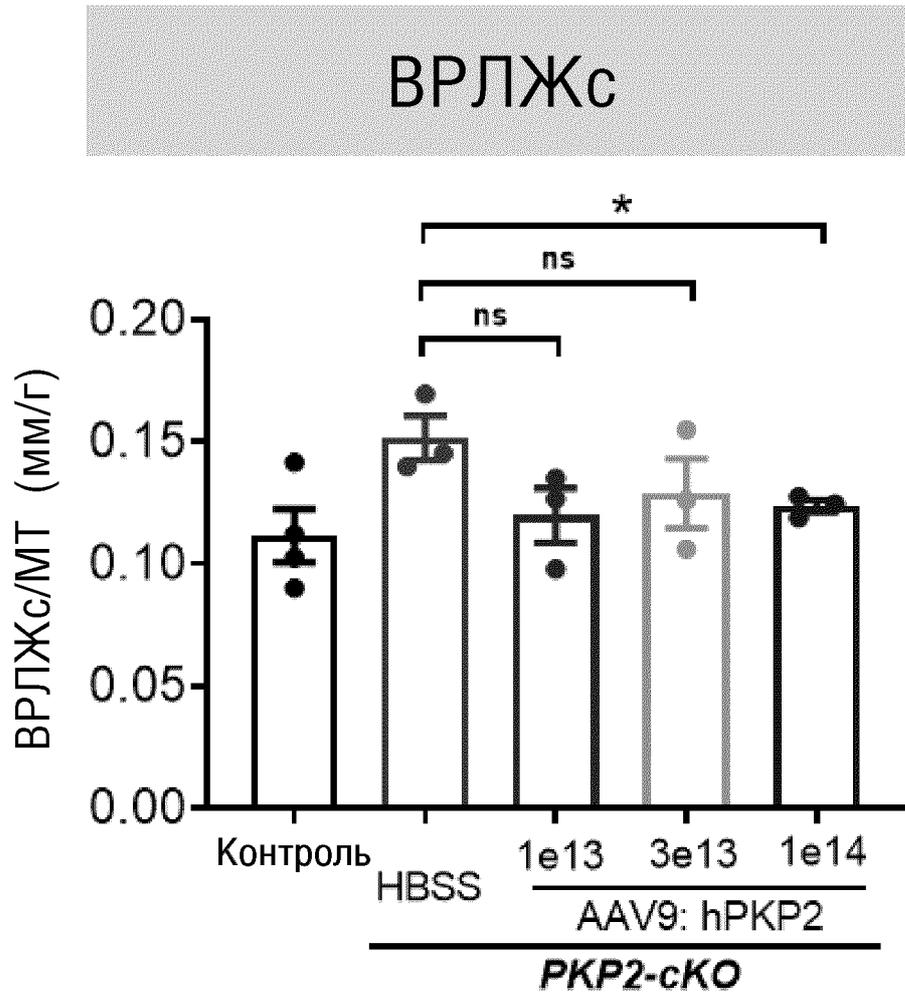
ФИГ.24В



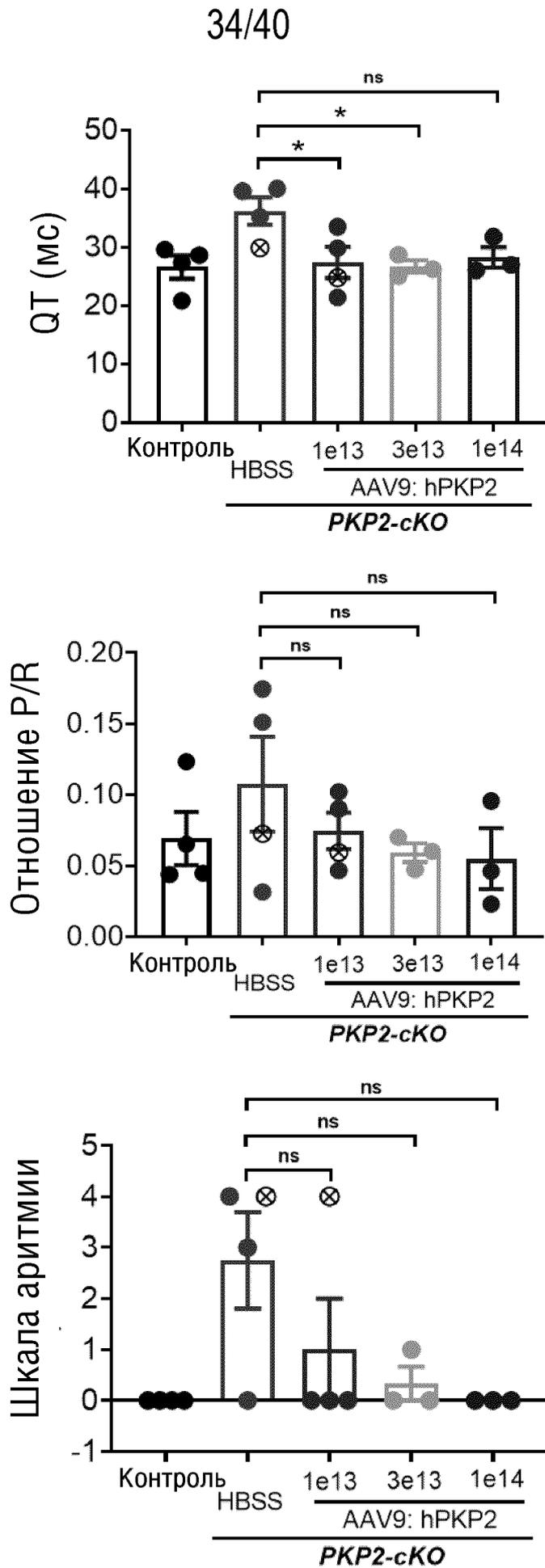
