

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391757** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.22

(51) Int. Cl. **C07K 14/005** (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.23

(54) ВИРУСНЫЕ КАПСИДНЫЕ БЕЛКИ СО СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К КЛЕТКАМ ТКАНЕЙ СЕРДЦА

(31) **20217171.6; 21171861.4**

(32) **2020.12.23; 2021.05.03**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/087522**

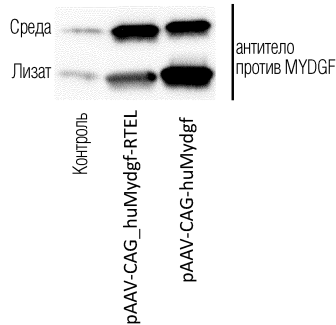
(87) **WO 2022/136655 2022.06.30**

(71) Заявитель:
**БЕРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Ламла Торстен, Блажевич Драгица,
Михельфельдер Штефан, Дюкс
Маттиас, Кройц Себастьян,
Зауэр Ахим, Майер Флориан,
Штиршторфер Биргит, Воллерт
Кай Кристоф, Корф-Клинггиль
Мортимер (DE)**

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

(57) Настоящее изобретение в основном относится к области генотерапии с использованием соматического гена на основе вирусных векторов и, в частности, аденоассоциированных вирусных векторов (AAV) для лечения наследственных или приобретенных заболеваний. Более конкретно, настоящее изобретение относится к белку вирусного капсида для специфической трансдукции мышинных эндотелиальных клеток для лечения или профилактики заболевания сердца у примата. Было обнаружено, что вирусный капсидный белок специфически связывается с клетками ткани сердца у примата, а в частности - с клетками сердечной мышцы примата, и может быть использован для эффективной и селективной трансдукции кардиомиоцитов примата и, кроме того, обеспечивает специфичную для тканей сердца экспрессию одного или более трансгенов у примата. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вирусному вектору, предпочтительно к вектору AAV, который содержит капсид по меньшей мере с одним трансгеном, упакованным в этот капсид. Вирусный вектор является подходящим для терапевтического лечения расстройства или заболевания сердца у примата. Настоящее изобретение также относится к клеткам и фармацевтическим композициям, содержащим вирусный вектор согласно изобретению.



A1

202391757

202391757

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578583EA/022

ВИРУСНЫЕ КАПСИДНЫЕ БЕЛКИ СО СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К КЛЕТКАМ ТКАНЕЙ СЕРДЦА

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к области соматической генной терапии с использованием вирусных векторов, и в частности, векторов аденоассоциированного вируса (AAV), для лечения наследственных или приобретенных заболеваний. Более конкретно, настоящее изобретение относится к вирусному капсидному белку, который обеспечивает специфическую трансдукцию мышечных эндотелиальных клеток для лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов. Было обнаружено, что вирусный капсидный белок специфически связывается с клетками ткани сердца приматов, и в частности, с клетками сердечной мышцы приматов, и может быть использован для обеспечения эффективной и селективной трансдукции кардиомиоцитов приматов и обеспечения специфичной для ткани сердца экспрессии одного или нескольких трансгенов у приматов. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вирусному вектору, предпочтительно к вектору AAV, который содержит капсид по меньшей мере с одним трансгеном, упакованным в этот капсид. Вирусный вектор является подходящим для терапевтического лечения расстройства или заболевания сердца у приматов. Настоящее изобретение также относится к клеткам и фармацевтическим композициям, которые содержат вирусный вектор согласно изобретению.

Предпосылки к созданию изобретения

Благодаря своей эффективности и благоприятному профилю безопасности, векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) в настоящее время наиболее широко используются в качестве векторных систем для соматической генной терапии. Векторы AAV способны вводить трансгены в виде одноцепочечной или двухцепочечной ДНК в делящиеся и неделящиеся клетки различных тканей, что приводит к эффективной и долговременной стабильной экспрессии. Клинические испытания с использованием рекомбинантных векторов AAV внесли значительный вклад в дальнейшее развитие генотерапии, что позволяет разработать такие важные методы лечения, как первая апробированная терапия на основе AAV для лечения врожденного амавроза Лебера (Luxturna) и спинальной мышечной атрофии (Zolgensma).

Кардиомиопатии (КМ) представляют собой гетерогенную группу заболеваний сердечной мышцы и являются основной причиной сердечной недостаточности (СН), то есть, наиболее частой причиной заболеваемости и смертности в странах Запада. При диагностике СН даже при наилучшем доступном лечении, продолжительность жизни в течение 5 лет после начала лечения составляет приблизительно лишь 50% (Writing Group et al., 2016). Современные варианты лечения КМ являются в основном симптоматическими и не могут остановить прогрессирование заболевания, а поэтому трансплантация сердца является единственным вариантом предотвращения СН. Для большинства сердечных

заболеваний, существующие в настоящее время методы симптоматического лечения являются неадекватными. Тем не менее, генотерапия на основе AAV является перспективным инструментом для устранения специфических молекулярных изменений при терапевтическом вмешательстве в случае наследственных КМ (Cemaly et al., 2013; Tilemann et al., 2012).

Первоначально, использование специфической для сердца изоформы саркоплазматической кальций-АТФазы (SERCA2a), доставляемой вектором AAV серотипа 1 (AAV1), навело на мысль о проведении первого исследования с участием человека, которое включало применение генотерапии на основе AAV для лечения пациентов с прогрессирующей сердечной недостаточностью (Jessup et al, 2011; Zsebo et al., 2014). К сожалению, положительный эффект, наблюдавшийся в клиническом испытании фазы 1, не мог быть подтвержден в следующем исследовании фазы 2; то есть, в исследовании CUPID2b (Greenberg et al., 2016). Ретроспективный анализ образцов пациентов показал очень низкую эффективность трансдукции и неспособность AAV1 доставлять SERCA2a в кардиомиоциты. Фактически менее 1% всех кардиомиоцитов содержали геномы вирусных векторов. Таким образом, неспособность AAV1 трансдуцировать клетки рассматривается в качестве основной причины отрицательного результата испытания.

Несколько серотипов AAV, а также сконструированные варианты AAV были протестированы и подвергнуты сравнению на преклинических моделях. Среди них, AAV серотипа 9 (AAV9) оказался наиболее эффективным для трансдукции кардиомиоцитов при системном введении. Следовательно, клиническое испытание фазы 1 для лечения заболеваний Данона с использованием AAV9 для экспрессии LAMP2B в ткани сердца (RocketPharma) в настоящее время находится на стадии разработки (идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT03882437). Ранее сообщалось, что другие варианты, включая AAV6, AAV8 и AAVRh.10, или сконструированные капсидные варианты, а именно, AAV-VNS (Ying et al., 2010), M41 (Yang et al., 2009), AAV2i8 (Asokan et al., 2010) обладают превосходными нацеливающими свойствами для переноса гена сердца у мышей, но эти данные пока не могут быть использованы для клинического применения на более подходящих крупных животных (Chamberlain et al, 2017)(Tarantal et al., 2017).

Помимо способности AAV9 трансдуцировать кардиомиоциты, AAV9 также обладает очень широким и неспецифическим тропизмом к другим тканям. Это приводит 1) к широкому распределению векторных капсидных белков (включая ДНК-груз) в широком диапазоне тканей и 2) к экспрессии терапевтического груза, включая, но не ограничиваясь ими, печень, центральную нервную систему, почки, легкие и поджелудочную железу. Селективная экспрессия кардиомиоцитов может быть достигнута за счет использования специфичных для клеток промоторов, регуляторных элементов или специфических сайтов связывания мРНК, введенных в 3'-конец кластера терапевтического трансгена для регуляции экспрессии генов в предполагаемой ткани-мишени (Powell et al, 2015; Qiao et al., 2011). Однако, большинство доступных промоторов, специфичных для сердца, обладают более низкой активностью по сравнению с наиболее распространенными промоторами,

такими как промоторы CMV или CAG, и, наконец, потребуются еще более высокие дозы вектора для достижения достаточных уровней экспрессии терапевтического груза (Korbelin et al, 2016a; Korbelin et al. 2016b). В дополнение к тому факту, что упаковывающие свойства AAV ограничивают использование более крупных элементов, регуляция экспрессии генов в определенной ткани или в клетках определенного типа с помощью регуляторных элементов всегда сопряжена с риском остаточной экспрессии генов в нецелевых тканях, вызванной часто наблюдающейся негерметичностью соответствующих систем. Как более высокие дозы вектора, так и широкое распространение капсидов и трансгенов, а также терапевтическая полезная нагрузка, экспрессируемая в нерелевантных («нецелевых») тканях, могут вызывать активацию иммунной системы (например, активацию Т-клеток посредством TLR9) (Colella et al., 2018), резкое снижение числа тромбоцитов, активацию комплемента или даже серьезные побочные эффекты, включая острую гепатотоксичность (Wilson & Flotte, 2020).

Было показано, что несколько терапевтических белков могут оказаться полезными для облегчения сердечной недостаточности и острого инфаркта миокарда. Так, например, в WO 2014/111458 было описано применение фактора роста миелоидного происхождения (Mydgf) для лечения острого инфаркта миокарда. Корф-Клингсбиль и др. (2015) сообщают, что Mydgf секретируется клетками костного мозга после инфаркта миокарда и способствует выживанию кардиомиоцитов и ангиогенезу. Корф-Клингсбиль сообщают, что происходящие из костного мозга моноциты и макрофаги продуцируют этот белок эндогенно для защиты и репарации ткани сердца после инфаркта миокарда. Более того, Корф-Клингсбиль показали, что лечение рекомбинантным Mydgf уменьшает размер рубца и сократительную дисфункцию после инфаркта миокарда. Корф-Клингсбиль и др. (2021) сообщали, что трансгенная сверхэкспрессия Mydgf в воспалительных клетках костного мозга ослабляет индуцированную повышенным давлением гипертрофию и дисфункцию. В частности, описана трансдукция мышей лентивирусными векторами. В WO 2021/148411 A1 также описана экспрессия Mydgf у мышей, которым вводили лентивирус. Однако, лентивирусные векторы имеют серьезные недостатки.

Лентивирусные векторы обладают несколькими привлекательными свойствами в качестве средств для доставки генов, включая: (i) устойчивую доставку генов посредством стабильной интеграции вектора в геном хозяина; (ii) способность инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки; (iii) широкий тканевый тропизм, включая важные типы клеток-мишеней для генотерапии и клеточной терапии; (iv) отсутствие экспрессии вирусных белков после векторной трансдукции; (v) способность доставлять сложные генетические элементы, такие как полицистронные или интрон-содержащие последовательности; (vi) потенциально более безопасный профиль сайта интеграции; и (vii) относительно простую систему для модификации и продуцирования векторов (Sakuma et al. 2012). Некоторые из этих свойств не всегда являются желательными. Интеграция вектора в геном хозяина, которая может быть смягчена за счет потенциально более безопасного профиля сайта интеграции, является проблемой, которой следует по

возможности избегать, особенно в связи с тропизмом к ткани широкого ряда, который также не всегда желателен и также может создать определенную проблему, если доставка трансгена представляет риск при экспрессии вне органа-мишени. Более того, хотя лентивирусы могут быть относительно простой системой для модификации и продуцирования векторов, однако, по-прежнему существует потребность в вирусных платформах, с которыми легче работать. Надежность вируса и сложность его получения за пределами лаборатории могут быть факторами, которые до сих пор также ограничивают использование лентивирусов.

Несмотря на прогресс, достигнутый в области соматической генотерапии за последние десятилетия, по-прежнему существует потребность в новых вирусных векторах, которые обеспечивали бы эффективную и селективную трансдукцию ткани сердца с минимальным нацеливанием на другие ткани. Такой вектор должен обеспечивать соответствующие уровни терапевтически активных белков у пациентов, а в частности у человека, при низкой дозе вектора, что тем самым предотвращает нежелательные побочные эффекты у пациента. Векторы также должны обладать низкой аффинностью к нейтрализующим IgG, чтобы их можно было использовать у пациентов с ранее имеющимся иммунитетом. Таким образом, целью настоящего изобретения является создание новых вирусных векторов, подходящих для лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов. В частности, эти векторы должны обеспечивать эффективную и селективную трансдукцию ткани сердца приматов, а в частности, кардиомиоцитов приматов.

В частности, целью настоящего изобретения является преодоление недостатков, ассоциированных с использованием лентивирусов. В частности, целью настоящего изобретения является получение вирусных векторов, которые интегрируются в геном реже, чем лентивирусы. Предпочтительно, вирусные векторы должны лишь изредка интегрироваться в геном. Еще более предпочтительно, вирусные векторы вообще не должны интегрироваться в геном со скоростью, которая представляет определенный риск для пациента, подлежащего лечению, например, таким вектором является аденоассоциированный вирус (AAV, см. Gill-Farina et al, (2016)). Еще одной целью настоящего изобретения является получение вирусных векторов, которые специфически нацелены на сердце, и в которых нецелевая трансдукция ниже, чем у AAV, который, как известно, обладает сердечным тропизмом. Наиболее предпочтительно, чтобы обе эти цели были достигнуты с использованием вирусных векторов согласно изобретению. Еще одной целью настоящего изобретения является получение векторов, которые легче производить в больших масштабах, чем лентивирусы, такие как AAV.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к капсидному белку, который обеспечивает специфическую трансдукцию мышечных эндотелиальных клеток для их применения в способе лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов. Было обнаружено, что капсидные белки, обеспечивающие селективную трансдукцию мышечных эндотелиальных клеток, и в частности, мышечных эндотелиальных клеток головного мозга или легких,

проявляют другой тропизм у приматов, то есть, они обеспечивают селективную трансдукцию клеток ткани сердца (у крыс, ситуация была аналогична приматам). Соответственно, капсидный белок, который обеспечивает специфическую трансдукцию мышечных эндотелиальных клеток, является очень полезным инструментом для введения трансгенов в клетки ткани сердца, и в частности, кардиомиоциты, у человека или примата, не являющегося человеком. Капсидный белок может быть либо немодифицированным, то есть, встречающимся в природе, либо модифицированным путем встраивания пептидной последовательности, влияющей на его тропизм. Настоящее изобретение также относится к вирусным векторам, а в частности, к AAV-векторам, с немодифицированным или модифицированным капсидом, который специфически трансдуцирует эндотелиальные клетки при введении мышце, и следовательно, может быть использован для селективной трансдукции кардиомиоцитов и экспрессии трансгена при системном введении вектора приматам, то есть, человеку или приматам, не являющимся человеком (человеку или NHP) *in vivo*. Векторы обеспечивают минимальную трансдукцию нецелевых тканей, таких как ЦНС, легкие, почки, поджелудочная железа и скелетные мышцы у приматов. По сравнению с AAV9, который является стандартным вектором, используемым в настоящее время для генотерапии сердца, и который изучается в продолжающемся клиническом испытании фазы I, наблюдаемое перенацеливание вирусных векторов согласно изобретению на печень привело к снижению экспрессии в печени в 43,3 раза, что указывает на существенное улучшение профиля вне цели. Заметно улучшенный профиль ненаправленного воздействия позволит увеличить дозу и тем самым повысить экспрессию трансгена и терапевтическую эффективность. Таким образом, вирусные векторы согласно изобретению являются особенно подходящими для доставки трансгенов приматам, страдающим сердечным заболеванием, а в частности, человеку.

Ранее на животных-моделях были описаны вирусные векторы с модифицированным капсидом, которые обеспечивают селективный хоминг и экспрессию генов в ткани-мишени. В частности, сообщалось, что включение пептидных последовательностей в вирусные капсидные белки является подходящим способом увеличения аффинности векторной системы к определенной ткани-мишени. Так, например, в WO 2015/158749 описан вариант AAV2 с модифицированным капсидным белком, содержащим пептид NRGTEWD (представленный здесь как SEQ ID NO:1), который селективно направляет вектор в головной или спинной мозг мышей после системного введения. Этот вариант AAV2 упоминается здесь как **AAV BI-15.1**. Аналогичным образом, в WO 2015/018860 описан вариант AAV2 с модифицированным капсидным белком, содержащим пептид ESGHGYF (представленный в настоящей заявке как SEQ ID NO:3), который селективно направляет вектор в легкие мышей после системного введения. Этот вариант AAV упоминается здесь как **AAV BI-15.2**. BI-15.1 и BI-15.2 трансдуцируют эндотелиальные клетки в свои отдельные ткани-мишени, к которым они направляются посредством специфичного к ним пептида (BI-15.1 в малую сосудистую сеть головного мозга мышши, и BI-15.2 в легочную сосудистую сеть легких мышши). Такие уникальные свойства векторов,

как описано для VI-15.1 и VI-15.2, очень привлекательны для их применения в разработке направленной генотерапии.

Оба вектора, AAV VI-15.1 и AAV VI-15.2, были исследованы в настоящей заявке на их способность доставлять и экспрессировать полезные нагрузки, такие как репортер с активацией белка, флуоресцирующего в зеленом диапазоне спектра (eGFP), *in vivo* после системного введения крысам и NHP. В частности, AAV VI-15.1 и AAV VI-15.2 были протестированы в исследованиях биораспределения на двух различных линиях крыс (крыс WKY/KyoRj и Sprague Dawley) для изучения их активности и нецелевого профиля в исследованиях с повышением дозы с использованием различных промоторов и в сравнении с AAV9. Что наиболее важно, AAV VI-15.1 и AAV VI-15.2 были проанализированы у приматов, не являющихся человеком (собакоподобных обезьян, NHP), для изучения тканевого тропизма обоих векторов у трансляционно более релевантных видов. Было установлено, что введение обоих вариантов приводило к селективной трансдукции кардиомиоцитов как у крыс, так и у NHP. Кроме того, было обнаружено, что оба варианта селективно трансдуцируют кардиомиоциты человека, полученные из iPSC.

В то время как хоминг в ткани сердца у крыс был почти на сопоставимых уровнях для обоих векторов, однако, AAV VI-15.1 имел более благоприятное соотношение хоминга в сердце:печень по сравнению с AAV VI-15.2 у NHP (0,51 и 0,11). Важно отметить, что оба эти вектора явно превосходили AAV9 у NHP в отношении хоминга в сердце и в печень приблизительно в 25,7 раза (AAV VI-15.1) и в 5,9 раза (AAV VI-15.2), соответственно, по сравнению с указанными соотношениями, описанными в литературе (приблизительно 0,02) (Hordeaux et al., 2018). В дополнение к благоприятному распределению векторных геномов в тканях сердца и печени, AAV VI-15.1 и AAV VI-15.2 также вызывали значительную экспрессию трансгена в кардиомиоцитах. Параллельно с этим наблюдалась минимальная экспрессия в печени, в скелетных мышцах и в различных других тканях. Самое главное, что при дозе 10^{13} ВГ/кг массы тела (МТ), AAV VI-15.1 трансдуцировал до 23% клеток сердца приматов.