ФИГ.24С



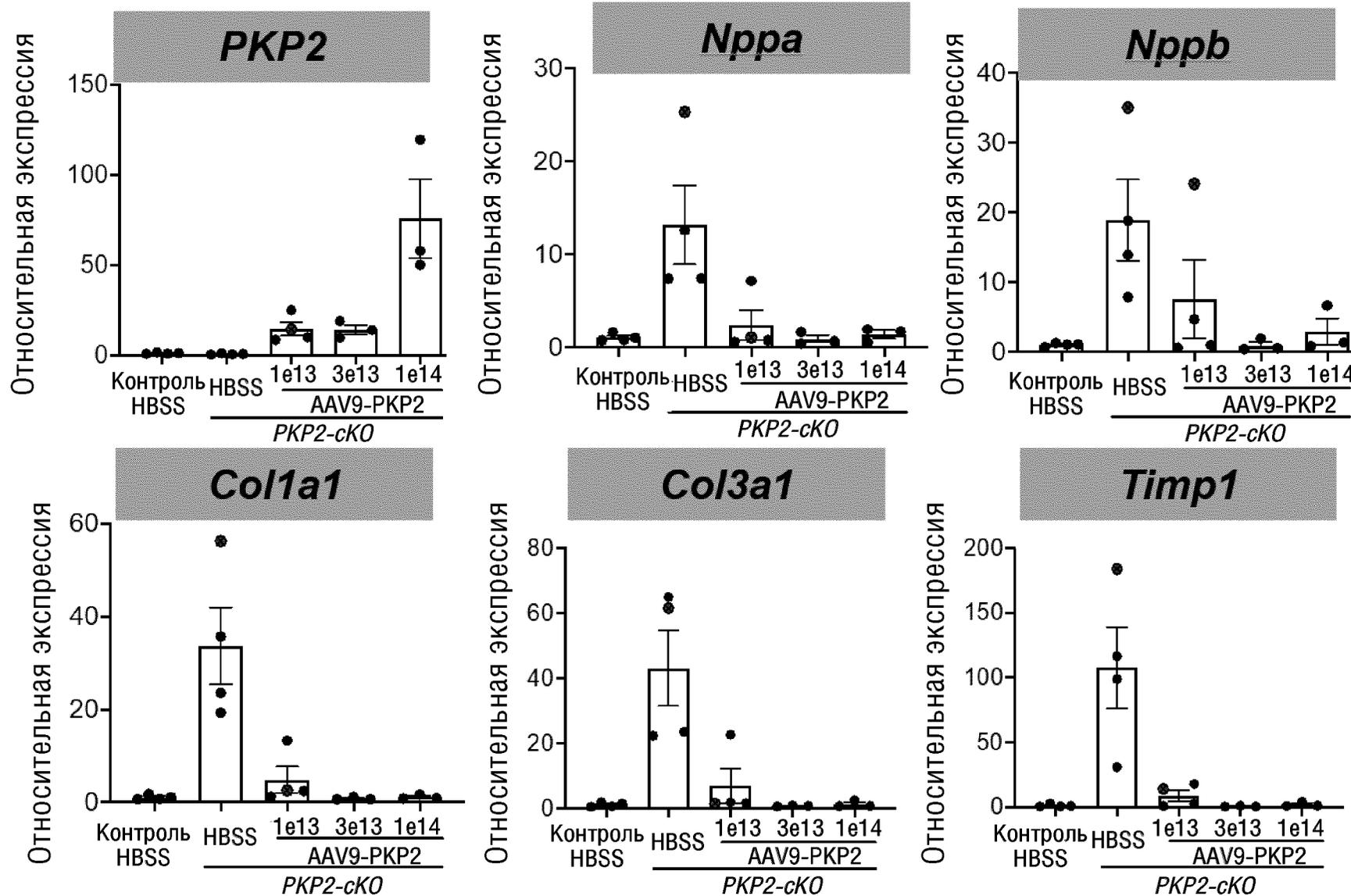
ФИГ.24D