Из-за межвидовой консервативности специфического для сердца тропизма у крыс и NHP, а также их эффективности в трансдукции кардиомиоцитов человека, полученных из iPSC человека, следует ожидать, что описанный тропизм векторов AAV транслируется в кардиомиоциты человека *in vivo*. Таким образом, применение этих векторов для экспрессии терапевтически релевантных молекул (например, MydGF) может оказаться полезным для разработки эффективных подходов генотерапии при лечении опасных для жизни сердечных заболеваний, для которых в настоящее время доступны лишь ограниченные варианты лечения.

Краткое описание чертежей

На фигуре 1 показаны результаты анализа очищенных векторных штаммов AAV, полученных для исследований биораспределения и экспрессии *in vivo* с использованием крио- и просвечивающей электронной микроскопии с негативным окрашиванием (А) VI-15.1, содержащего трансгенный кластер с активированным белком, флуоресцирующим в

зеленом диапазоне спектра (eGFP) под контролем раннего энхансера цитомегаловируса+промотора куриного β -актина (CAG) и VI-15.2, несущего eGFP под контролем промотора цитомегаловируса (CMV), где указанные векторы визуализировали с помощью просвечивающей криоэлектронной микроскопии (криоПЭМ). Репрезентативные изображения криоПЭМ показывают полноразмерные частицы AAV (черная стрелка) и субпопуляцию пустых частиц (белая стрелка) или дублеты (острие белой стрелки). Наблюдались крупные структуры, отличающиеся от AAV (черная пунктирная стрелка), и некоторая степень контаминации на льду (белая пунктирная стрелка) (верхний уровень А). Статистические данные об упаковке были получены с помощью анализа внутренней плотности на основе изображения (нижний уровень А, В, С). Просвечивающая электронная микроскопия с негативным окрашиванием (nsTEM) иллюстрирует чистоту образца и процент интактных капсидов. (В) Распределение по размерам и относительные концентрации были автоматически обнаружены с помощью изображений на основе nsTEM. (С) Были определены четыре класса частиц; первичные частицы (интактный AAV, показано зеленым), первичные разрушенные частицы (внутренне окрашенные, показано фиолетовым), протеасомоподобные частицы (небольшие примеси, показано синим) и вторичные частицы (с неизвестными примесями различных размеров, показано красным).

На фигуре 2 представлены результаты, полученные в исследованиях распределения векторов и экспрессии генов с использованием VI-15.1 и VI-15.2, полученных в клетках НЕК или Sf9 у мышей. Через три недели после внутривенного введения низкой дозы: 5×10^{12} ВГ/кг МТ, средней дозы: 1×10^{13} ВГ/кг МТ и высокой дозы: 2×10^{13} ВГ/кг МТ мышам C57BL/6, полученные векторные ДНК-копии НЕК, а именно, векторов (А) VI-15.1-CAG-eGFP или (В) VI-15.2-CMV-eGFP количественно определяли в гомогенизированной ткани головного мозга, легкого, сердца, селезенки и печени. Число копий вектора VI-15.1 значительно увеличивалось в головном мозге по сравнению со всеми другими органами при той же дозе (левая панель), **** $p < 0,0001$ (в головном мозге по сравнению с печенью, селезенкой, сердцем и легкими в указанной дозе). Число копий вектора VI-15.2 значительно увеличивалось в легких по сравнению со всеми другими органами при той же дозе, **** $p < 0,0001$ (в легких по сравнению с печенью, селезенкой, сердцем и головным мозгом или для всех доз соответственно ** $p < 0,01$ (в легких по сравнению с головным мозгом в самой высокой дозе). Анализ экспрессии трансгена проводили путем оценки уровня мРНК eGFP в тканях головного мозга, легких, сердца, селезенки и печени, нормализованных к экспрессии мРНК полимераза II в образце. (С) VI-15.1-опосредованная экспрессия eGFP-мРНК в головном мозге и нецелевых контрольных органах, **** $p < 0,0001$ (в головном мозге по сравнению с печенью, селезенкой, сердцем и легкими в указанной дозе). (D) VI-15.2-опосредованная экспрессия eGFP-мРНК в целевых и нецелевых контрольных органах, **** $p < 0,0001$ (в легких по сравнению с печенью, селезенкой, сердцем и головным мозгом в той же дозе). Через две недели после внутривенного введения 10^{11} ВГ/мышь, векторные копии ДНК Sf9, продуцируемые вектором (Е) VI-15.1-CAG-eGFP или (F) VI-15.2-CMV-eGFP, количественно оценивали в гомогенизированной ткани головного мозга, легких и

печени.

На фигуре 3 показаны результаты, полученные после исследования распределения векторов и экспрессии генов у крыс. Показаны дозозависимое биораспределение и зависимость от промотора экспрессия eGFP, опосредованная векторами VI-15.1 и VI-15.2 у крыс Wistar Kyoto. Животные получали низкую дозу (1×10^{13} ВГ/кг) и высокую дозу (5×10^{13} ВГ/кг) векторов (А) VI-15.1-CAG-eGFP и (В) VI-15.2-CMV-eGFP путем внутривенного (i.v.) введения. Через три недели после введения AAV, количество копий ДНК вектора определяли в гомогенизированных образцах тканей сердца, печени, легких, головного мозга и скелетных мышц (sk.m.). Анализ уровней мРНК eGFP показывает зависимость от промотора экспрессию в сердце и в скелетных мышцах, опосредованную векторами (С) VI-15.1-CAG-eGFP и (D) VI-15.2-CMV-eGFP. Анализ экспрессии трансгена проводили путем оценки уровней мРНК eGFP в тканях сердца, печени, легкого, головного мозга и скелетной мышцы, нормализованных по экспрессии мРНК полимеразы II в образце. Все данные представлены в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение, $n=6$ животных в группе. **** $p < 0,0001$ (по сравнению с печенью, легкими, головным мозгом и скелетными мышцами или по показаниям).

На фигуре 4 показаны результаты изучения экспрессии eGFP сердца, опосредованной векторами VI-15.1 и VI-15.2. (А) Горизонтальные срезы целых сердец, залитых в парафин, были окрашены иммуногистохимическим методом с помощью антитела против eGFP после визуализации путем окрашивания DAB, через три недели после внутривенного введения 1×10^{13} ВГ/кг (низкая доза) и 5×10^{13} ВГ/кг (высокая доза) обоих векторов или PBS (контроль) крысам Wistar Kyoto. Каждая секция представляет собой сердце одного животного указанной группы. (В) Количественная оценка площади на основе иммуногистохимического анализа указывает на дозозависимое повышение уровня экспрессии eGFP в кардиомиоцитах. Для количественного анализа площади, данные представлены в виде \pm SD с нанесенными на график точками данных, каждая из которых представляет процент площади, экспрессирующей eGFP, в срезах сердца одного отдельного животного ($n=6$ животных на вектор и $n=5$ на группу, обработанную носителем).

На фигуре 5 показаны результаты анализа распределения векторов и экспрессии генов, опосредованных VI-15.1 и AAV9. Через три недели после внутривенного введения 3×10^{13} ВГ/кг крысам Sprague Dawley, ДНК-копии вектора (А) VI-15.1-CAG-eGFP или (В) AAV9-CAG-eGFP количественно определяли в гомогенизированных образцах ткани сердца, печени, головного мозга, скелетных мышц (ск.м.), легких, почек, поджелудочной железы и селезенки. Данные представлены в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение, $n=8$ животных на группу. **** $p < 0,0001$ (по сравнению с печенью, головным мозгом, ск.м., легкими, почками, поджелудочной железой, селезенкой). (С) Анализ уровней мРНК eGFP показал CAG-регулируемую экспрессию генов, опосредованную векторами VI-15.1 (белые столбцы) и AAV9 (черные столбцы) в различных тканях. Данные представлены в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение, $n=8$ животных на группу. Значения P указывают на значимые величины VI15.1

по сравнению с AAV9 при анализе с помощью t-критерия Стьюдента **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,1$. (D) Индекс эффективности иллюстрирует относительную эффективность экспрессии VI-15.1 по сравнению с AAV9 в отдельных тканях, рассчитанную на основе средних уровней экспрессии РНК.

На фигуре 6 проиллюстрирован специфичный для сердца паттерн экспрессии VI-15.1 по сравнению с широко распространенным профилем экспрессии AAV9 у крыс Wistar Kyoto. (A) Через три недели после внутривенного введения 3×10^{13} ВГ/кг векторов AAV9 (верхняя панель) и VI-15.1 (нижняя панель), целые залитые в парафин срезы ткани, полученные из сердца, печени, ЦНС, легких, почек и поджелудочной железы, окрашивали с помощью иммуногистохимического анализа с использованием антитела против eGFP после визуализации посредством окрашивания DAB. Каждый срез представляет собой репрезентативное окрашивание, полученное с одного среза животного из указанной лечебной группы. (B) Иммуногистохимическое количественное определение области eGFP, проанализированной в отдельных срезах ткани, полученных от контрольной группы, которой вводили PBS, и от животных, которым вводили AAV9 и VI-15.1. Для количественного анализа площади, данные представлены в виде средних значений (числа, изображенные над столбцами) \pm стандартное отклонение ($n=6$ животных на вектор и $n=5$ на группу, обработанную носителем). (C) Относительную эффективность экспрессии VI-15.1 по сравнению с AAV9 в отдельных тканях вычисляли на основе среднего процента трансдуцированной площади путем количественного определения площади и данные представляли в виде индекса эффективности.

На фигуре 7 систематизированы данные о профилях биораспределения и экспрессии транскриптов для векторов VI-15.1 у ННР. Через три недели после внутривенного введения 1×10^{13} ВГ/кг векторов VI-15.1, число копий ДНК вектора и опосредованную вектором экспрессию транскрипта в тканях собакоподобных обезьян количественно определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кол.ОТ-ПЦР). (A) Соответствующие количества копий геномов доставленных векторов VI-15.1 были обнаружены в предсердии (в левом и правом предсердии), в желудочке сердца (в левом и правом желудочке), в печени и селезенке, в то время как другие ткани оставались неизменными. Данные представлены в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение с нанесенными на график отдельными точками данных ($n=3$ животных на группу). (B) Преобладающий вектор VI-15.1 опосредовал экспрессию eGFP-мРНК в предсердии (в левом и правом предсердии), а также в желудочке сердца (в левом и правом желудочке) с последующей некоторой экспрессией в печени. Данные представлены в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение с нанесенными на график отдельными точками данных ($n=3$ животных на группу). (C) Опосредованная вектором VI-15.1 экспрессия eGFP на залитых парафином срезах тканей сердца, печени и головного мозга была оценена путем окрашивания иммуногистохимическим методом с использованием антитела против eGFP после DAB-визуализации. Каждая панель (а-о) отображает репрезентативную область представляющей интерес ткани. Каждая строка

отображает секцию отдельно обработанного животного. (a-c) относится к предсердию, (d-f) относится к желудочку, (g-i) относится к печени, а (j-o) относится к головному мозгу. Размер шкалы масштаба составляет 100 мкм. (D) экспрессия трансгена, опосредованная вектором VI-15.1, в тканях сердца, была проанализирована путем количественного определения площади на основе иммуногистохимического анализа, и (E) был проведен количественный анализ экспрессии eGFP в ткани сердца на основе ELISA (правая панель). Данные представлены в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение с нанесенными на график отдельными точками данных ($n=3$ животных, обработанных вектором VI-15.1, и $n=1$ животное, обработанное PBS).

На фигуре 8 показано биораспределение и экспрессия трансгенов для векторов VI-15.2 у NHP. Через три недели после внутривенного вливания 1×10^{13} ВГ/кг векторов VI-15.2, число копий ДНК вектора и опосредованную вектором экспрессию трансгена в тканях собакоподобных обезьян определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кол.ОТ-ПЦР). (A) Соответствующие количества копий геномов доставленных векторов VI-15.2 были обнаружены в печени и в селезенке, а затем в предсердии (в левом и правом предсердии), в желудочке сердца (в левом и правом желудочке). Некоторые количества геномных копий были обнаружены в скелетных мышцах (sc. muscle), в то время как другие ткани оставались неизменными. Данные представлены в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение с нанесенными на график отдельными точками данных ($n=2$ животных на группу). (B) Преобладающий вектор VI-15.2 опосредовал экспрессию eGFP-мРНК в предсердии (в левом и правом предсердии), а также в желудочке сердца (в левом и правом желудочке) с последующей некоторой экспрессией в скелетной мышце и в печени. Данные представлены в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение с нанесенными на график отдельными точками данных ($n=2$ животных на группу). (C) Опосредованная вектором VI-15.1 экспрессия eGFP на залитых парафином срезах тканей сердца, печени и головного мозга была оценена путем окрашивания иммуногистохимическим методом с использованием антитела против eGFP после DAB-визуализации. Каждая панель (a-h) отображает репрезентативную область представляющей интерес ткани. Каждая строка отображает секцию отдельно обработанного животного. (a-b) относится к предсердию, (b-c) относится к желудочку, (e-f) относится к печени, а (g-h) относится к легким. Размер шкалы масштаба составляет 100 мкм. (D) экспрессия трансгена, опосредованная вектором VI-15.2, в тканях сердца, была проанализирована путем количественного определения площади на основе иммуногистохимического анализа, и (E) был проведен количественный анализ экспрессии eGFP в ткани сердца на основе ELISA (правая панель). Данные представлены в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение с нанесенными на график отдельными точками данных ($n=2$ животных, обработанных вектором VI-15.2, и $n=1$ животное, обработанное PBS).

На Фигуре 9 проиллюстрирована способность AAV9, VI-15.1 и VI-15.2 трансдуцировать и экспрессировать eGFP в кардиомиоцитах человека, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

На фигуре 10 показаны карты плазмид AAV (pAAV) для (A) pAAV-CAG_huMydGF, кодирующей экспрессию MydGF человека под контролем промотора CAG, и (B) pAAV-CAG_huMydGF-RTEL, кодирующей мутантный вариант MydGF (где четыре С-концевых аминокислоты RTEL были удалены) под контролем промотора CAG.

На фигуре 11 показано индуцирование MydGF и мутантного варианта MydGF-RTEL в клетках HEK-293, трансфицированных последовательностью MydGF человека или MydGF-RTEL человека под контролем CAG-промотора, клонированного в экспрессионных конструкциях pAAV, фланкированных инвертированными концевыми повторами (ITR; SEQ ID NO: 16 и 17). Через 48 часов после трансфекции проводили иммуноблот-анализ с использованием антитела против MYDGF и с использованием лизированных клеток HEK-293 или среды. Дорожки содержат клеточный лизат (50 мкг общего белка) или кондиционированную среду (неразведенную).

На фигуре 12 показано гистологическое окрашивание на MydGF вертикального среза цельного сердца крысы Sprague Dawley через три недели после внутривенного вливания $2,5 \times 10^{11}$ ВГ/кг BI-15.1-CAG-MydGF.

На фигуре 13 показано гистологическое окрашивание на MydGF вертикального среза цельного сердца крысы Sprague Dawley через три недели после внутривенного вливания $2,5 \times 10^{12}$ ВГ/кг BI-15.1-CAG-MydGF. Стрелки указывают на области с позитивным окрашиванием MydGF по всему сердцу.

На фигуре 14 показано гистологическое окрашивание на MydGF вертикального среза цельного сердца крысы Sprague Dawley через три недели после внутривенного вливания $2,5 \times 10^{13}$ ВГ/кг BI-15.1-CAG-MydGF. Стрелки указывают на области с позитивным окрашиванием MydGF по всему сердцу.

На фигуре 15 показана экспрессия мРНК MydGF, оцененная в ткани сердца крыс Sprague Dawley. Через три недели после внутривенного вливания низкой дозы ($2,5 \times 10^{11}$ ВГ/кг), средней дозы ($2,5 \times 10^{12}$ ВГ/кг) и высокой дозы ($2,5 \times 10^{13}$ ВГ/кг) BI-15.1-CAG-MydGF, ткань сердца анализировали на экспрессию мРНК MydGF. Дозозависимое увеличение и оцениваемые уровни мРНК MydGF определяли для $2,5 \times 10^{12}$ и $2,5 \times 10^{13}$ ВГ/кг. Данные показаны в виде столбцов (среднее значение) \pm стандартное отклонение. Каждую дозу вводили одному животному, значения ddCT вычисляли с использованием крысиной полимеразы «домашнего хозяйства» 2, n.d.=не детектировалось.

На фигуре 16 показано влияние белковой терапии MydGF и MydGF-RTEL на ремоделирование левого желудочка (ЛЖ) и систолическую дисфункцию у модели инфаркта миокарда с ишемией/реперфузией. Сердечную функцию и ремоделирование ЛЖ оценивали по (A) фракционному изменению площади (FAC) и (B) конечно-систолической площади ЛЖ (LVESA) по сравнению с конечно-диастолической площадью ЛЖ (LVEDA). N=6-8/группу, данные представлены как среднее \pm SEM. ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05 по сравнению с контролем; ####P<0,001, ###P<0,01, MydGF по сравнению с плацебо, #P<0,05 MydGF-RTEL по сравнению с плацебо, данные были получены с помощью одностороннего дисперсионного анализа ANOVA с использованием критерия Тьюки.

На **фигуре 17** показано влияние белковой терапии MydGF и MydGF-RTEL на ангиогенез и размер рубца у модели инфаркта миокарда с ишемией/реперфузией. (А) Ангиогенез оценивали путем определения уровня изолектина В4 (IB4) + пролиферирующих эндотелиальных клеток в пограничной зоне инфаркта. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ по сравнению с контролем; ## $P < 0,01$ MydGF по сравнению с плацебо, ## $P < 0,01$ MydGF-RTEL по сравнению с плацебо. (В) Размер рубца оценивали путем анализа репрезентативных срезов ткани, окрашенных трихромом Мэссона, и площадь представлена в виде % от размера левого желудочка (ЛЖ). ## $P < 0,01$ MydGF дикого типа по сравнению с плацебо, # $P < 0,05$ для усеченного MydGF по сравнению с плацебо, $n=6-8$ /группу, данные представлены как среднее +/- ср.кв.ош. Был использован однофакторный ANOVA с критерием Тьюки.

Описание изобретения

Настоящее изобретение относится к капсидному белку, который обеспечивает специфическую трансдукцию мышечных эндотелиальных клеток для применения в способе лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов, таких как человек. Капсидный белок согласно изобретению обеспечивает специфическую трансдукцию мышечных эндотелиальных клеток, что означает, что после системного введения мышечного вирусного вектора, содержащего такой капсидный белок, векторные геномы предпочтительно накапливаются в эндотелиальных клетках, таких как эндотелиальные клетки головного мозга или легкого. Соответственно, количество векторных геномов в эндотелиальных клетках мышечной ткани, таких как эндотелиальные клетки головного мозга или легкого, превышает количество векторных геномов, которые накапливаются в неэндотелиальных клетках. Предпочтительно, количество векторных геномов, которые можно обнаружить в эндотелиальных клетках мышечной ткани после введения вектора, на 50%, а более предпочтительно, на 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 1000% или даже на 2000% превышает количество векторных геномов, которые накапливаются в неэндотелиальных клетках. Специфичность трансдукции может быть определена количественными методами ПЦР.

Капсидный белок может представлять собой немодифицированный природный белок, встречающийся в вирусе. Однако, предпочтительно, чтобы капсидный белок был модифицирован для модуляции его аффинности к конкретной ткани-мишени, например, путем инсерции пептидной последовательности, которая обеспечивает хоминг в ткань-мишень. Подходящие пептиды, которые обеспечивают селективный хоминг в ткань сердца приматов, представлены здесь как SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2.

Соответственно, особенно предпочтительно, чтобы капсидный белок, используемый для лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов, содержал:

- (а) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2; или
- (с) вариант (а) или (b), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 модификацией одной аминокислоты.

В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к капсидному белку для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у приматов, где указанный капсидный белок содержит:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2; или

(c) вариант (a) или (b), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 модификацией одной аминокислоты,

и где указанный капсидный белок предпочтительно трансдуцирует мышинные эндотелиальные клетки.

Капсидные белки согласно изобретению могут содержать пептидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. В качестве альтернативы можно использовать варианты аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, которые отличаются от соответствующей эталонной аминокислотной последовательности модификацией одной аминокислоты. Модификация может представлять собой замену, делецию или инсерцию аминокислоты при условии, что этот вариант будет сохранять способность опосредовать в составе капсида специфическое связывание вектора с рецепторными структурами мышинных эндотелиальных клеток и/или кардиомиоцитов примата.

Настоящее изобретение охватывает варианты последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, в которых была модифицирована С- или N-концевая аминокислота. Настоящее изобретение также охватывает варианты, в которых одна из аминокислот SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 заменена другой аминокислотой. Предпочтительной заменой является консервативная замена, то есть, замена одной аминокислоты аминокислотой аналогичной полярности, которая сообщает пептиду аналогичные функциональные свойства. Предпочтительно, заменяемая аминокислота относится к той же группе аминокислот, что и аминокислота, которую используют для замены. Так, например, гидрофобный остаток может быть заменен другим гидрофобным остатком, или полярный остаток может быть заменен другим полярным остатком. Функционально сходные аминокислоты, которые могут быть заменены друг другом путем консервативной замены, включают, например, неполярные аминокислоты, такие как глицин, валин, аланин, изолейцин, лейцин, метионин, пролин, фенилаланин и триптофан. Примерами незаряженных полярных аминокислот являются серин, треонин, глутамин, аспарагин, тирозин и цистеин. Примерами заряженных полярных (кислотных) аминокислот являются гистидин, аргинин и лизин. Примерами заряженных полярных (основных) аминокислот являются аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота. Настоящее изобретение также охватывает варианты, в которых аминокислота встроена в пептидную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2. Такие инсерции могут быть введены в любом положении при условии, что полученный вариант будет сохранять способность специфически связываться с рецепторными структурами эндотелиальных клеток мышцы и/или кардиомиоцитов приматов. Настоящее изобретение также охватывает варианты

аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, в которые была введена модифицированная аминокислота. В соответствии с настоящим изобретением, эти модифицированные аминокислоты могут представлять собой аминокислоты, которые были модифицированы путем биотинилирования, фосфорилирования, гликозилирования, ацетилирования, разветвления и/или циклизации.

В приведенных ниже примерах использовали гептамерную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 и две дополнительные аминокислоты на N-конце, глутаминовую кислоту и серин. Последовательность гептамера представлена здесь как SEQ ID NO:3. Однако, с помощью аланинового сканирования можно было продемонстрировать, что две N-концевые аминокислоты не имеют отношения к специфичности трансдукции. Таким образом, только основная структура SEQ ID NO:2 отвечает за специфичность ткани сердца у приматов. Однако, следует отметить, что гептамерная последовательность, представленная здесь как SEQ ID NO:3, представляет собой просто один вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, который может быть использован таким же образом, как и аминокислотная последовательность SEQ ID NO:2 для модификации капсидного белка. Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения, капсидный белок, используемый для лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или ее вариант, который отличается от последовательности SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты.

Таким образом, настоящее изобретение относится к капсидному белку, который является особенно подходящим для доставки терапевтических агентов, таких как вирусные векторы, в ткань сердца примата. Капсидный белок, используемый в способе согласно изобретению, имеет длину от 300 до 800 аминокислот, более предпочтительно от 400 до 800 аминокислот, а еще более предпочтительно от 500 до 800 аминокислот или от 600 до 800 аминокислот. Так, например, капсидный белок, используемый в способе согласно изобретению, может иметь длину по меньшей мере 100 аминокислот, по меньшей мере 200 аминокислот, по меньшей мере 300 аминокислот, по меньшей мере 400 аминокислот, по меньшей мере 500 аминокислот, по меньшей мере 600 аминокислот или по меньшей мере 700 аминокислот.

Капсидный белок может быть получен из любого вируса, который использовался в области генотерапии, но предпочтительно, чтобы капсидный белок, используемый в способе согласно изобретению, был получен из вируса, принадлежащего к семейству *Parvoviridae*. Особенно предпочтительно, чтобы капсидный белок был получен из аденоассоциированного вируса (AAV). AAV может относиться к любому серотипу, описанному в литературе, при этом, капсидный белок предпочтительно происходит от AAV одного из серотипов 2, 4, 6, 8 и 9. Капсидный белок AAV серотипа 2 является особенно предпочтительным.

Капсид AAV дикого типа состоит из капсидных белков VP1, VP2 и VP3, которые кодируются перекрывающимися областями гена *cap*. Все три белка имеют одинаковую C-

концевую область. Капсид AAV содержит приблизительно 60 копий белков VP1, VP2 и VP3, экспрессированных в соотношении 1:1:8. Пептидная последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 или вариант любой из них, как было определено выше, могут быть встроены в любой из капсидных белков VP1, VP2 и VP3, но предпочтительно, чтобы пептидная последовательность была встроена в капсидный белок VP1, а более предпочтительно в капсидный белок VP1 AAV серотипа 2.

Во всех трех капсидных белках AAV были идентифицированы сайты, в которые могут быть встроены пептидные последовательности для обеспечения функции хоминга. Среди прочего, аргинин, находящийся в положении 588 (R588) в белке VP1 AAV2, был специально введен для встраивания пептида в целях хоминга. Это аминокислотное положение вирусного капсида, по-видимому, участвует в связывании AAV2 со своим природным рецептором. Ранее было высказано предположение, что R588 является одним из четырех остатков аргинина, которые опосредуют связывание AAV2 со своим природным рецептором. Таким образом, модификация в этой области капсида помогает ослабить природный тропизм AAV2 или полностью устранить его.

Поэтому, в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно, чтобы пептидная последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 или ее вариант были встроены в область аминокислот 550-600 белка VP1 AAV2, а более конкретно, в области аминокислот 560-600, 570-600, 560-590 или 570-590 белка VP1 AAV2. Аминокислотная последовательность белка VP1 AAV2 дикого типа представлена здесь в SEQ ID NO:4.

В данном случае особенно предпочтительно, чтобы пептидные последовательности были встроены в пептид с помощью буферных последовательностей, приведенных в примерах ниже. Так, например, предпочтительно, чтобы аминокислотная последовательность SEQ ID NO:24 была встроена в капсидный белок, такой как белок VP1 AAV2, для получения капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. Аналогичным образом, предпочтительно, чтобы аминокислотная последовательность SEQ ID NO:25 была встроена в капсидный белок, такой как белок VP1 AAV2, для получения капсидного белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3. В результате модификации последовательности белка, капсидный белок согласно изобретению предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27.

Предпочтительно, чтобы последовательность была встроена в аминокислотную последовательность вирусного капсидного белка, при этом, указанная последовательность содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 или варианта любой из них. Соответственно, в своем особенно предпочтительном аспекте, настоящее изобретение относится к вирусному капсидному белку, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3,

SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 или вариант любой из них. В Таблице 0 описано, как гептамерные последовательности NRGTEWD и ESGHGYF могут быть встроены в вирусный капсид, такой как VP1 AAV2. После положения 588 по отношению к AAV2 дикого типа (SEQ ID NO:4) встраивают гептамерные последовательности, фланкированные соответственно глицином и аланином, которые служат в качестве буфера. В остове AAV2, аспарагин в положении 587 предпочтительно заменен глутамином (N587Q).

Таблица 0:

SEQ ID NO:	Пол. 587	Пол. 588	буфер	гептамер	буфер	
4	QRG N	R		-		QAA
7	QRG Q	R	G	NRGTEWD	A	QAA
8	QRG Q	R	G	ESGHGYF	A	QAA
24		-	G	NRGTEWD	A	-
25		-	G	ESGHGYF	A	-

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 или вариант любой из них могут быть встроены позади (то есть, в направлении С-конца) одной из следующих аминокислот белка VP1, в частности белка VP1 SEQ ID NO:4: 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599 или 600. Особенно предпочтительно, чтобы аминокислотная последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 или вариант любой из них следовали за аминокислотой 588 белка VP1 SEQ ID NO:4 (или за соответствующим положением аминокислоты в другом капсидном белке). В остове AAV2, аспарагин в положении 587 предпочтительно заменен глутамином (N587Q).

Если пептидная последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 или вариант любой из них встроены за предварительно выбранной аминокислотой, например, аминокислотой в положении 588, то может оказаться, что одна или несколько аминокислот, которые являются результатом клонирования, будут расположены между соответствующей аминокислотой VP1 дикого типа и первой аминокислотой последовательности пептида для хоминга (буферной последовательности). Так, например, до 5 аминокислот, то есть 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, могут располагаться между соответствующей аминокислотой VP1 дикого типа и первой аминокислотой пептидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 или варианта любой из них.

Сайты и области аминокислотной последовательности капсидного белка, указанные выше для VP1, могут быть применимы по аналогии с капсидными белками VP2 и VP3 AAV2. Поскольку три капсидных белка VP1, VP2 и VP3 AAV2 отличаются только длиной

N-концевой последовательности и имеют идентичный С-конец, то у специалиста в данной области не возникнет проблем со сравнением последовательностей для идентификации указанных выше сайтов, для встраивания пептидных лигандов в аминокислотные последовательности VP1 и VP2. Так, например, аминокислота 588 в VP1 соответствует положению R451 VP2 (SEQ ID NO:5) и/или положению R386 VP3 (SEQ ID NO:6).

Способы встраивания пептидной последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 или вариантов любой из них в капсидный белок вирусного вектора хорошо известны специалистам в области векторной инженерии. Так, например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептидную последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, может быть клонирована в рамку считывания гена VP1, такого как ген, кодирующий белок VP1 AAV2, представленный в SEQ ID NO:4. Встраивание клонированной последовательности предпочтительно не приводит ни к изменению рамки считывания, ни к преждевременной терминации трансляции. Способы, необходимые для достижения вышеперечисленных целей, находятся в компетенции специалиста, работающего в области векторной инженерии.

В своем особенно предпочтительном аспекте, настоящее изобретение относится к белкам VP1 AAV2, которые были модифицированы путем встраивания пептидной последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 или вариантов любой из них. Так, например, SEQ ID NO:7 представляет собой последовательность белка VP1 AAV2 после введения пептидной последовательности SEQ ID NO:1. Благодаря клонированию, капсидный белок имеет две дополнительные аминокислоты, которых отсутствуют в нативной последовательности белка VP1 AAV2. В частности, пептидная последовательность SEQ ID NO:1 фланкирована на своем N-конце глицином в положении 589 и на своем С-конце аланином в положении 597. Кроме того, аспарагин в положении 587 нативной последовательности заменен глутамином. Аналогично, SEQ ID NO:8 представляет собой последовательность белка VP1 AAV2 после введения пептидной последовательности SEQ ID NO:3. Благодаря клонированию, капсидный белок имеет две дополнительные аминокислоты, которые отсутствуют в нативной последовательности белка VP1 AAV2. Таким образом, пептидная последовательность SEQ ID NO:3 фланкирована на своем N-конце глицином в положении 589 и на своем С-конце аланином в положении 597. Кроме того, аспарагин в положении 587 нативной последовательности заменен глутамином.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения, капсидный белок, используемый для лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов, содержит:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25;
- (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;
- (d) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27; или
- (e) вариант (a), (b), (c) или (d), который отличается от последовательности SEQ ID

NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 или SEQ ID NO:27 модификацией одной аминокислоты.

Особенно предпочтительно, чтобы аминокислотная последовательность SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:25 или вариант любой из них следовали за остатком аспарагина в положении 588 (R588) в белке VP1 AAV2 (или в соответствующем положении аминокислоты в другом капсидном белке).

Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения, капсидный белок для применения в способе согласно изобретению представляет собой белок VP1 AAV2, который был модифицирован путем встраивания пептидной последовательности SEQ ID NO:1 или ее варианта. Этот модифицированный капсидный белок включает:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7;

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, а предпочтительно на 90%, 95% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 по всей ее длине; или

(c) фрагмент одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a) или (b).

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения, капсидный белок для применения в способе согласно изобретению представляет собой белок VP1 AAV2, который был модифицирован путем встраивания пептидной последовательности SEQ ID NO:2 или ее варианта. Этот модифицированный капсидный белок включает:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, а предпочтительно на 90%, 95% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 по всей ее длине;

или

(c) фрагмент одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a) или (b).

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к вирусному капсиду, содержащему по меньшей мере один вышеописанный капсидный белок, для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у индивидуума, нуждающегося в этом. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, вирусный капсид содержит более, чем один вышеописанный капсидный белок, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 капсидных белков. Вирусный капсид предпочтительно получают из AAV, а более предпочтительно, AAV2.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей капсидный белок по любому из пп. 1-9, для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у индивидуума, нуждающегося в этом. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. Предпочтительно, нуклеиновая кислота,

кодирующая капсидный белок согласно изобретению, представляет собой молекулу ДНК. Предпочтительно, нуклеиновая кислота представляет собой одноцепочечную ДНК (оцДНК) или двухцепочечную ДНК (дцДНК), такую как геномная ДНК или кДНК.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к плазмиде, содержащей нуклеиновую кислоту, определенную выше, для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у индивидуума, нуждающегося в этом. Предпочтительно, плазида представляет собой молекулу дцДНК, которая содержит геном полноразмерного вирусного вектора.

Используемые здесь термины «идентичный» или «процент идентичности», если они применяются к двум или более последовательностям нуклеиновых кислот или полипептидов, относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют одинаковую длину и/или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые совпадают при сравнении и выравнивании для оценки максимального соответствия.

Для определения процента идентичности, последовательности выравнивают для достижения оптимального сравнения (например, в первую аминокислотную последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты могут быть введены пробелы для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, как и соответствующее положение во второй последовательности, то эти молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных положений, общих для этих последовательностей (то есть, $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{количество идентичных положений}}{\text{общее количество положений}} \times 100$). В некоторых вариантах осуществления изобретения, две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после того, как в последовательности были введены пробелы, если это необходимо (например, за исключением дополнительной последовательности, выходящей за пределы сравниваемых последовательностей).

Термин «% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: X по длине SEQ ID NO: X» означает, что выравнивание должно охватывать всю длину последовательности SEQ ID NO: X (эталонной последовательности). В случае, если алгоритмы, упомянутые ниже, не обеспечивают выравнивание по всей длине эталонной последовательности с тестируемой последовательностью, а только по подпоследовательности указанной эталонной последовательности, то аминокислотные остатки в эталонной последовательности, которые не имеют идентичного аналога на тестируемой последовательности, рассматриваются как несоответствие. Затем корректируют показатель процента идентичности, заданный указанным алгоритмом: если алгоритм дает K идентичных аминокислот при длине выравнивания, равной L аминокислот,

и дает процент идентичности $K/L*100$, то L заменяется числом аминокислот эталонной последовательности, если это число больше, чем L . Так, например, если тестируемая последовательность имеет на N -конце на одну аминокислоту меньше, чем эталонная последовательность SEQ ID NO:7 (но в остальном она идентична, за исключением этого различия), то процент идентичности $743/744*100\% \approx 99,8\%$. То же самое относится и к последовательностям нуклеиновых кислот.

Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, модифицированный Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиск нуклеотидов BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST, оценка=100, длина слова=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющий интерес белок. Поиск белков BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные представляющему интерес белку. Для обеспечения выравниваний с пробелами в целях сравнения можно использовать программу Gapped BLAST, как описано Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. В качестве альтернативы, PSI-Blast можно использовать для повторного поиска, который обнаруживает отдаленные взаимосвязи между молекулами (там же). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного пакета выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весовых остатков PAM120, штраф за длину пробела 12 и штраф за пробел 4. Дополнительные алгоритмы анализа последовательности известны специалистам в данной области и включают ADVANCE и ADAM, как описано у Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; и FASTA как описано Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. В программе FASTA, $ktup$ представляет собой параметр управления, который устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если $ktup=2$, то сходные области в двух сравниваемых последовательностях обнаруживают путем просмотра пар выровненных остатков, а если $ktup=1$, то оценивают одиночные выровненные аминокислоты. $ktup$ может быть установлен на 2 или 1 для белковых последовательностей или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. Значение по умолчанию, если $ktup$ не указан, равно 2 для белков и 6 для ДНК. Альтернативно, выравнивание

белковых последовательностей можно проводить с использованием алгоритма CLUSTAL W, как описано у Higgins et al., 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусному вектору для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у индивидуума, нуждающегося в этом, где вектор содержит капсид и упакованный в него трансген, при этом, капсид содержит по меньшей мере один белок капсида, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или ее вариант, который отличается от последовательности SEQ ID NO:1 модификацией одной аминокислоты. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусному вектору для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у индивидуума, нуждающегося в этом, где вектор содержит капсид и упакованный в него трансген, при этом, капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или ее вариант, который отличается от последовательности SEQ ID NO:2 модификацией одной аминокислоты. В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусному вектору для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у индивидуума, нуждающегося в этом, где вектор содержит капсид и упакованный в него трансген, при этом, капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или ее вариант, который отличается от последовательности SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусному вектору для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у индивидуума, нуждающегося в этом, где вектор содержит капсид и упакованный в него трансген, при этом, капсид содержит по меньшей мере один белок капсида, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24 или ее вариант, который отличается от последовательности SEQ ID NO:24 модификацией одной аминокислоты. В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусному вектору для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у индивидуума, нуждающегося в этом, где вектор содержит капсид и упакованный в него трансген, при этом, капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25 или ее вариант, который отличается от последовательности SEQ ID NO:25 модификацией одной аминокислоты.

Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе согласно изобретению предпочтительно представляет собой рекомбинантный вектор AAV. Вектор AAV может быть получен из AAV любого серотипа, например, серотипа 2, 4, 6, 8 или 9. Однако, наиболее предпочтительно, чтобы рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе согласно изобретению был получен из AAV серотипа 2. Различные серотипы AAV различаются главным образом по своему природному тропизму. Таким образом, AAV2 дикого типа легче связывается с альвеолярными клетками, в то время как AAV5, AAV6 и AAV9 в основном инфицируют эпителиальные клетки. Специалист в данной области может

воспользоваться этими естественными различиями в специфичности клеток для дальнейшего повышения специфичности, опосредованной пептидами согласно изобретению, для определенных клеток или тканей. На уровне нуклеиновых кислот, различные серотипы AAV являются в высокой степени гомологичными. Так, например, серотипы AAV1, AAV2, AAV3 и AAV6 идентичны на 82% на уровне нуклеиновых кислот.

Хоминг в печень является общим, но неблагоприятным признаком многих, если не большинства векторов AAV, тестируемых в настоящее время на эффективность генотерапии сердца. Таким образом, было бы очень желательно снизить степень хоминга вектора в печень и другие ткани. Векторы согласно изобретению VI-15.1 и VI-15.2 ассоциируются со значительно сниженным хомингом в печень по сравнению с AAV9. Чтобы продемонстрировать этот факт, количество векторных геномов (которое соответствует количеству частиц вектора AAV) было определено в сердце, в печени и в различных других тканях ННР, которые ранее были инфицированы векторами VI-15.1 или VI-15.2. Затем вычисляли отношение количества векторов в сердце:печени или в сердце:ткани и использовали его в качестве индикатора эффективности хоминга в сердце. Абсолютное значение генома вектора AAV в сердце ННР определяли с использованием препаратов ДНК, полученных из лизатов тканей четырех различных гистологических областей сердца, а именно, левого предсердия, правого предсердия, левого желудочка и правого желудочка. Абсолютное число геномов вектора AAV в печени определяли на основе препаратов ДНК, полученных из лизатов тканей среза средней доли печени. Абсолютное число геномов вектора AAV в почке определяли на основе препаратов ДНК, полученных из лизатов тканей коркового и мозгового вещества. Абсолютное число геномов вектора AAV в легком определяли на основе препаратов ДНК, полученных из лизатов тканей бронхов, бронхиол и альвеол. Абсолютное число геномов вектора AAV в головном мозге определяли на основе препаратов ДНК, полученных из лизатов тканей следующих восьми анализируемых областей: центрального сплетения, желудочка мозга, ствола головного мозга, коры, мозжечка, гиппокампа, гипоталамуса и полосатого тела. Абсолютное число геномов вектора AAV в скелетной мышце определяли на основе препаратов ДНК, полученных из лизатов тканей *Musculus gastrocnemius*. Абсолютное число геномов вектора AAV в глазах определяли на основе препаратов ДНК, полученных из лизатов тканей сетчатки. Количественную оценку векторных геномов проводили с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кол.ПЦР) с использованием трансгенных плазмид в качестве эталонного стандарта.

Соотношение векторов в сердце:печени или в сердце:ткани у каждого отдельного животного использовали для вычисления среднего отношения VI-15.1 и VI-15.2 в сердце:ткани (см. Таблицу ниже). AAV VI-15.1 имел более благоприятное соотношение хоминга в сердце:печени у ННР по сравнению с AAV VI-15.2 (0,515 против 0,119). Этот вектор также имел более благоприятное соотношение хоминга в сердце:ткани по сравнению с AAV VI-15.2 в различных тестируемых тканях. Если сравнить вычисленные отношения в сердце:печени с соответствующими отношениями, вычисленными для AAV9

(отношение в сердце:печени, сообщаемое для AAV9 у NHP, составляет приблизительно 0,02 (Hordeaux et al., 2018), то можно сделать вывод, что VI-15.1 превосходит AAV9 приблизительно в 25,7 раза, а VI-15.2 превосходит AAV9 приблизительно в 5,9 раза.

Вектор	Печень	Почка	Ск. мышца	Легкое	Головной мозг	Спинной мозг	Яичники	Матка	Глаз
VI-15.1	0,52	52	26	18	105	239	334	24	91
VI-15.2	0,12	12	4	4	15	28	63	25	34

Таблица 1: Указаны средние отношения в сердце:тканях [количество копий генома вектора на 100 нг ДНК хозяина, находящихся в сердце, деленное на количество копий вектора, находящихся в указанных тканях, на 100 нг ДНК хозяина], а данные представляют собой средние значения, полученные для срезов тканей для n=3 (VI-15.1) или n=2 (VI-15.2) NHP.

Для терапевтических целей, у приматов, а предпочтительно у человека, предпочтительно использовать вирусные векторы, имеющие капсид, который содержит по меньшей мере один капсидный белок, как определено выше, например, капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1, 2, 3, 24, 25, 26 или 27, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична любой из них. Также предпочтительно, чтобы при введении приматам NHP, вирусные векторы давали увеличение числа геномов вектора в сердце NHP по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, или по меньшей мере в 4 раза по сравнению с одной или несколькими из следующих тканей того же животного, а именно, тканей почки, скелетных мышц, легких, головного мозга, спинного мозга, яичника, матки или глаза. В конкретном предпочтительном варианте осуществления изобретения, количество геномов вектора в сердце NHP будет по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза или по меньшей мере в 4 раза выше, чем во всех следующих тканях того же животного, таких, как ткани почки, скелетных мышц, легких, головного мозга и спинного мозга. Особенно предпочтительно, чтобы число векторных геномов в сердце NHP представляло собой среднее значение, которое определяется на основе числа векторных геномов, определенных в левом предсердии, в правом предсердии, в левом желудочке и в правом желудочке сердца.

Также предпочтительно, чтобы после введения крысам, вирусные векторы давали увеличению количества геномов вектора в сердце крысы по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, или по меньшей мере в 4 раза, чем в одной или нескольких из следующих тканей того же животного, а именно, тканей почки, скелетных мышц, легких, головного мозга, спинного мозга, яичника, матки или глаза. В конкретном предпочтительном варианте осуществления изобретения, количество геномов вектора в сердце крысы будет по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза или по меньшей мере в 4 раза выше, чем во всех нижеследующих тканях того же животного, а

именно, в тканях почек, скелетных мышц, легких, головного мозга и спинного мозга. Особенно предпочтительно, чтобы число векторных геномов в сердце крысы представляло собой среднее значение, определяемое по числу векторных геномов в левом предсердии, в правом предсердии, в левом желудочке и в правом желудочке сердца.

Кроме того, при использовании в терапевтических целях, у приматов, а предпочтительно у человека, вирусные векторы, имеющие капсид, который содержит по меньшей мере один капсидный белок, как определено выше, например, капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:1, 2, 3, 24, 25, 26 или 27, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична любой из них, предпочтительно трансдуцируют клетки ткани сердца, а в частности, кардиомиоциты NHP или крыс с более высокой специфичностью, чем вектор AAV9. Соответственно, отношение в сердце:печени будет выше по сравнению с NHP или крысами, которым вводили вектор AAV9. Предпочтительно, отношение вирусного вектора, содержащего по меньшей мере один капсидный белок согласно изобретению, в сердце:печени, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз или по меньшей мере в 10 раз выше, чем отношение AAV9 в сердце:печени. Особенно предпочтительно, чтобы число векторных геномов в сердце NHP или крысы представляло собой среднее значение, которое определяется по числу векторных геномов, определенных в левом предсердии, в правом предсердии, в левом желудочке и в правом желудочке сердца.

Вирусные векторы с капсидами, которые содержат по меньшей мере один капсидный белок, как определено выше, специфически трансдуцируют мышечные эндотелиальные клетки, а также клетки ткани сердца, а в частности, кардиомиоциты крыс и приматов. Это означает, что вирусные векторы согласно изобретению имеют по меньшей мере приблизительно 50%, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 95% отношение копий вектора BI-15.1 или BI-15.2 в сердце:печени или отношение экспрессии GFP в сердце:печени, как было определено у NHP, таких как макаки (как показано на фигурах 7 и 8).

В соответствии с настоящим изобретением также предпочтительно, чтобы векторы с капсидными белками, содержащими вариант аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:1, 2, 3, 24 или 25, имели по меньшей мере приблизительно 50%, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 95% отношение копий вектора BI-15.1 или BI-15.2 в сердце:печени или отношение экспрессии GFP в сердце:печени, как было определено у NHP, таких как макаки (как показано на фигурах 7 и 8).

Рекомбинантный вирусный вектор согласно изобретению содержит упакованный в него трансген. Используемый здесь термин «трансген» относится к гену, который был введен с помощью генной инженерии в геном вектора и который обычно не принадлежит геному вируса. Трансген, упакованный в рекомбинантный вирусный вектор для

применения в способе согласно изобретению, может присутствовать в форме одноцепочечной или двухцепочечной ДНК (оцДНК или дцДНК). Он может кодировать любой белок, который может быть полезен при лечении или профилактике сердечных заболеваний, таких как кардиомиопатия. Так, например, трансген может кодировать белок, выбранный из группы факторов репарации ткани сердца, регуляторов кальция или проангиогенных факторов. В одном варианте осуществления изобретения, трансген кодирует фактор репарации ткани сердца, такой как человеческий миелоидный фактор роста (huMydGF). Сообщалось, что этот фактор роста, продуцируемый моноцитами и макрофагами, способствует восстановлению функции сердца после инфаркта миокарда (WO 2014/111458, Korf-Klingebiel et al. (2015, 2021), Ebenhoch et al. 2019, WO 2021/148411). Аминокислотная последовательность huMydGF, включающая сигнальную последовательность, представлена здесь как SEQ ID NO:18 (без сигнальной последовательности она представлена здесь как SEQ ID NO:33). Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая этот белок, представлена здесь как SEQ ID NO:19. В одном варианте осуществления изобретения, трансген, упакованный в рекомбинантный вирусный вектор или используемый в способе согласно изобретению, кодирует белок huMydGF:

- который содержит аминокислотную последовательность или предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18 по всей ее длине, или

- который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33 по всей ее длине.

Так, например, трансген, упакованный в рекомбинантный вирусный вектор для использования в способе согласно изобретению, может содержать (или состоять из нее) последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:19 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:19 по всей ее длине.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, может оказаться предпочтительным экспрессировать huMydGF в виде мутантного белка, в котором отсутствуют четыре С-концевые аминокислоты, представленные в SEQ ID NO:18 (RTEL), которые представляют собой предполагаемый сигнал удерживания в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР)/аппарате Гольджи (Bortnov et al., 2019). Сигналы удерживания в ЭР/аппарате Гольджи известны специалистам в данной области (см., например, Capitani & Sallèse (2009)).

Аминокислотная последовательность huMydGF, включающая сигнальную

последовательность, но не содержащая С-концевые аминокислоты RTEL, представлена здесь как SEQ ID NO:20 (аминокислотная последовательность huMydgf без сигнальной последовательности представлена здесь как SEQ ID NO:34). Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая этот мутантный белок, представлена здесь как SEQ ID NO:21. Следовательно, в другом варианте осуществления изобретения, трансген, упакованный в рекомбинантный вирусный вектор для использования в способе согласно изобретению, кодирует белок huMydgf:

- который содержит аминокислотную последовательность или предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:20 или аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, а предпочтительно по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20 по всей ее длине, или

- который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, а предпочтительно по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34 по всей ее длине, и в котором отсутствует функциональный сигнал удерживания в ЭР/аппарате Гольджи.

Так, например, трансген, упакованный в рекомбинантный вирусный вектор для использования в способе согласно изобретению, может содержать (или состоять из нее) последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:21 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, а предпочтительно по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:21 по всей ее длине.

В другом варианте осуществления изобретения, трансген кодирует регулятор кальция, выбранный из группы, состоящей из белков-регуляторов кальция саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума Ca^{2+} -АТФазы 2а (SERCA2а), низкомолекулярного родственного убихитину модификатора 1 (SUMO1) и кальций-связывающего белка S100 A1 (S100A1). В еще одном варианте осуществления изобретения, трансген кодирует проангиогенный фактор роста эндотелия сосудов (VEGF).

Лечение пациентов с сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса путем проведения генотерапии, обеспечивающей экспрессию Serca2a, дало положительные результаты в клиническом испытании (называемом Cupid 1, то есть, Исследование эффективности и безопасности генетически нацеленной ферментной заместительной терапии при прогрессирующей сердечной недостаточности, Идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT00454818). Снижение уровня изоформы Ca^{2+} -АТФазы саркоэндоплазматического ретикулума (SERCA2а) является типичной патологией у пациентов с сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса (HFref).

Как описано в настоящей заявке, экспрессия SERCA2а из генного кластера AAV, упакованного в AAV1 и вводимого чрескожно, давала многообещающие данные по восстановлению уровней и функции SERCA2а (Zsebo et al. (2014)). Последующее

исследование CUPID 2-b (Исследование генетически нацеленной ферментной заместительной терапии прогрессирующей сердечной недостаточности (CUPID-2b, идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT01643330)), к сожалению, не дало многообещающих результатов, несмотря на превосходные данные по безопасности. Было высказано предположение, что различные производственные процессы, проводимые для исследования CUPID 2-b, могут быть частично ответственны за недостаточную эффективность. Уровни ДНК в сердечной мышце, оцененные у пациентов, включенных в программу испытаний CUPID 2, составляли от 10 до 192 копий оцДНК на мкг человеческой ДНК, в то время как доклинические данные показали эффективность доставки от 8000 до 42000 копий вирусной ДНК на мкг ДНК хозяина (Lyon et al. (2020)).

В целом, высокие дозы AAV1, вводимые чрескожно, считались безопасными, но со значительным снижением количества ДНК, доставляемой в сердце пациента, по сравнению с неклиническими исследованиями. Таким образом, предполагается, что необходимо повысить эффективность и селективность трансдукции вектора AAV в сердце (Bass-Stringer et al. (2018)), и также предполагается, что доставка пока еще остается основной проблемой (Yamada et al. (2020)) и что улучшенная, более высокая эффективность трансдукции, усиленная экспрессия и доставка SERCA2a с более высоким числом копий в сердечную мышцу должны давать клинически благоприятные уровни SERCA2a и сопутствующие уровни Ca^{2+} (Greenberg et al. (2016)).

Аналогичным образом, в исследовании CUPID 3, начатом в 2021 году (повышение уровня кальция путем чрескожного введения препаратов для генотерапии при сердечно-сосудистых заболеваниях (CUPID-3), идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT04703842), точную конструкцию (AAV1, экспрессирующую SERCA2a) вносят в три раза более высокой дозе ($3 \times E13$) по сравнению с CUPID 2 для улучшения доставки вектора в сердечную мышцу. В качестве альтернативы можно сказать, что новый вектор, который обеспечит более эффективную трансдукцию сердечной мышцы человека при более низкой дозе в сочетании с улучшенным биораспределением, позволит создать более безопасный и эффективный лекарственный продукт.

Альтернативно, трансген вирусного вектора для применения в способе согласно изобретению может кодировать микроРНК (миРНК). МикроРНК предпочтительно представляет собой микроРНК, которая участвует в регуляции пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), пути MYOD, пути FOXO3 или пути ERK-МАРК. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения, микроРНК, кодируемая трансгеном вирусного вектора для применения в способе согласно изобретению, выбрана из группы, состоящей из miR-378, miR669a, miR-21, miR212 и miR132.

Трансген вирусного вектора для применения в способе согласно изобретению может кодировать ген, который должен дополнять соответствующий дефектный ген у индивидуума, подлежащего лечению. Соответственно, вирусный вектор, содержащий трансген, используют в генотерапии. Такой трансген может кодировать белок, выбранный из группы, состоящей из тяжелой цепи бета-миозина (MYH7), белка С, связывающегося с

миозином (MYBPC3), тропонина I (TNNT3), тропонина T (TNNT2), цепи альфа-1 тропомиозина (TPM1) или легкой цепи миозина (MYL3).

Кроме того, вирусные векторы согласно изобретению могут также содержать трансгены, кодирующие секреторные белки, предназначенные для системного введения в кровотоки. Такие секреторные белки могут эффективно доставляться в кровотоки через легочное капиллярное русло, являющееся частью сердечно-сосудистой системы.

Трансген может присутствовать в вирусном векторе в виде одной или нескольких экспрессионных кластеров. Экспрессионный кластер обычно содержит, кроме трансгена, промотор и сигнал полиаденилирования. Промотор функционально связан с трансгеном. Подходящий промотор может быть селективно или конститутивно активен в ткани сердца, а в частности, в кардиомиоцитах. Неограничивающие примеры подходящих промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор цитомегаловируса (CMV) или гибридный промотор куриного бета-актина/цитомегаловируса (CAG, SEQ ID NO:14), промотор, специфичный для эндотелиальных клеток, такой как VE-кадгеринный промотор, а также промоторы стероидов и промоторы металлотioneина. В особенно предпочтительном варианте изобретения, промотор, функционально связанный с трансгеном, представляет собой промотор CAG. В другом предпочтительном варианте, промотор, функционально связанный с трансгеном, представляет собой промотор CMV. В еще одном предпочтительном варианте, промотор, функционально связанный с трансгеном, представляет собой промотор, специфичный для кардиомиоцитов. При использовании промотора, специфичного для кардиомиоцитов, специфичность вирусных векторов согласно изобретению в отношении ткани сердца может быть дополнительно повышена. Используемый здесь промотор, специфичный для кардиомиоцитов, представляет собой промотор, активность которого в кардиомиоците по меньшей мере в 2, 5, 10, 20, 50 или 100 раз выше, чем в клетке, которая не является кардиомиоцитом. Экспрессионный кластер может также включать энхансерный элемент для увеличения уровней экспрессии экзогенного белка, который должен быть экспрессирован. Кроме того, экспрессионный кластер может включать последовательности полиаденилирования, такие как последовательности полиаденилирования SV40 (SEQ ID NO:15) или последовательности полиаденилирования бычьего гормона роста.

Вирусный вектор согласно изобретению, такой как VI-15.1 или VI-15.2, может быть введен примату, нуждающемуся в лечении, различными способами, подробно описанными в литературе. Так, например, вирусный вектор может быть получен для различных способов введения, например, для внутривенной инъекции или внутривенной инфузии. Введение может быть осуществлено, например, путем внутривенной инфузии, например, в течение 60 минут, в течение 30 минут или в течение 15 минут. В качестве альтернативы, вирусный вектор можно также вводить местно в сердце, например, путем внутримиокардиального, внутривентрикулярного, внутрисосудистого, трансваккулярного введения или путем введения в область передней нисходящей артерии левого желудочка (LAD) путем селективной ретроинфузии с регулируемым давлением в переднюю межжелудочковую

вену.