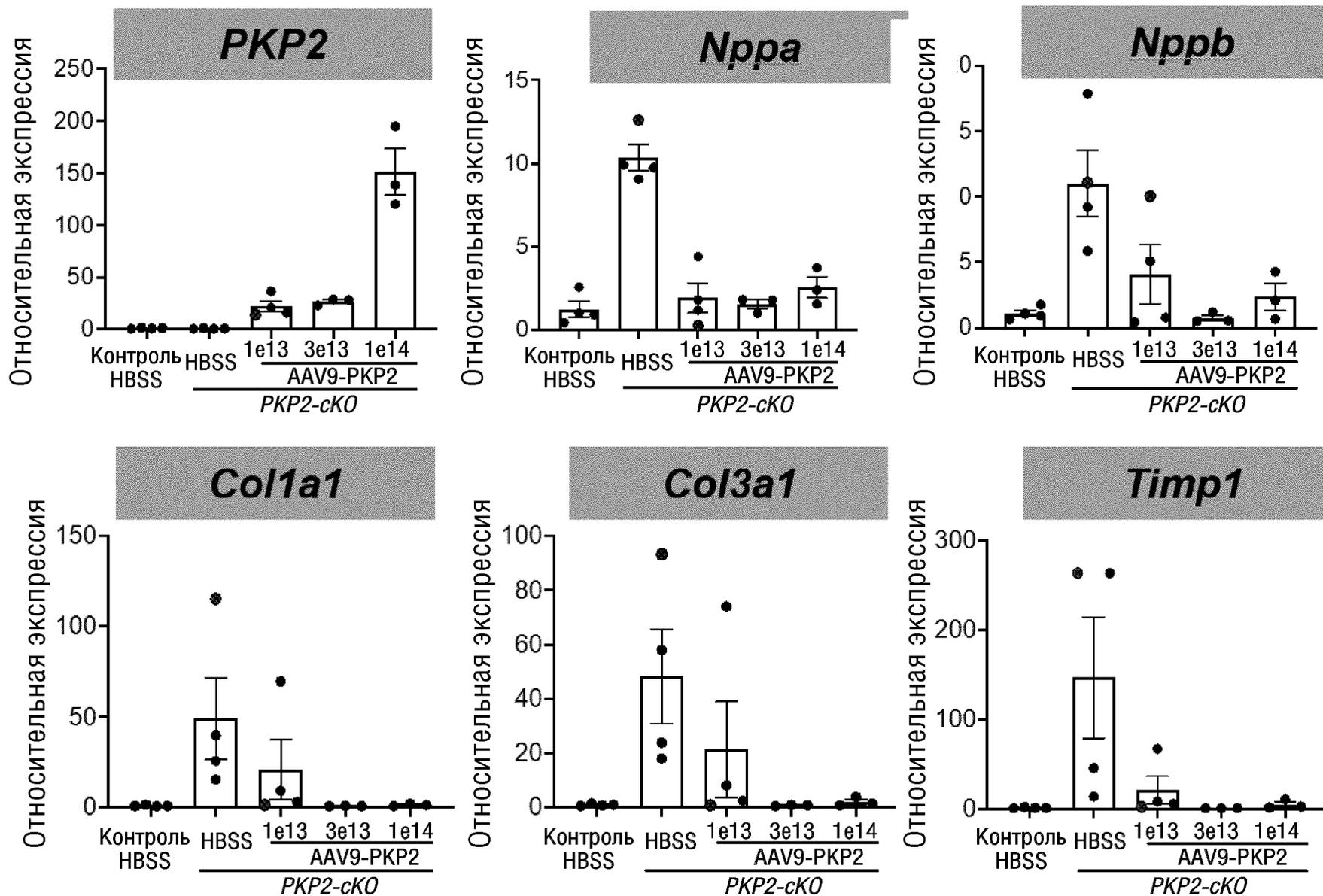
ФИГ.25



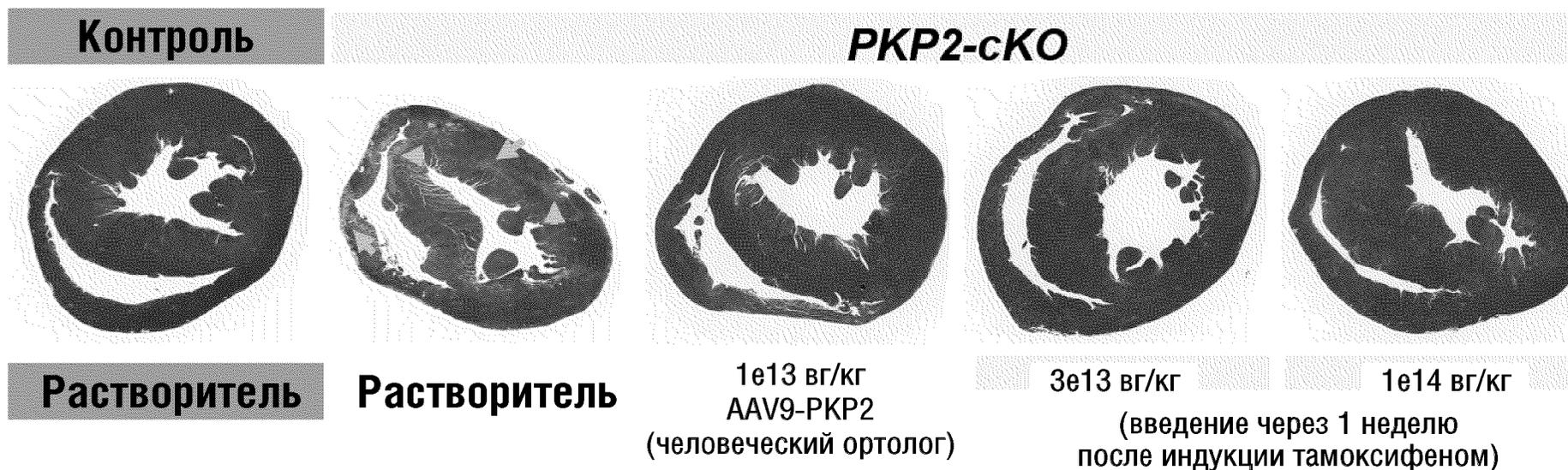