Композиции, подходящие для введения путем инъекции или инфузии, обычно включают растворы и дисперсии или порошки, из которых можно приготовить растворы и дисперсии. Такие композиции будут содержать вирусный вектор в сочетании по меньшей мере с одним подходящим фармацевтически приемлемым носителем. Подходящие фармацевтически приемлемые носители для внутривенного введения включают бактериостатическую воду, раствор Рингера, физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер (PBS) и Stermophor EL™. Стерильные композиции для инъекции и/или инфузии могут быть приготовлены путем введения вирусного вектора в необходимом количестве в соответствующий носитель с последующей стерилизацией фильтрованием. Композиции для введения путем инъекции или инфузии должны оставаться стабильными в условиях хранения после их приготовления в течение длительного периода времени. Для этой цели композиции могут содержать консервант. Подходящие консерванты включают хлорбутанол, фенол, аскорбиновую кислоту и тимеросал. Приготовление соответствующих составов и подходящих адъювантов описано, например, в руководстве «Remington: The Science and Practice of Pharmacy», Lippincott Williams & Wilkins; 21-е издание (2005). В соответствии с настоящим изобретением предпочтительно, чтобы вирусный вектор согласно изобретению был приготовлен для внутривенного введения.

Точное количество вирусного вектора, которое необходимо ввести для достижения терапевтического эффекта, зависит от нескольких параметров. Факторы, влияющие на количество вводимого вирусного вектора, включают, например, способ введения вирусного вектора, природу и тяжесть заболевания, историю болезни индивидуума, который проходит лечение, а также возраст, массу тела, рост и состояние здоровья пациента, проходящего лечение. Кроме того, уровень экспрессии трансгена, необходимый для достижения терапевтического эффекта, иммунный ответ пациента, а также стабильность генного продукта имеют важное значение для вводимого количества. Терапевтически эффективное количество вирусного вектора может быть определено специалистом в данной области на основе общих знаний и настоящего описания. Вирусный вектор предпочтительно вводят в количестве, соответствующем дозе вируса в диапазоне от $1,0 \times 10^8$ до $1,0 \times 10^{15}$ ВГ/кг (геномов вируса на кг массы тела), хотя более предпочтительным является диапазон от $1,0 \times 10^{10}$ до $1,0 \times 10^{15}$ ВГ/кг, от $1,0 \times 10^{12}$ до $5,0 \times 10^{14}$ ВГ/кг или от $1,0 \times 10^{11}$ до $1,0 \times 10^{13}$ ВГ/кг. Количество вводимого вирусного вектора, такого как, например, вектор AAV2 согласно изобретению, можно регулировать в соответствии с интенсивностью экспрессии одного или нескольких трансгенов.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения вирусного вектора, в котором используется плаزمид, кодирующий капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 или вариант любой из них. Так, например, вирусный вектор может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8. Вирусные векторы согласно изобретению могут быть получены в соответствии с

хорошо известными способами, описанными в литературе. Так, например, основной способ получения рекомбинантных векторов AAV, содержащих трансген, подробно описан в литературе (Xiao et al., 1998). Так, например, клетки НЕК 293-Т трансфицируют тремя плазмидами. Первая плазида содержит области *cap* и *rep* генома AAV, но встречающиеся в природе инвертированные повторы (ITR) отсутствуют. Вторая плазида содержит экспрессионный кластер трансгена, который фланкирован соответствующими ITR, составляющими сигнал упаковки. Таким образом, экспрессионный кластер упаковывается в капсид в процессе сборки вирусных частиц. Третья плазида представляет собой аденовирусную хелперную плазмиду, которая кодирует хелперные белки E1A, E1, E2A, E4-*orf6*, VA, необходимые для репликации AAV в клетках НЕК 293-Т. В качестве альтернативы также возможно получение векторов AAV в клетках насекомых. Подходящие способы получения вирусных векторов в клетках насекомых Sf9 описаны, например, в WO 2015/158749 или US 20170029464A1. Чистота вирусных векторов может быть оценена подходящими методами, такими как ПЦР-амплификация. Вирусные векторы согласно изобретению могут быть очищены, например, гель-фильтрацией или ультрацентрифугированием в градиенте хлорида цезия или йодиксанола. Вирусные векторы, используемые для введения, в основном не должны содержать вирусы дикого типа и вирусы, компетентные по репликации.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к клетке, содержащей капсидный белок, кодирующую его нуклеиновую кислоту, плазмиду, содержащую такую нуклеиновую кислоту, или рекомбинантный вирусный вектор, как описано выше, для применения в способе лечения или профилактики сердечного заболевания или расстройства. Клетка предпочтительно представляет собой клетку человека или клеточную линию. В одном варианте осуществления изобретения, клетка была получена, например, от человека путем биопсии, а затем трансфицирована вирусным вектором *ex vivo*. Затем клетка может быть повторно имплантирована или доставлена индивидууму другими способами, например, путем трансплантации или инфузии. Вероятность отторжения трансплантированных клеток ниже, если индивидуум, от которого были получены клетки, генетически подобен индивидууму, которому вводят эту клетку. Поэтому предпочтительно, чтобы индивидуум, которому вводят трансфицированные клетки, был индивидуумом, от которого ранее были получены эти клетки. Клетка предпочтительно представляет собой клетку ткани сердца человека, а в частности кардиомиоцит человека. Клеткой, подлежащей трансфекции, также может быть стволовая клетка, такая как стволовая клетка взрослого человека. В соответствии с настоящим изобретением особенно предпочтительно, чтобы трансфицируемые клетки представляли собой аутологичные клетки, которые были трансфицированы *ex vivo* вирусным вектором согласно изобретению, например, рекомбинантным вектором AAV2, описанным выше.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей капсидный белок, нуклеиновую кислоту, плазмиду или рекомбинантный вирусный вектор, как определено выше, для применения в способе

лечения или профилактики заболевания сердца у приматов. Заболевание сердца, которое необходимо лечить, предпочтительно представляет собой кардиомиопатию.

Настоящее изобретение относится к применению капсидного белка, нуклеиновой кислоты, плазмиды, рекомбинантного вирусного вектора или фармацевтической композиции, как определено выше, для лечения или профилактики заболевания сердца у приматов. Заболевание сердца, которое необходимо лечить, предпочтительно представляет собой кардиомиопатию. Кардиомиопатию предпочтительно выбирают из группы, состоящей из гипертрофической кардиомиопатии (HCM), дилатационной кардиомиопатии (DCM), аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (ARVC), рестриктивной кардиомиопатии (RCM) и некомпактной кардиомиопатии левого желудочка (LVNC). В Таблице 1 представлен обзор терапевтически активных белков, подходящих для лечения кардиомиопатии у человека.

Индивидуумом, подлежащим лечению, является человек или примат, не являющийся человеком. Приматами, не являющимися человеком, являются, но не ограничиваются ими, обезьяны, беличьи обезьяны, совинолицые мартышки, павианы, шимпанзе, игрунки, гориллы, человекообразные обезьяны, лемуры, макаки и гиббоны. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, приматом, отличающимся от человека, является шимпанзе. Кроме того, в данном контексте, человекообразный примат включает человека.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению капсидного белка, нуклеиновой кислоты, плазмиды, рекомбинантного вирусного вектора или фармацевтической композиции, как определено выше, в целях приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов. Заболевание сердца, которое необходимо лечить, предпочтительно представляет собой кардиомиопатию.

Таблица 1: Неисчерпывающий список мишеней для кардиомиопатии

Мишень	Тип молекулы	Предполагаемый действие/эффект	вариант	Терапевтический подход	Ссылки
Миелинный фактор роста (myDGF)	Белок	Проангиогенный/ пролиферативный		Дополнение	Korf-Klimgenbeil et al. 2016
Кальций-АЕФаза 2a саркоплазматического /эндоплазматического ретикулума (SERCA2a)	Белок	Регуляция кальция		Дополнение	Chamberlain et al.2017
Небольшой родственный убихитину модификатор 1 (SUMO1)	Белок	Регуляция кальция		Дополнение	Chamberlain et al.2017
Кальций-связывающий белок S100 A1 (S199A1)	Белок	Регуляция кальция		Дополнение	Chamberlain et al.2017
Васкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF)	Белок	Проангиогенный		Дополнение	Chamberlain et al.2017
miR-378	МикроРНК	Проапоптотический		Ингибирование	Xu et al.2016
miR669a	МикроРНК	Прорегенеративный		Сверхэкспрессия	Pang et al.2019
miR-21	МикроРНК	Профибротический		Ингибирование	Xu et al.2012
miR-212	МикроРНК	Ремоделирование сердца		Ингибирование	Ucar et al. 2012
miR-132	МикроРНК	Кардиопротективный		Сверхэкспрессия	Folinquinos et al.2020
Тяжелая цепь бета-миозина (MyH7)	ДНК	Структурный мышечный белок		Дополнение	Chamberlain et al.2017
Миозин-связывающий белок С (MYBPC3)	ДНК	Структурный мышечный белок		Дополнение	Chamberlain et al.2017
Тропонин I(TNNI3)	ДНК	Структурный мышечный белок		Дополнение	Chamberlain et al.2017
Тропонин T(TNNI2)	ДНК	Структурный мышечный белок		Дополнение	Chamberlain et al.2017
Цепь альфа-1 тропомиозина (TPM1)	ДНК	Структурный мышечный белок		Дополнение	England et al.2017
Легкая цепь миозина (MYL3)	ДНК	Структурный мышечный белок		Дополнение	Chamberlain et al.2017

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания сердца у примата, где указанный способ включает введение вирусного вектора согласно изобретению, предпочтительно вектора AAV, как описано выше, примату, такому как человек или примат, не являющийся человеком. Вектор предпочтительно содержит капсид, который имеет по меньшей мере один капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2, или вариант любой из них. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения, вектор содержит капсид, который имеет по меньшей мере один капсидный белок, содержащий аминокислотную последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8, или фрагмента любой из них. Вирусный вектор предпочтительно дополнительно содержит трансген, например, ген, кодирующий терапевтический белок, который может быть использован для лечения или профилактики заболеваний сердца. После введения примату, вектор обеспечивает специфическую экспрессию трансгена в клетках ткани сердца примата.

Дополнительные варианты осуществления изобретения описаны ниже.

В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к капсидному белку, который обеспечивает специфическую трансдукцию мышечных эндотелиальных клеток для применения в способе лечения или профилактики сердечного заболевания у приматов, где указанный способ лечения или профилактики сердечного заболевания включает трансдукцию кардиомиоцитов приматов. WO 2019/199867 относится к использованию AAV 15.1, но не к трансдукции кардиомиоцитов приматов. Органом-мишенью для генотерапии, опосредованной вирусными векторами, описанными в WO 2019/199867, явно не является сердце.

Во втором своем варианте, настоящее изобретение относится к капсидному белку для применения в способе лечения или профилактики болезни сердца у приматов, где указанный способ лечения или профилактики болезни сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов приматов, где указанный капсидный белок содержит:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или 3; или
- (c) вариант (a) или (b), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты.

В своем четвертом варианте, настоящее изобретение относится к капсидному белку для применения в способе лечения или профилактики кардиомиопатии, где указанный капсидный белок содержит:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или 3; или
- (c) вариант (a) или (b), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты.

Так, например, капсидный белок может быть частью вирусного вектора, который доставляет huMydGF в сердце и, более конкретно, трансдуцирует кардиомиоциты.

Специалистам известно применение huMydgd для лечения кариомипатии (WO 2014/111458, Korf-Klingebiel et al. (2015, 2021), Ebenhoch et al. 2019, WO 2021/148411).

В своем пятом варианте, настоящее изобретение относится к к капсидному белку для применения в способе любого из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения, где указанный капсидный белок имеет длину от 300 до 800 аминокислот.

В своем шестом варианте, настоящее изобретение относится к к капсидному белку для применения в способе любого из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения, где указанный капсидный белок представляет собой капсидный белок вируса, принадлежащего к семейству *Parvoviridae*, а предпочтительно капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV).

В своем седьмом варианте, настоящее изобретение относится к к капсидному белку для применения в способе любого из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения, где указанный AAV выбран из группы, состоящей из AAV серотипов 2, 4, 6, 8 и 9, и где указанный AAV представляет собой предпочтительно серотип 2.

В своем восьмом варианте, настоящее изобретение относится к к капсидному белку для применения в способе по п. 7, где указанный капсидный белок представляет собой белок VP1 AAV серотипа 2.

В своем девятом варианте, настоящее изобретение относится к к капсидному белку для применения в способе любого из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения, где указанная аминокислотная последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 или ее указанный вариант встраивают в область аминокислот 550-600 капсидного белка.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся:

(i) к капсидному белку для применения в способе в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения, где указанный капсидный белок содержит:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8;

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID №: 8; или

(c) фрагмент одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a) или (b).

(ii) к капсидному белку для применения в способе в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения, где указанный капсидный белок содержит:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25;

(c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;

(d) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27; или

(e) вариант (a), (b), (c) или (d), который отличается от последовательности SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 или SEQ ID NO:27 соответственно, модификацией одной аминокислоты.

(iii) к вирусному капсиду, содержащему капсидный белок согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения, для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у приматов, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата.

(iv) к нуклеиновой кислоте, кодирующей капсидный белок согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления изобретения, для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у приматов, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата.

(v) к плазмиде, содержащей нуклеиновую кислоту в соответствии с (iv), для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у примата, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусному вектору, где указанный вектор содержит капсид и упакованный в него трансген, где капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;
- (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3;
- (d) вариант (a), (b) или (c), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты;
- (e) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24;
- (f) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25;
- (g) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;
- (h) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;
- (i) вариант (e), (f), (g) или (h), который отличается от последовательности SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 модификацией одной аминокислоты,
- (j) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8; или
- (k) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8;

для применения в любом из следующих способов (A), или (B), или (C):

(A) в способе лечения или профилактики заболевания сердца у примата, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата; или

(B) в способе лечения или профилактики кардиомиопатии у приматов; или

(C) в способе лечения или профилактики сердечной недостаточности или хронической сердечной недостаточности у приматов.

Так, например, вирусный вектор может доставлять huMydgf или SERCA2a в сердце и, более конкретно, трансдуцировать кардиомиоциты. Использование huMydgf для лечения кардиомиопатии и сердечной недостаточности известно специалистам в данной области. Также известно использование SERCA2a для лечения (хронической) сердечной недостаточности или пациентов с сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся:

(i) к рекомбинантному вирусному вектору для применения в предшествующем варианте осуществления изобретения, где указанная кардиомиопатия выбрана из группы, состоящей из гипертрофической кардиомиопатии (HCM), дилатационной кардиомиопатии (DCM), аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (ARVC), рестриктивной кардиомиопатии (RCM) и некомпактной кардиомиопатии левого желудочка (LVNC);

(ii) к рекомбинантному вирусному вектору для применения в предшествующем варианте осуществления изобретения, где указанная кардиомиопатия выбрана из группы, состоящей из первичной кардиомиопатии, предпочтительно наследственной кардиомиопатии, кардиомиопатии, вызванной спонтанными мутациями, и приобретенной кардиомиопатии, а предпочтительно ишемической кардиомиопатии, вызванной атеросклеротическими или другими заболеваниями коронарных артерий, кардиомиопатии, вызванной инфекцией или интоксикацией миокарда;

(iii) к рекомбинантному вирусному вектору для применения в предшествующем варианте осуществления изобретения, где указанное заболевание сердца выбрано из группы, состоящей из стенокардии, сердечного фиброза и сердечной гипертрофии;

(iv) к рекомбинантному вирусному вектору для применения в предшествующем варианте осуществления изобретения, где указанная сердечная недостаточность или хроническая сердечная недостаточность представляют собой сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), сердечную недостаточность со сниженной фракцией выброса (HFrEF) или сердечную недостаточность со средней фракцией выброса (HFmrEF);

(v) к рекомбинантному вирусному вектору для применения в предшествующем варианте осуществления изобретения, где указанный HFpEF представляет собой HFpEF на стадии C или на стадии D, или где указанный HFrEF представляет собой HFrEF на стадии C или стадии D.

Так, например, применение huMydgf для лечения, как указано выше, известно специалистам и описано в WO 2014/111458, Korf-Klingebiel et al. (2015, 2021), Ebenhoch et al. 2019, WO 2021/148411.

В своих дополнительных вариантах, настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусному вектору для применения в предшествующем варианте осуществления изобретения, причем, указанный вектор представляет собой рекомбинантный вектор AAV, где

(i) указанный вектор выбран из группы, состоящей из AAV серотипа 2, 4, 6, 8 и 9, а

предпочтительно AAV серотипа 2;

- (ii) трансген находится в форме оцДНК или дцДНК;
- (iii) трансген кодирует белок, выбранный из группы факторов репарации ткани сердца, регуляторов кальция или проангиогенных факторов;
- (iv) трансген кодирует фактор репарации ткани сердца huMydggf;
- (v) трансген кодирует регулятор кальция, выбранный из группы, состоящей из SERCA2a, SUMO1 и S100A1;
- (vi) трансген кодирует проангиогенный фактор VEGF;
- (vii) трансген кодирует микроРНК (миРНК), где предпочтительно указанная микроРНК участвует в регуляции пути MAPK, пути MYOD, пути FOXO3 или пути ERK-MAPK, а более предпочтительно, где указанная микроРНК выбрана из группы, состоящей из miR-378, miR669a, miR-21, miR212 и miR132;
- (viii) трансген представляет собой ген, который должен дополнять дефектный ген у примата, подлежащего лечению, где предпочтительно указанный ген кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из тяжелой цепи бета-миозина (MYH7), связывающего миозин белка С (MYBPC3), тропонина I (TNNT3), тропонина Т (TNNT2), цепи тропомиозина альфа-1 (TPM1) или легкой цепи миозина (MYL3). где вектор получают для внутривенного введения.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусному вектору, содержащему капсид и упакованный в него трансген, где капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
 - (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;
 - (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; или
 - (d) вариант (a), (b) или (c), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты;
- и где трансген кодирует белок, содержащий:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 20, 33 или 34;
- (b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, 20, 33 или 34; или
- (c) фрагмент одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a) или (b), который выполняет функцию huMydggf и имеет предпочтительно длину более 100, а более предпочтительно 120 аминокислот.

Предпочтительно, вариант или фрагмент белка сохраняет по меньшей мере часть активности, а более предпочтительно полную активность huMydggf, как было определено с помощью анализа, описанного в разделе «Материалы и методы» (i) в соответствии с 1.12 в комбинации с 1.14 и 1.15. Активность считается сохраненной, если вариант или фрагмент белка проявляет соответствующие биологические эффекты в соответствии с 1.12, 1.14 и

1.15. Кроме того, предпочтительно, вариант или фрагмент белка обладает активностью huMydgp в анализе на активность в соответствии с 1.16. В целях сравнения предпочтительно использовать huMydgp, имеющий последовательность SEQ ID NO: 35.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся к рекомбинантному вирусному вектору в соответствии с одним или несколькими предшествующими вариантами осуществления изобретения, где указанный капсидный белок содержит:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25;
- (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;
- (d) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;
- (e) вариант (a), (b), (c) или (d), который отличается от последовательности SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27 модификацией одной аминокислоты.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся к рекомбинантному вирусному вектору в соответствии с одним или несколькими предшествующими вариантами осуществления изобретения, содержащему капсид и упакованный в него трансген, где капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;
- (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; или
- (d) вариант (a), (b) или (c), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты;

где трансген кодирует белок, в котором отсутствует функциональный сигнал удерживания в аппарате Гольджи/эндоплазматическом ретикулуме, а предпочтительно белок, содержащий последовательность SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:34.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся к рекомбинантному вирусному вектору, где трансген кодирует белок, содержащий:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 20, 33 или 34;
- (b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, 20, 33 или 34; или

(c) фрагмент одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a) или (b), который выполняет функцию huMydgp и имеет предпочтительно длину более 100, а более предпочтительно 120 аминокислот, для использования в способе лечения или профилактики:

- (i) заболевания сердца у примата, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата; или

- (ii) кардиомиопатии у приматов; или
- (iii) сердечной недостаточности или хронической сердечной недостаточности у приматов.

Предпочтительно, вариант или фрагмент белка сохраняет по меньшей мере часть активности, а более предпочтительно полную активность huMydGF, как было определено с помощью анализа, описанного в разделе «Материалы и методы» (i) в соответствии с 1.12 в комбинации с 1.14 и 1.15. Активность считается сохраненной, если вариант или фрагмент белка проявляет соответствующие биологические эффекты в соответствии с 1.12, 1.14 и 1.15. Кроме того, предпочтительно, вариант или фрагмент белка обладает активностью huMydGF в анализе на активность в соответствии с 1.16. В целях сравнения предпочтительно использовать huMydGF, имеющий последовательность SEQ ID NO: 35.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся к рекомбинантному вирусному вектору в соответствии с одним или несколькими предшествующими вариантами осуществления изобретения, содержащему капсид и упакованный в него трансген, где капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;
- (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; или
- (d) вариант (a), (b) или (c), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты;

и где трансген кодирует человеческий регулятор кальция SERCA2a, где человеческий регулятор кальция SERCA2a предпочтительно содержит:

- (a) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 28-32;
- (b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28-32; или

(c) фрагмент одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a) или (b), и

где указанный капсидный белок предпочтительно содержит:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25;
- (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;
- (d) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;
- (e) вариант (a), (b), (c) или (d), который отличается от последовательности SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27 модификацией одной аминокислоты.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к рекомбинантному вирусному вектору, в котором трансген кодирует человеческий регулятор кальция

SERCA2a, для применения в способе лечения или профилактики:

- (i) заболевания сердца у примата, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата;
- (ii) хронической сердечной недостаточности; или
- (iii) сердечной недостаточности у пациентов со сниженной фракцией выброса.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей капсидный белок согласно изобретению, вирусный капсид согласно изобретению, нуклеиновую кислоту согласно изобретению, плазмиду согласно изобретению или рекомбинантный вирусный вектор согласно изобретению для их применения в медицине, а предпочтительно в способе лечения или профилактики болезни сердца у приматов согласно изобретению. Способ лечения или профилактики применяется предпочтительно для примата, то есть, человека.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся к применению фармацевтической композиции, содержащей капсидный белок согласно изобретению, вирусный капсид согласно изобретению, нуклеиновую кислоту согласно изобретению, плазмиду согласно изобретению или рекомбинантный вирусный вектор согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов, а предпочтительно у человека.

Дополнительные варианты осуществления изобретения относятся к способу лечения примата с использованием фармацевтической композиции, содержащей капсидный белок согласно изобретению, вирусный капсид согласно изобретению, нуклеиновую кислоту согласно изобретению, плазмиду согласно изобретению или рекомбинантный вирусный вектор согласно изобретению в целях приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов, а предпочтительно у человека.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения болезни сердца у примата, где указанный способ лечения или профилактики болезни сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата; или лечения или профилактики кардиомиопатии у приматов; или лечения или профилактики сердечной недостаточности или хронической сердечной недостаточности у приматов; или лечения сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса, у индивидуума, где указанный способ включает введение индивидууму, предпочтительно человеку, эффективного количества фармацевтической композиции или вирусного вектора согласно изобретению.

Настоящее изобретение также относится к применению вирусного вектора согласно изобретению для трансдукции выделенных клеток ткани сердца крысы или примата, а предпочтительно выделенных кардиомиоцитов.

SEQ ID Комментарии

NO:

1 Пептид 1 (см. AAV BI 15.1)

- 2 Пептид 2 (см. AAV VI 15.2)
- 3 Пептид 3 (см. AAV VI 15.2)
- 4 Аденоассоциированный вирус - 2 - Белок VP1
- 5 Аденоассоциированный вирус - 2 - белок VP2
- 6 Аденоассоциированный вирус - 2 - белок VP3
- 7 VP1, модифицированный пептидом 1
- 8 VP1, модифицированный пептидом 3
- 9 плазида сар/гер, модифицированная вставкой, кодирующей пептид 1
- 10 Плазида сар/гер, модифицированная вставкой, кодирующей пептид 3
- 11 Прямой праймер
- 12 Обратный праймер
- 13 Зонд
- 14 СAG-промотор
- 15 Последовательность полиаденилирования обезьяньего вируса 40
- 16 Аденоассоциированный вирус - 2 ITR
- 17 Аденоассоциированный вирус - 2 ITR
- 18 Последовательность белка huMydgif с сигнальным пептидом
- 19 последовательность гена huMydgif
- 20 последовательность мутантного белка huMydgif с сигнальным пептидом (RTEL)
- 21 мутантная последовательность гена huMydgif (RTEL)
- 22 Плазмиды pAAV, содержащие huMydgif
- 23 Плазмиды pAAV, содержащие huMydgif-RTEL
- 24 Пептид 1 с наполнителем
- 25 Пептид 3 с наполнителем
- 26 Пептид 1 с наполнителем
- 27 Пептид 3 с наполнителем
- 28 AT2A2 - белковая последовательность изоформы 1 кальций-АТФазы 2 саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума
- 29 AT2A2 - белковая последовательность изоформы 2 кальций-АТФазы 2 саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума
- 30 AT2A2 - изоформа 3 кальций-АТФазы 2 саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума
- 31 AT2A2 - изоформа 4 кальций-АТФазы 2 саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума

- 32 AT2A2 - изоформа 5 кальций-АТФазы 2
саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума
- 33 человеческий Mydgf без сигнального пептида (зрелый белок)
- 34 человеческий Mydgf без сигнального пептида и без сигнала удерживания в аппарате Гольджи (RTEL)
- 35 белковая последовательность соединения зонда для тестирования активности белка Mydgf (WT)
- 36 Предбелковая последовательность соединения зонда для тестирования активности белка Mydgf-RTEL с сигнальным пептидом
- 37 Белковая последовательность соединения зонда для тестирования активности белка Mydgf-RTEL без сигнального пептида.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры приведены для дополнительной иллюстрации некоторых аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения. Однако, эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

1. Материалы и методы

1.1. Получение векторов и их количественная оценка

Векторные штаммы AAV получали с использованием CELLdiscs путем эквимольной трансфекции плазмид BI-15.1 и BI-15.2 и AAV9 rep2/cap, phelper и одноцепочечных (оц) плазмид CAG-eGFP или CMV-eGFP pAAV в клетки HEK-293. Для трансдукции кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека, в качестве репортерных трансгенов использовали аутокомплементарные (sc) плазмиды CMV-eGFP pAAV. Очистку проводили путем осаждения полиэтиленгликолем с последующим ультрацентрифугированием в градиенте плотности йодиксанола и ультрафильтрацией, как описано ранее (Strobel et al. 2019). Получение рекомбинантных векторов AAV в клетках насекомых Sf9 осуществляли как описано в WO 2015/158749 или US 20170029464A1. Геномный титр определяли с помощью количественной ПЦР. Вкратце, вирусную ДНК экстрагировали с использованием набора для экстракции вирусных нуклеотидов Viral Express Nucleic Acid Extraction Kit (Chemicon, № по каталогу 3095). Количественную ПЦР проводили с использованием набора TaqMan Gene Expression Master Mix (4370074; Applied Biosystems) и набора праймеров/зондов, специфически связывающих сегмент последовательности промотора CMV, который также содержится в промоторе CAG. Были использованы следующие праймеры:

Прямой CMV: 5'-CGTCAATGGGTGGAGTATTTACG-3' (SEQ ID NO:11)

Обратный CMV: 5'-AGGTCATGTA CTGGGCATAATGC-3' (SEQ ID NO:12)

Зонд CMV: 5'-AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC-3' (SEQ ID NO:13)

Соответствующие плазмиды использовали для построения стандартной кривой для

количественного определения с использованием серийных разведений 1:5. Для цифровой количественной оценки капель проводили ПЦР на системе QX200 (Bio-Rad, США). Затем 9 мкл вирусной ДНК (разведенной от 1:1000 до 1:10⁹) добавляли к 10 мкл 2×ddPCR Supermix для зондов (Bio-Rad) и 1 мкл 20×наборов праймер-зонд, специфичных для представляющей интерес последовательности-мишени (в данном случае, промотора СAG или CMV). Затем смесь переносили в кассету DG8 и формировали капли с помощью генератора капель Bio-Rad и 70 мкл масла для генератора капель на лунку. После осторожного переноса 44 мкл капель в 96-луночный планшет, этот планшет запечатывали с помощью устройства для запаивания планшетов Bio-Rad PX1 и переносили в термоячейку Eppendorf X50s PCR Mastercycler. Затем проводили реакции ПЦР в следующих условиях: начальная стадия денатурации в течение 10 минут при 95°C, а затем 40 циклов по 30 секунд при 95°C и 1 минуты отжига при 60°C (скорость линейного изменения: 2°C/сек.). Оптимальная температура отжига была предварительно определена с помощью температурного градиента. После проведения заключительной стадии нагревания в течение 10 минут при 98°C, планшет охлаждали до 10°C и помещали в устройство для считывания капель. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (Bio-Rad). Разведения образцов, которые показали правильное разделение позитивных и негативных капель, использовали для подсчета геномных титров AAV.

1.2. Анализ на связывание AAV (bAb)

Присутствие уже имеющихся общих антикапсидных антител в сыворотке NHP анализировали с помощью формата мостикового анализа иммуногенности на платформе MSD (Meso Scale Discovery). Стандартный планшет Multi-Array MSD (L15XA-1) сенсibilizировали 5×10⁸ капсидами AAV на лунку в буфере для приготовления AAV при встряхивании в течение 5 минут при 750 об/мин. После инкубирования при 4°C в течение ночи, планшет промывали три раза. Блокирование осуществляли с использованием блокирующего раствора (3% блокатора А (R93BA-2, MSD) в PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре (кт) с последующей промывкой. Сыворотку NHP, IVIG (Kiovig; Baxter) в качестве контроля или мышиную А20 (Progen; 61055) в качестве контроля покрытия AAV2 приготавливали в серийных разведениях 1:2 в 1% растворе блокатора А и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на сенсibilizированных капсидах AAV. После промывки, количество связанного IgG₁₋₃ определяли путем инкубирования с IgG1-3 против NHP (MSD; D20JL-6) или против мышинных IgG (MSD; R32AC-1) в качестве контроля в течение 1 часа при комнатной температуре после промывки и добавления 2×буфера для считывания MSD. В течение 5 минут, электрохемилюминесценция была обнаружена с помощью визуализатора MSD Sector Imager 6000 с использованием программного обеспечения Discovery Workbench версии 3.0.18. Значения для лунок, покрытых PBS, для каждого отдельного разведения сыворотки (или IVIG) вычитали из значений для каждого отдельного образца, сенсibilizированного AAV. Относительный сигнал MSD IgG₁₋₃ нормализовали до значений А20. Разведение сыворотки, которое в среднем составляло 50% от максимального значения сигнала IgG1-3,

было указано как титр bAB.

1.3. Анализ на нейтрализацию (nAb)

В дополнение к антикапсидным антителам и потенциально нейтрализующим антителам, анализы на ингибирование трансдукции могут обнаруживать нейтрализующие факторы, не являющиеся антителами и присутствующие в сыворотке NHP. В 96-луночные планшеты высевали 5×10^4 клеток HEK293 на лунку в течение 24 часов. Рекombинантный VI-15.1 или VI-15.2 или AAV2 (с антителом против FITC) разводили в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA), с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) и инкубировали с 2-кратными серийными разведениями (от 1:2 до 1:1024) образцов сыворотки NHP в течение 30 минут при 37°C. Затем к засеянным клеткам добавляли смеси сыворотка-вектор, соответствующие 25000 ВГ/клетку (AAV2-NRGTEWD и AAV2-ESGHGYF) или 2500 ВГ/клетку (AAV2) и инкубировали в среде DMEM-10% FCS в течение 72 часов при 37°C и 5% CO₂. Каждую смесь получали с тремя повторностями. Супернатант переносили в 96-луночные планшеты, а затем определяли количество анти-FITC антитела с помощью ELISA с использованием антител против FITC. Эффективность трансдукции измеряли как относительное количество клеток на лунку. О нейтрализующем титре сообщали как о самом высоком разведении сыворотки, которое ингибировало трансдукцию гAAV на 50% по сравнению с контролем без сыворотки.

1.4. Анализ векторных штаммов на электронном микроскопе

Анализы CryoTEM и nsTEM осуществляли в Vironova (Стокгольм, Швеция). Образцы AAV разводили до подходящей концентрации «на сетке». Для CryoTEM, 3 мкл каждого образца наносили на сплошную или перфорированную углеродную ЭМ-сетку, а затем подвергали глубокой заморозке в жидком этане с использованием FEI Vitrobot™. Сетки визуализировали с помощью JEOL JEM-2100F или Philips CM200 с помощью автоэмиссионного пушечного просвечивающего электронного микроскопа, работающего при напряжении ускорения 200 кВ. Для nsTEM, образцы наносили на подходящую непрерывную углеродную сетку, промывали водой и подвергали негативному окрашиванию с использованием 2% уранилацетата (UAc) или других подходящих красителей. Сетки были визуализированы с использованием MiniTEM™ при напряжении ускорения 25 кВ. Репрезентативные области визуализировали как при малом, так и при большом увеличении. Полный набор изображений был получен только на сетке, показывающей подходящие по концентрации частицы, распределение частиц и контрастность изображения. Сетки для ЭМ были приготовлены в соответствии с SOP V0149, то есть, путем получения образца сидячей капли для просвечивающей электронной микроскопии с негативным окрашиванием (*nsTEM*). Автоматическое детектирование и классификацию осуществляли на изображениях FOV 1,5 микрометра для создания графика морфологической классификации и распределения по размерам, а также проведения статистического анализа обнаруженных частиц.

1.5. Анализ трансдукции на кардиомиоцитах человека

Индукцированные человеческие плюрипотентные стволовые клетки (hiPSC, линия SFC086-03-01) были получены в рамках проекта IMI-StemBANCC (Morrison et al, 2015) (<http://stembancc.org>). hiPSC высевали на культуральные планшеты, покрытые матригелем со сниженным количеством факторов роста (Corning, NY, USA). hiPSC поддерживали при 37°C, 5% CO₂ с использованием гибкой среды Essential8™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) с добавлением 100000 ед./л пенициллина и 100 мг/л стрептомицина (Thermo Fisher Scientific). Клетки пассировали с 0,5 мМ EDTA (Thermo Fisher Scientific) каждые 3-5 дней после достижения конfluence приблизительно 70%.

Дифференцировку hiPSC в кардиомиоциты проводили на основе опубликованного протокола (Burrige et al, 2014) с модификациями. Вкратце, 1×10^4 hiPSC/см² высевали на культуральные планшеты, покрытые матригелем со сниженным количеством факторов роста, в среде E8-flex с добавлением 10 мкМ Y-27632 (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), а затем среду заменяли на среду E8-flex ежедневно в течение 4 дней. Дифференцировку индуцировали путем замены среды на среду CMD (среду RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 0,25% бычьего альбумина, фракции V (Thermo Fisher Scientific) и 0,21 мг/мл s-фосфата L-аскорбиновой кислоты (Wako Chemicals, Osaka, Japan) с добавлением 5,5 мкМ CHIR99021 (Sigma Aldrich) (день 0 дифференцировки). Через 48 часов, среду заменяли средой CMD с добавлением 5 мкМ IWP2 (Merck Millipore, Merck KGaA). Через 48 дней, среду заменяли средой CMD через день. Клетки подвергали криоконсервации на 14-й день дифференцировки с использованием набора для диссоциации нескольких тканей 3 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) в соответствии с протоколом производителя. Кардиомиоциты очищали путем проведения стадии истощения клеток, не являющихся кардиомиоцитами с помощью набора для выделения кардиомиоцитов, полученных из PSC (Miltenyi Biotec), в соответствии с протоколом производителя.

Криоконсервированные кардиомиоциты оттаивали в культуральных флаконах, покрытых фибронектином (0,8 мкг/см²; Sigma Aldrich), в среде RB+ (в среде RPMI 1640, дополненной добавкой 1:50 B27 (Thermo Fisher Scientific)) и 10 мкМ Y-27632. Через 24 часа, среду заменяли средой RB+. На следующий день после того, как клетки отделяли с использованием StemPro™ Accutase™ (Thermo Fisher Scientific), $1,5 \times 10^4$ клеток на лунку высевали на половину площади 96-луночного планшета, покрытого фибронектином (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) в среде RB+. В периферийные лунки добавляли PBS. Через 48 часов, сфероиды промывали средой для созревания (MM; DMEM без глюкозы, 10 мМ HEPES, 1 мМ заменимых аминокислот (все от Thermo Fisher Scientific), 2 мМ L-карнитина, 5 мМ креатина, 5 мМ таурина, 1:100 ITS+3 жидких добавки к среде (все от Sigma Aldrich)(Drawnel et al. 2014)) и культивировали в MM. MM обновляли через 72 часа. Для трансдукции, клетки высевали в 96-луночный микропланшет половинной площади (Greiner, Bio-One, Frickenhausen, Germany). Затем наносили 10 мкл среды, содержащей 2×10^9 ВГ указанного вектора, и планшеты инкубировали в течение 48 часов, после чего оценивали картину эффективности трансдукции с помощью системы скрининга

Opera Phenix High-Content Screening System (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts).