ФИГ.26А



ФИГ.26В

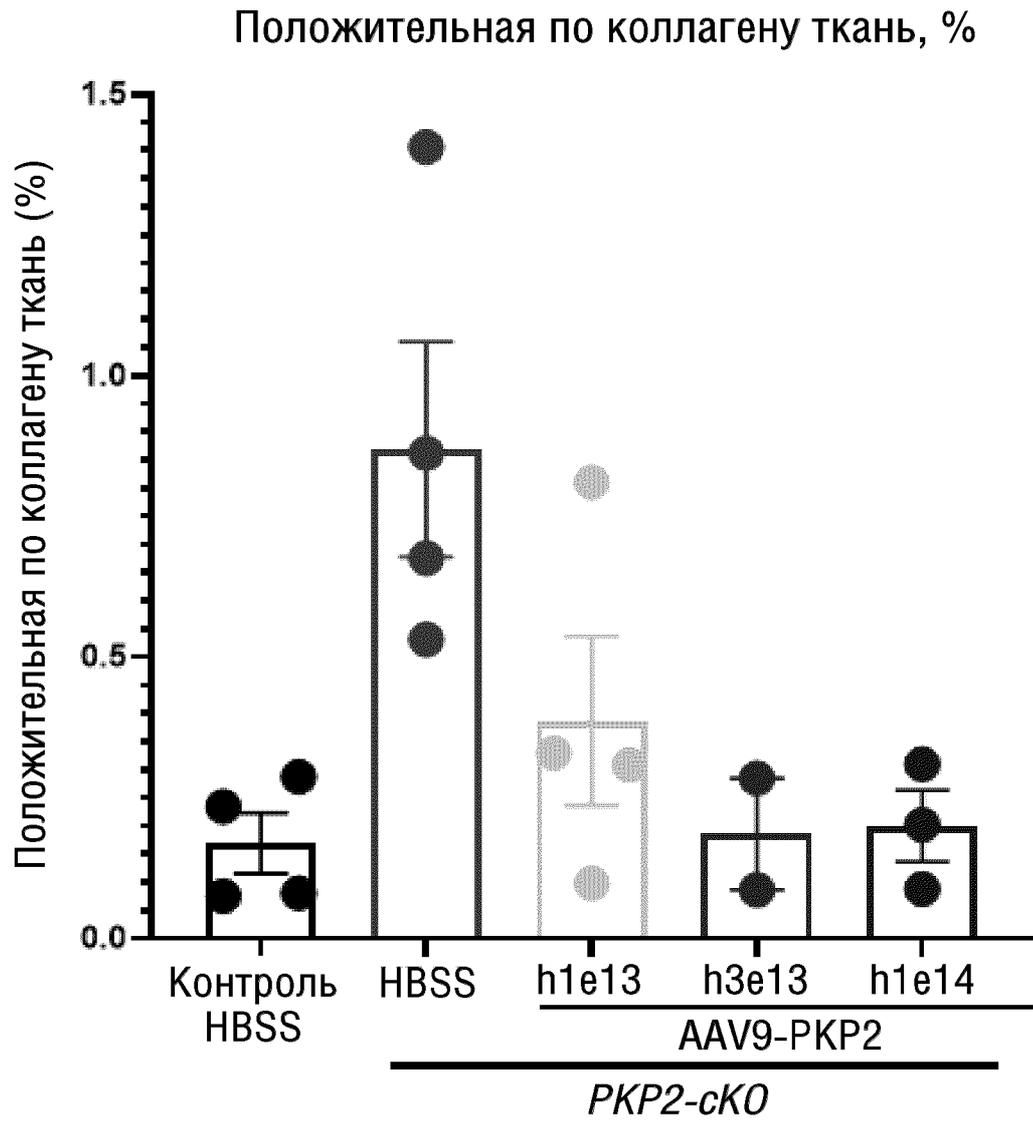


ФИГ.27А