1.6. Анализ на биораспределение векторов и экспрессию генов

Образцы тканей мгновенно замораживали в жидком азоте сразу после иссечения. Для выделения ДНК и РНК, образцы гомогенизировали в 900 мкл буфера RLT (79216, Qiagen) с использованием гомогенизатора Precellys 24 и пробирок с керамическими шариками (KT03961-1-009.2, VWR) при 6000 об/мин в течение 30 сек. Образцы немедленно помещали на лед. Затем к 700 мкл гомогената в пробирке с гелем для фазовой синхронизации добавляли 350 мкл фенола-хлороформа-изоамилового спирта (77617, Sigma Aldrich) и перемешивали путем встряхивания. После центрифугирования в течение 5 минут при 16000×g добавляли 350 мкл хлороформа-изоамилового спирта (25666, Sigma-Aldrich) и смесь снова встряхивали. После 3-минутного инкубирования при комнатной температуре и центрифугирования в течение 5 минут при 12000×g, верхнюю фазу собирали и пипеткой помещали в планшет с глубокими лунками, находящийся на сухом льду. После обработки всех образцов, ДНК и РНК очищали с использованием набора AllPrep DNA/RNA 96 (80311, Qiagen) в соответствии с инструкциями, включая необязательную стадию «расщепления ДНКазой на колонке». РНК из клеточных культур выделяли путем осаждения клеток с последующим лизисом в 350 мкл буфера RLT и очисткой с использованием мини-набора RNeasy (74104, Qiagen). Целостность РНК подтверждали с помощью анализатора фрагментов (Agilent). Для анализа биораспределения, геномы векторов AAV детектировали с использованием экстрагированной ДНК и путем построения стандартной кривой по данным серийных разведений соответствующей экспрессионной плазмиды. Анализы Taqman осуществляли на системе ПЦР в реальном времени Applied Biosystems ViiA 7. Для анализа на экспрессию генов, равные количества РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием набора High-capacity cDNA RT (набора High-capacity cDNA Archive Kit; № 4322169, Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями. Затем проводили реакции кол.ОТ-ПЦР с использованием смеси Master Mix для экспрессии генов TaqMan (№ 4370074, Applied Biosystems) и праймеров, специфически связывающихся с геном eGFP или Mydgf (Hs00384077_m1, Thermo Fisher). Экспрессию нормализовали по экспрессии гена «домашнего хозяйства» РНК-полимеразы II (ID гена РНК POLII; XM_015437398.1 или Rn01752026_m1, Thermo Fisher).

1.7. Иммуногистохимический анализ

Образцы тканей, взятых у мышей, крыс и ННР, фиксировали в 4% PFA и заливали парафином (фиксация формалином и заливка парафином, FFPE). Срезы ткани FFPE толщиной 3 мкм на предметных стеклах Super Frost Plus депарафинизировали и регидратировали путем последовательного пропускания через градиенты ксилола и этанола для иммуногистохимического окрашивания. Выделение антигена осуществляли путем инкубирования срезов в растворе ферментов Leica Bond (с использованием набора для предварительной обработки ферментом Bond, № по каталогу 35607) в течение 5 минут. Срезы инкубировали с антителом против GFP (abcam, ab290, кроличьим поликлональным антителом). Антитело разводили (1:1500) основным разбавителем антител Leica (AR9352;

Leica Biosystems, Nussloch, Germany) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Для обнаружения (3,3'-диаминобензидин в качестве хромогена, DAB) и контрастного окрашивания (гематоксилином) использовали набор Bond Polymer Refine Detection (№ по каталогу 37072). Окрашивание проводили на автоматизированной платформе Leica ИНС Bond-III (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Микроскопическую оценку образцов проводили на микроскопе Zeiss AxioImager M2 и с помощью программного обеспечения для сканирования предметных стекол ZEN (Zeiss, Oberkochen, Germany). Для окрашивания Mydgf проводили стадию предварительной обработки с инкубированием в цитрате в течение 30 минут при 95°C и с антителом против Mydgf (proteintech, Art: 11353-1-AP, поликлональным антителом против кроличьих IgG), разведенным 1:500 (с использованием разбавителя Cat № 35089; Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Окрашивание проводили в соответствии со стандартным протоколом окрашивания Leica с использованием антитела против кроличьих IgG.

1.8. Анализ изображения

Для количественного анализа срезов сердца, окрашенных антителом против GFP, эти срезы сканировали с помощью сканера целых предметных стекол Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) с использованием объектива с увеличением 20× (0,22 мкм/пиксель) при освещении в ярком поле. Площадь ткани, позитивной по антителу против GFP, идентифицировали с помощью программного обеспечения для обработки изображений HALO 3.0 с использованием модуля количественного определения площади 1.0 (Indica Labs, Corrales, NM, USA). Для разделения сигналов гематоксилина и DAB использовали цветовую деконволюцию. Порог был оптимизирован вручную для определения позитивных областей a_p в канале DAB при минимальной реакции на фоновый сигнал. Общая площадь ткани A была получена из областей с заметно более высокой оптической плотностью, чем фон. Доля окрашенной площади f была получена путем нормализации DAB-позитивной области a_p на общую площадь ткани A , то есть, $f = a_p / A$. Для обеспечения сопоставимости на протяжении всего исследования использовали идентичные настройки цветовой деконволюции, порога и определения области ткани.

1.9. Экспрессия и обнаружение huMydgf с помощью Вестерн-блот-анализа

Для экспрессии в клетках млекопитающих, 2,5 мкг плазмиды pAAV, содержащей huMydgf (SEQ ID NO:22) или huMydgf-RTEL (SEQ ID NO:23) под контролем CAG-промотора, трансфицировали в клетки HEK293, полученные от Thermo (#11631-017) с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine3000 (Thermo#L3000001). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. Для временной трансфекции, 1×10^6 клеток высевали в среду для культивирования в 6-луночные планшеты за 16 часов до трансфекции. Через 48 часов, кондиционированную среду осторожно собирали, оставляя клеточный слой нетронутым, и любые клетки в собранной среде центрифугировали. Клетки удаляли из планшета с помощью скребка для соскоба клеток в 1 мл холодного PBS. Клетки осаждали при относительной центробежной силе 400 и удаляли PBS. Осажденные клетки лизировали 100 мкл буфера RIPA с коктейлем

ингибиторов протеаз (Thermo # 89901; # 78438). Концентрацию белка лизата определяли с помощью анализа BCA (Thermo#23225). Для иммуноблоттинга, 50 мкг лизата белка или 30 мкл неразведенной кондиционированной среды кипятили в течение 5 минут при 95°C в 4×буфере Лэммли с 2,5% β-меркаптоэтанолом (Biorad#1610747). Мембрану PVDF блокировали 5% сухим молоком. 1 мкг/мл антитела против MYDGF (R&D#AF1147) инкубировали в течение ночи при 4°C. Второе антикозье антитело (Dianova № 705-035-003) использовали в концентрации 100 нг/мл в течение 1 часа при комнатной температуре.

1.10. Животные

Все процедуры с животными проводили в соответствии с руководством по уходу за лабораторными животными и по их использованию в соответствии с Германским кодексом по защите животных, одобренным местными Регуляторными органами (Regierungspräsidium Tübingen, Germany). Для изучения тропизма, векторы AAV вводили самкам мышей C57BL/6 в возрасте 8-10 недель, крысам whistar kyoto (WKY/KyoRj) или крысам sprague dawley и приматам, не являющимся человеком (*macaca fascicularis* с острова Маврикий).

1.11. Протоколы применения AAV

Для исследования тропизма, мышам C57BL/6, крысам whistar kyoto или крысам sprague dawley вводили инъекцию под анестезией (3,5% изофлураном) в объеме 5 мл/кг массы тела в хвостовую вену. Все NHP (*macaca fascicularis* с острова Маврикий) были предварительно скринированы на наличие нейтрализующих антител, и отобранным животным вводили инъекцию в объеме 1 мл/кг массы тела со скоростью инфузии 3 мл/мин. в вену руки.

Все графики и статистические данные были созданы с помощью Prism8 (GraphPad Software, San Diego, USA). При этом использовали однофакторный ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта или с непарным двусторонним Т-критерием Стьюдента.

1.12. Мыши с моделью инфаркта миокарда.

Инфаркт миокарда (ИМ) индуцировали, как описано Korf-Klingebiel et al. 2015. ИМ индуцировали у мышей FVB/N в возрасте 9-10 недель путем временного наложения лигатуры на левую переднюю нисходящую коронарную артерию (LAD). Мышей предварительно обрабатывали 0,02 мг/кг атропина подкожно (SC) (B. Braun) и 2 мг/кг буторфанола подкожно (Pfizer). Мышей вентилировали 3-4% изофлураном (Baxter) через лицевую маску. После пероральной интубации, анестезию поддерживали 1,5-2% изофлураном. Была выполнена левосторонняя торакотомия, и была наложена лигатура скользящим узлом (в случае ишемии), которую удаляли через 1 час (при реперфузии). У контрольных мышей, лигатуру вокруг LAD не завязывали (ложная операция). Затем проводили двухмерную трансторакальную эхокардиографию высокого разрешения у мышей, седированных 1-2% изофлураном (с помощью линейного преобразователя частоты 20-46 МГц MX400, Vevo 3100, VisualSonics). Затем регистрировали конечно-диастолическую площадь ЛЖ (LVEDA) и конечно-систолическую площадь ЛЖ (LVESA) в

парастернальной проекции по длинной оси. Изменение фракционной площади (FAC) вычисляли по формуле $[(LVEDA - LVESA)/LVEDA] \times 100$. Петли давление-объем в ЛЖ регистрировали с помощью кондуктометрического катетера с микроманометром 1,4 F, введенного через правую сонную артерию (SPR-839, Millar Instruments). Для анестезии, мышей предварительно обрабатывали 2 мг/кг буторфанола подкожно и вентилировали 4% изофлураном через лицевую маску. После пероральной интубации, мышей обрабатывали 0,8 мг/кг панкурония внутривенно (IP) (Actavis) и поддерживали анестезию 2% изофлураном. Установившиеся петли давление-объем измеряли с частотой 1 кГц и анализировали с помощью программного обеспечения LabChart 7 Pro (ADInstruments). Осмотические миниасосы (Alzet), заполненные рекомбинантным MydGF, MydGF-RTEL или разбавителем (PBS), помещали в подкожный межлопаточный карман непосредственно перед коронарной реперфузией. Модель 1007D использовали для 7-дневной инфузии (скорость накачки 0,5 мкл/час с заполнением 10 мкг соответствующего белка на 12 мкл).

1.13. Рекомбинантный MydGF и рекомбинантный MydGF-RTEL

Первым белком, использованным в экспериментах как показано на фиг. 16 и 17, был рекомбинантный MydGF, экспрессированный в *E. coli* со следующей последовательностью:

(M)VSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSHNVGPGDKYTCMFTYASQGGTNEQWQMSL
GTSEDHQNFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAIEVRGAEIEYAMAYSKAAFERESDVPLKTEEF
EVTKTAVANRPGAFKAELSKLVIVAKASRTEL

Белок экспрессировали в *E. coli* и извлекали/очищали в соответствии с процедурой, описанной в следующей схеме:

1. Разрушение клеток+восстановление телец включения (IB), солюбилизация IB+рефолдинг

2. Диафильтрация

3. Захват АИЕС (YMC Q75)

4. Промежуточный продукт НИС (каптофенил)

5. УФДФ (ультрафильтрация/диафильтрация)

6. Приблизительно 100 мг очищенного продукта

Второй белок, используемый в экспериментах, как показано на фиг. 16 и 17, представлял собой рекомбинантный MydGF-RTEL со следующей последовательностью:

MGWSLILLFLVAVATRVLS
НННННHAGSENL YFQGVSEPTTVAFDVRPGGVVHSFSHNVGPGDKYTCMFTYA
SQGGTNEQWQMSLGTSEDHQNFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAIEVRGAEIEYAMAYSKA
AFERESDVPLKTEEFVTKTAVANRPGAFKAELSKLVIVAKAS

Белок MYDGF (-RTEL), используемый как показано на фиг. 16 и 17, представлен выше с сигнальным пептидом (MGWSLILLFLVAVATRVLS), за которым следует His-метка, линкер, а затем сайт расщепления TEV. Сигнальный пептид расщепляется во время экспрессии, в результате чего образуется последовательность зрелого белка, показанная выше под последовательностью сигнального пептида. Этот белок экспрессировался в клетках HEK 293E. ДНК, кодирующая указанный выше белок, была получена путем синтеза

с оптимизацией по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающих и была клонирована в рТТ5 (Invitrogen Carlsbad, CA) в сайтах рестрикции HindIII/NotI стандартными методами. Объем каждой трансфекции составлял 1 л, и такая трансфекция была проведена с использованием PolyPlus PEI. Клетки собирали на 4-й день после трансфекции, а супернатант собирали центрифугированием при $9300 \times g$ в течение 30 минут при 4°C . Белок очищали от супернатанта путем связывания посредством периодического культивирования Ni-NTA в течение ночи при 4°C . Элюированный белок охарактеризовывали путем электрофореза в ДСН-ПААГ и аналитической эксклюзионной хроматографии. Хотя белок имеет сайт расщепления TEV, однако, этот белок не расщепляется и все еще содержит His-метку.

1.14. Измерение размера рубца

Измерение размера рубца проводили как описано Korf-Klingebiel et al., 2015. Для измерения размера рубца, через 28 дней после реперфузии, левые желудочки погружали в соединение ОСТ (Tissue-Tek), быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Из базальных, среднежелудочковых и апикальных срезов вырезали срезы толщиной 6 мкм, окрашивали трихромом Мэссона и анализировали с помощью оптической микроскопии (Zeiss Axio Observer.Z1). Размер рубца вычисляли как среднее отношение площади рубца к общей площади ЛЖ в базальном, среднежелудочковом и апикальном отделах.

1.15. Капилляризация

Для оценки капилляризации в пограничной зоне инфаркта, через 28 дней после ишемии/реперфузии, из срезов среднего желудочка вырезали криосрезы толщиной 6 мкм. Для флуоресцентного окрашивания, криосрезы окрашивали агглютинином зародышей пшеницы, меченным родамином (WGA, Vector Laboratories) для визуализации границ сердечных миоцитов и интерстициального матрикса, а также изолектином GSL I B4, меченным флуоресцеином (IB4, Vector Laboratories) для визуализации капилляров. Число IB4-позитивных клеток на кардиомиоцит вычисляли с использованием программного обеспечения axiovision.

1.16. Анализ на активность

Был проведен анализ царапин в эндотелиальных клетках коронарных артерий человека (HCAEC). HCAEC высевали с плотностью 55000-60000 HCAEC на лунку в 24-луночный планшет в среде EGM-2 с 10% FCS в общем объеме 1 мл на лунку. Через 24 часа после посева (клетки должны быть конфлюэнтными), среду заменяли на 1 мл среды MCDB, содержащей 2% FCS в каждой лунке, и инкубировали в течение 3-4 часов. После инкубирования, на монослой наносили царапины желтым наконечником пипетки (200 мкл) в каждую лунку (следует держать наконечник вертикально, чтобы царапина была достаточно большой). Затем клетки один раз промывали средой MCDB с 2% FCS, а затем в каждую лунку добавляли 1 мл свежей среды (MCDB/2% FCS). Затем клетки стимулировали белковым зондом в различных концентрациях в каждой лунке с исходной концентрацией и последовательным разведением в отношении 1:1,5. Непосредственно после обработки при $T=0$ часов необходимо сделать снимок всех лунок под микроскопом (например, на Zeiss

Axio Observer Z1 с 50-кратным увеличением (5-кратный объектив) с настройкой фазового контраста). В идеале, снимки делают из середины лунок, так как там видны оптимальные контрасты. Затем планшеты инкубировали при 37°C. После инкубирования в течение 16 часов (T=16 часов) необходимо снова сделать снимки каждой лунки, как описано выше. Для определения активности, восстановление в анализе вычисляли путем измерения свободной от клеток площади (например, с помощью программного обеспечения axiovision или ImageJ) на 0-часовых и 16-часовых изображениях. Восстановление (%) вычисляли по формуле [(свободная от клеток площадь на 0 часов - свободная от клеток площадь через 16 часов)/свободная от клеток площадь через 0 часов] × 100.

2. Результаты

2.1. Получение векторов

Для оценки потенциала векторов VI-15.1 и VI-15.2 как векторов, нацеленных на кардиомиоциты у крыс и приматов, не являющихся человеком, партии векторов в диапазоне от 0,6 до $1,2 \times 10^{15}$ ВГ (систематизированные в Таблице 2) были получены в клеточных дисках, как описано ранее (Strobel et al., 2019). Были получены векторы для экспрессии активированного белка, флуоресцирующего в зеленом диапазоне спектра (eGFP) под контролем либо 1) раннего энхансера цитомегаловируса+промотора куриного β-актина (CAG), либо под контролем 2) промотора цитомегаловируса (CMV).

Таблица 2: Систематизированные данные препаратов AAV и аналитические данные в большом масштабе

ID	Последовательность вставки (AAV2-R588)	Экспрессионный кластер	Число клеточных дисков	Общий выход (ВГ)	Конечный титр (ВГ/мл)
AAV VI-15.1	NRGTEWD	ssAAV2-CAG-eGFP	14	$1,2 \times 10^{15}$	$2,2 \times 10^{13}$
AAV VI-15.2	ESGHGYF	ssAAV2-CMV-eGFP	14	$6,1 \times 10^{14}$	$3,7 \times 10^{13}$

Качество препаратов вектора на основе НЕК анализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) в отношении чистоты, агрегации, сборки капсида, а также коэффициентов упаковки. Анализ CryoTEM показал высокую концентрацию равномерно распределенных полноразмерных частиц AAV без обнаружения агрегатов частиц или незначительных кластеров (верхняя панель VI-15.1 на фигуре 1A и верхняя панель VI-15.2). Анализ внутренней плотности на основе изображения показал коэффициент упаковки приблизительно 96% для обоих препаратов вектора (нижняя панель на фигуре 1A для каждого варианта капсида). Кроме того, для оценки чистоты образца и классификации частиц использовали TEM с негативным окрашиванием (nsTEM). В данном случае, VI-15.1 состоял из ~43% первичных частиц AAV и ~57% первичных разрушенных частиц. VI-15.2 состоял из ~70% первичных частиц AAV с соответствующим меньшим

количеством первичных разрушенных частиц (~30%). Сообщалось, что для обеих партий векторов, разрушенные частицы AAV и частицы небольшого размера, которые, вероятно, являются протеасомами, составляют менее 5%.