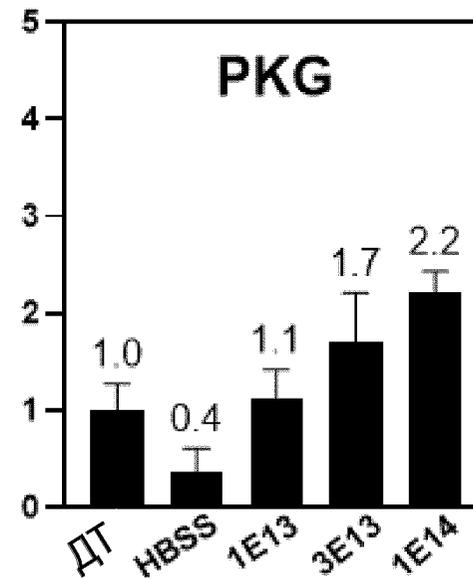
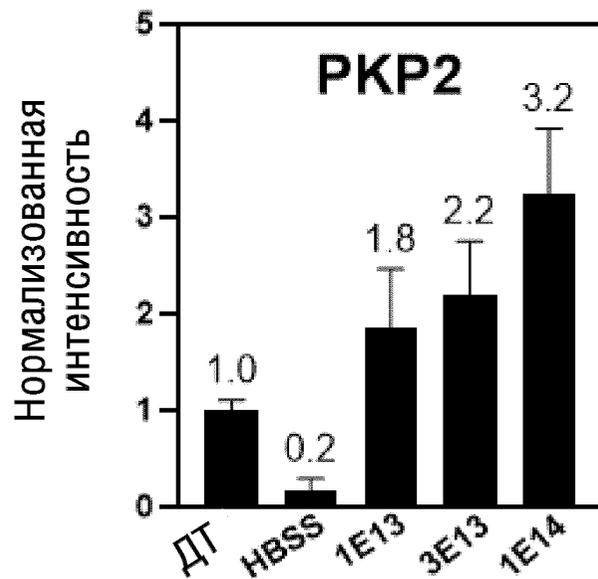
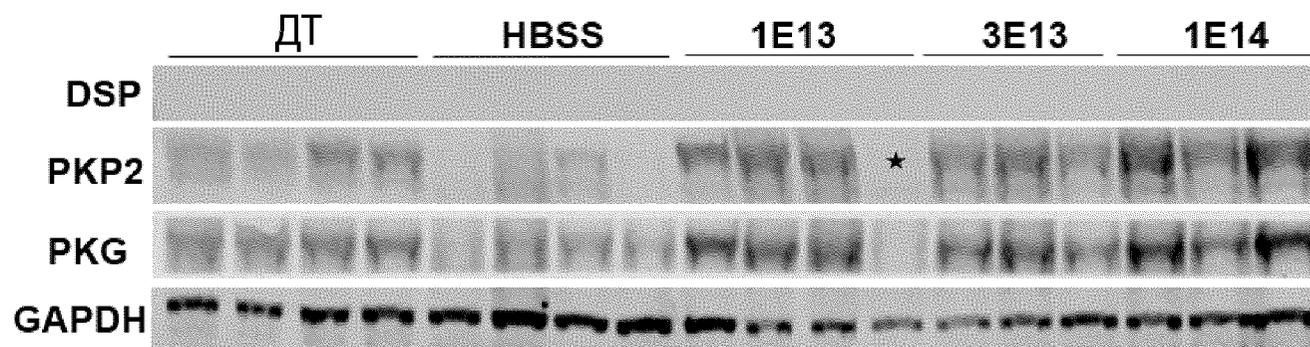


37/40

ФИГ.27В



ФИГ.28А



ФИГ.28В