2.2. Распределение векторов у мышей

Для подтверждения ранее опубликованных свойств VI-15.1 и VI-15.2, опосредованных капсидом, а также тропизма и доставки генов, векторы вводили внутривенно самкам мышей C57BL/6J в трех различных дозах (низкая доза: 5×10^{12} ВГ/кг массы тела (МТ), средняя доза: 1×10^{13} ВГ/кг МТ, высокая доза: 5×10^{13} ВГ/кг МТ). Через три недели после введения вектора определяли распределение вектора в образцах ткани головного мозга, легкого и панели нецелевых тканей. Количественная оценка числа копий вирусного генома подтвердила значительный опосредованный капсидом хоминг VI-15.1 в головной мозг во всех дозируемых группах, в то время как в нецелевых органах было обнаружено только небольшое количество копий вектора (фигура 2А). Одновременно с этим, уровни экспрессии гена eGFP, проанализированные путем количественного определения транскриптов РНК, были значимо и в частности, выше в лизатах цельного головного мозга по сравнению с нецелевыми тканями (фигура 2С). У мышей, которым инъецировали VI-15.2, значительный опосредованный капсидом хоминг вектора в легочную ткань был подтвержден анализом на распределение ткани на основе генома вектора. Меньшие количества векторных геномов были обнаружены в тканях головного мозга и сердца, а в различных других контрольных тканях присутствовали только слабые или недетектируемые сигналы числа копий вектора (фигура 2ВА). В соответствии с этими данными, статистически значимая, сильная и дозозависимая экспрессия репортерного гена, опосредованная VI-15.2, была подтверждена количественным определением транскриптов eGFP в легких (фигура 2D). Для подтверждения биологической активности VI-15.1 и VI-15.2, продуцируемых в Sf9, самкам мышей C57BL/6J внутривенно вводили 10^{11} ВГ/мышь. Через две недели после введения вектора определяли распределение вектора в образцах тканей головного мозга, легкого и печени. Количественная оценка числа копий вирусного генома подтвердила значительный опосредованный капсидом хоминг VI-15.1 в головной мозг, в то время как в печени было обнаружено только небольшое количество копий вектора (фигура 2Е). Количественная оценка числа копий вирусного генома подтвердила значительный опосредованный капсидом хоминг VI-15.2 в легкие, в то время как в печени было обнаружено только небольшое количество копий вектора (фигура 2F). В совокупности, эти результаты подтверждают биологическую активность НЕК, а также Sf9, в которых продуцировались VI-15.1 и VI15.2. Все векторы показали ранее описанные свойства нацеливания VI-15.1 и VI-15.2, опосредованные капсидом, у мышей и, следовательно, они подходят для их применения на более крупных животных-моделях.

2.3. Распределение векторов у крыс

Для дальнейшего анализа биораспределения и профиля экспрессии генов VI-15.1 и VI-15.2, крысам WKY/КуoRj внутривенно вводили 1×10^{13} и 5×10^{13} ВГ/кг. Через 21 день, количественная оценка распределения ДНК вирусов VI-15.1 и VI-15.2 и анализ на

экспрессию РНК-генов показали значительный и дозозависимый опосредованный капсидом хоминг векторов в ткань сердца (фигура 3А, В). Важно отметить, что опосредуемый капсидом хоминг ВІ-15.1 в ткань сердца сильно коррелирует с САG-регулируемой экспрессией гена сердца, на что указывал паттерн экспрессии РНК (фигура 3С). Это было дополнительно подтверждено дозозависимым увеличением иммуногистологического сигнала eGFP (фигура 4А) и количественной оценкой площади (фигура 4В) в срезах всего сердца. В отличие от сильной кардиоспецифической экспрессии eGFP, опосредованной ВІ-15.1, экспрессия, опосредованная вектором ВІ-15.2, была выше в скелетных мышцах, а затем в сердце (фигура 3D). Это указывает на то, что САG более эффективно регулирует экспрессию гена eGFP в сердечной мышце, чем в скелетных мышцах, в то время как CMV-регулируемая экспрессия является более сильной в скелетных мышцах. Однако, для векторов ВІ-15.2 наблюдались дозозависимое увеличение иммуногистологического сигнала eGFP (фигура 4А) и была проведена количественная оценка площади области сердца с положительным окрашиванием eGFP (фигура 4В).

2.4. Сравнение свойств ВІ-15.1 и AAV9

Было проведено сравнение свойств ВІ-15.1 и AAV9, текущего стандарта переноса генов сердца у доклинических моделей. Через 3 недели после внутривенного системного введения вектора крысам Sprague Dawley (доза вектора 3×10^{13} ВГ/кг массы тела), количественный анализ ДНК подтвердил опосредованный капсидом ВІ-15.1 сердечный тропизм. В сердце было обнаружено значительно более высокое количество копий вирусной ДНК по сравнению с печенью, головным мозгом, скелетными мышцами, легкими, почками, поджелудочной железой и селезенкой (фигура 5А). Это указывает на то, что опосредованный капсидом ВІ-15.1 сердечный тропизм сохраняется у двух различных линий крыс. Эти результаты подтверждают ранее описанный широкий тропизм AAV9 (фигура 5В). Кроме того, более высокое число копий ДНК в различных тканях предполагает более длительный период полужизни AAV9 *in vivo* по сравнению с ВІ-15.1. Эта системная стойкость может давать более сильные нецелевые эффекты, например, трансдукцию в печень. Паттерны биораспределения ВІ-15.1 и AAV9 коррелируют с опосредованной вектором экспрессией генов, на что указывали анализ РНК (фигура 5С), иммуногистохимическое окрашивание на eGFP (фигура 6А) и количественное определение площади (фигура 6В). При сравнении хоминга вектора, AAV9 показал более высокое количество копий ДНК в сердце (в 11,3 раза). Но при этом, уровень экспрессии РНК ВІ-15.1 все еще достигал 28% по сравнению с AAV9 (фигура 5D). Это указывает на более высокое отношение экспрессии ДНК к РНК для ВІ-15.1. В соответствии с этим, индекс эффективности также показывает благоприятный профиль экспрессии векторов ВІ-15.1 в различных тканях (фигура 5D). Эти результаты были дополнительно подтверждены индексом эффективности, основанным на количественном определении площади. Экспрессия, опосредованная вектором ВІ-15.1, в сердце достигла 74% по сравнению с AAV9, и при этом, было показано значительное снижение нацеливания на различные ткани, не являющихся мишенями (фигура 6С).

2.5. Распределение векторов у приматов, не являющихся человеком

Отсутствие транслируемости тропизма у различных видов является одной из основных проблем генотерапии на основе AAV. Для изучения способности векторов VI-15.1 и VI-15.2 специфически доставлять гены в ткань сердца у приматов, не являющихся человеком, авторами были проведены исследования биораспределения у взрослых собакоподобных обезьян в дозах, указанных ниже в Таблице 3.

Таблица 3. Систематизированные данные для собакоподобных обезьян, которым вводили дозы варианта AAV

ID	Вектор	Возраст [годы]	Масса тела при инъекции [кг]	Доза (ВГ/кг массы тела)	Титр nAb	Титр bAb
AJ574	-	16	6,1	-	1:8	1:64
AJ562	AAV VI-15.1	16	7,8	1×10^{13}	негатив.	1:2
AY895	AAV VI-15.1	12	5,2	1×10^{13}	негатив.	негатив.
AZ013	AAV VI-15.1	12	7,5	1×10^{13}	негатив.	негатив.
AJ249	AAV VI-15.2	16	4,7	1×10^{13}	негатив.	негатив.
AY613	AAV VI-15.2	12	5,1	1×10^{13}	негатив.	негатив.

Наличие антител против AAV может иметь важное значение для доклинических экспериментов. Поэтому, сыворотки всех животных, включенных в исследование, тестировали на наличие нейтрализующих антител, а также антител IgG₁₋₃, связывающихся с AAV. О титре nAb сообщалось как о самом высоком разведении сыворотки, которое ингибирует трансдукцию rAAV на 50% по сравнению с контролем без сыворотки. Разведение сыворотки, которое составляет в среднем 50% от максимального значения сигнала IgG₁₋₃, было указано как титр bAb. В Таблице 3 систематизирован титр антител, нейтрализующих AAV или связывающихся с AAV (nAb или bAb) в образцах сыворотки NHP (n=16 отдельных животных). У всех животных, включенных в группы дозирования AAV, был отрицательный результат анализа на нейтрализующие антитела (nAb-анализ). Животное AJ562 показало низкую реактивность против IgG (ниже порога <1:4) в анализе на связывание антител, которое, как уже считалось, не влияет на трансдукцию AAV (анализ bAb) после введения дозы. Животное AJ574 (контрольная группа с PBS) показывало положительный результат в анализе как на nAb, так и на bAb (1<64). См. Таблицы 3, 4 и 5.

Таблица 4: Систематизированные данные о наличии иммунитета у 16 собакоподобных обезьян

ID животного	Титр nAb			Титр bAb	
	AAV2-WT	VI-15.1	VI-15.2	VI-15.1	VI-15.2
AJ180	-	-	-	-	-
AJ760	-	-	-	-	-
AJ672	1:8	-	-	1:16	1:8
AJ658	1:8	-	-	1:8	1:4
AZ013	-	-	-	-	-
AZ135	1:8	1:2	1:2	1:8	1:8
AZ058	1:2	-	-	-	-
AY613	-	-	-	-	-
AY563	1:16	1:2	1:1	1:8	1:8
AJ249	1:1	-	-	-	-
AY895	-	-	-	-	-
AY867	1:8	-	-	1:4	1:4
AZ018	1:16	1:2	1:2	1:8	1:4
AY684	-	-	-	1:8	1:4
AJ574	1:256	1:8	1:8	1:64	1:64
AJ562	-	-	-	1:2	1:2

Таблица 5: Систематизированные данные о наличии иммунитета у 16 собакоподобных обезьян

Вариант AAV	Позитивный по NAb > 2	Позитивный по BAb > 2
VI-15.2	4 из 16	9 из 16
VI-15.1	4 из 16	9 из 16
AAV2-WT	8 из 16	n.d.

Векторы VI-15.1 и VI-15.2 вводили внутривенно в дозе 1×10^{13} ВГ/кг массы тела (Таблица 3), и профиль распределения векторных геномов исследовали через три недели после инъекции. Для VI-15.1, соответствующие количества копий вектора были обнаружены в желудочке сердца, в предсердии, в печени и в селезенке (фигура 7А). И напротив, ДНК вектора VI-15.2 обнаруживалась преимущественно в печени и в селезенке. На это указывало отчетливое соотношение в сердце:печени у групп животных, получавших VI-15.1 или VI-15.2 (фигуры 7А, 8А). Таким образом, можно сделать вывод, что VI-15.1 имеет улучшенный профиль хоминга в сердце по сравнению с VI-15.2. Однако, как для VI-15.1, так и для VI-15.2 не наблюдалось опосредованного капсидом хоминга в различных других тканях, на что указывало количественное определение ДНК вектора (фигуры 7А, 8А). Как было показано, экспрессия генов, опосредованная векторами VI-15.1 и VI-15.2,

коррелирует с распределением векторов. Авторами настоящего изобретения была обнаружена сильная экспрессия миокардиального eGFP в предсердии, а также в желудочке сердца, в то время как в печени наблюдалась лишь умеренная трансдукция. На основании анализа мРНК, VI-15.2 также показал некоторую трансдукцию в скелетные мышцы. Различные другие ткани не показали экспрессии на уровне РНК eGFP (фигура 7B, 8B). Как и ожидалось на основании предыдущих результатов, полученных для крыс, экспрессия, опосредованная VI-15.1, превосходила VI-15.2, предположительно за счет более высокой активности СAG-промотора. Кроме того, авторы настоящего изобретения подтвердили результаты профилей экспрессии генов на основе мРНК с помощью иммуногистохимического окрашивания срезов тканей. Авторы настоящего изобретения наблюдали сильный, но очаговый сигнал eGFP клеток миокарда в основании сердца, а также в желудочке сердца, что еще раз подтвердило полученные ранее результаты. В других нецелевых тканях, позитивное окрашивание на eGFP в основном ограничивалось отдельными гепатоцитами, нейронами и зародышевыми центрами селезенки (фигура 7C, фигура 8C). Органами без eGFP-позитивных клеток являются: легкие, глаза, матка, спинной мозг, поджелудочная железа, скелетные мышцы и почки. Для количественной оценки паттерна экспрессии генов в сагиттальных срезах всего сердца авторами была проведена количественная оценка площади на наличие eGFP-позитивных клеток. Для VI-15.1, эти результаты показали наличие до ~23% позитивно окрашенных клеток в предсердии и до ~15% позитивно окрашенных клеток в желудочке сердца (фигура 7D). Кроме того, количественная оценка eGFP в тканевых лизатах с помощью ELISA подтвердила эти результаты (фигура 7E). Меньшая трансдукция кардиомиоцитов в случае VI-15.2 по сравнению с VI-15.1 была обусловлена более низкой эффективностью вектора в результате снижения степени хоминга в сердце в комбинации с более низкой активностью экспрессии, опосредованной CMV-промотором (фигура 8D, 8E).

В основном, две функции дополняют уникальные свойства нацеливания VI-15.1 и VI-15.2 на ткань сердца у NHP и на экспрессию генов конкретно в сердце. Опосредованное пептидами нацеливание рецептора на ткань/клетки сердца, включает, но не ограничивается ими, нацеливание рецепторов, подклассов рецепторов или клеточных углеводов, присутствующих на ткани-мишени, и отсутствие их нацеливания на печень. Обе функции зависят от индивидуальной конструкции пептида, их уникальных последовательностей-наполнителей, а также конкретного сайта инсерции (R588), который был использован для VI-15.1 и VI-15.2. Кроме того, уникальные свойства VI-15.1 и VI-15.2 нацеливаться на эндотелиальные клетки у мышей могут указывать на то, что эндотелиальные структуры у мышей могут служить суррогатной моделью для нацеливания на кардиомиоциты у крыс и у NHP и на кардиомиоциты человека, выделенные из hiPSC.

2.6. Векторы, экспрессирующие факторы репарации тканей сердца

Кардиомиопатии являются основной причиной сердечной недостаточности (Writting Group et al., 2016). Генотерапия, экспрессирующая факторы репарации ткани сердца, такие как Mydgf (Korf-Klingebiel et al., 2015, 2016; Korf-Klingebiel et al., 2021), и проводимая

специально для доставки в сердечную ткань с использованием VI-15.1, может ослаблять гипотрофию сердца и сердечный фиброз и восстанавливать сердечную функцию. Для изучения клинического потенциала доставки генов в ткани сердца пациентов, VI-15.1 и VI-15.2 были протестированы на кардиомиоцитах человека. Таким образом, кардиомиоциты человека, полученные из hiPSC, трансдуцировали VI-15.1, VI-15.2 и AAV9 в качестве контроля. Через 48 часов, экспрессию eGFP анализировали с помощью флуоресцентной визуализации. Все векторы трансдуцировали кардиомиоциты человека, полученные из hiPSC, с сопоставимой эффективностью (фигура 9). Для того чтобы понять, может ли MydGF (Bortnov et al., 2018; Bortnov et al., 2019) экспрессироваться из экспрессионных плазмид рAAV, авторы настоящего изобретения трансфицировали плазмидную ДНК, кодирующую MydGF, под контролем промотора CAG (фигура 10). Через 48 часов после трансфекции, иммуноблот-анализ показал, что MydGF, экспрессируемый конструкциями рAAV, в основном сохраняется в клеточной фракции (в лизате), в то время как мутантный вариант, из которого были удалены четыре концевые аминокислоты RTEL (MydGF-RTEL), интенсивно секретируется в среду (фигура 11). Эти данные показали что экспрессируемый AAV MydGF или MydGF-RTEL может доставляться под действием VI-15.1 либо локально, либо в виде секретируемых факторов. Для дальнейшего изучения возможности доставки генов репарации ткани сердца и их экспрессии в ткани сердца, крысам Sprague Dawley внутривенно вводили $2,5 \times 10^{11}$ ВГ/кг, $2,5 \times 10^{12}$ ВГ/кг или $2,5 \times 10^{13}$ ВГ/кг 15.1, с последующим переносом последовательности MydGF под контролем промотора CAG. Для анализа на трансдукцию и экспрессию MydGF через 21 день после инъекции 15.1, ткани сердца анализировали на уровне белка MydGF в цельных срезах сердца с помощью иммуногистохимического анализа (ИНС, Фигуры 12, 13 и 14) и на экспрессию мРНК MydGF в ткани сердца (Фигура 15). Для $2,5 \times 10^{12}$ ВГ/кг и $2,5 \times 10^{13}$ ВГ/кг, экспрессия MydGF может быть подтверждена с помощью ИГХ в срезах целого сердца, а также путем оценки уровней мРНК в ткани сердца. В данном случае наблюдалось дозозависимое увеличение сигнала AAV 15.1, как на уровне мРНК, так и при окрашивании MydGF в ткани. Кроме того, анализ цельных срезов сердца показал широкое распределение MydGF по всей площади сердца для доз $2,5 \times 10^{12}$ ВГ/кг и $2,5 \times 10^{13}$ ВГ/кг. Эти данные показали, что 15.1 можно использовать для индуцирования экспрессии факторов репарации ткани сердца *in vivo* у видов, имеющих большое значение в качестве организма-модели для лечения сердечных заболеваний у человека, и для оценки терапевтических подходов при лечении сердечных заболеваний (Patten and Hall-Porter, 2009; Riehle et al., 2019).

Чтобы показать, что вариант MydGF-RTEL также обладает активностью и может быть использован в качестве терапевтического груза для вектора 15.1, оба варианта MydGF применяли в качестве модели ишемической реперфузии сердца мыши. Мышам накладывали лигатуру на коронарные артерии с последующей обработкой белком, а именно, рекомбинантным MydGF и рекомбинантным вариантом MydGF-RTE. Белки вводили в виде исходной ударной дозы во время реперфузии с последующим 7-дневным постоянным воздействием. Через 28 дней после операции, обработка обоими вариантами

MydGF показала положительный эффект в отношении ремоделирования левого желудочка и систолической дисфункции (фигура 16 А, В) по сравнению с оперированными мышами и мышами, получавшими плацебо, а также положительный эффект в отношении ангиогенеза (фигура 17 А), и уменьшила площадь инфаркта (фигура 17В). Эти данные указывают на активность варианта MydGF-RTEL и, следовательно, подтверждают возможность использования этого варианта в качестве терапевтического груза для 15.1 для лечения кардиомиопатии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Asokan A, Conway JC, Phillips JL, Li C, Hegge J, Sinnott R, Yadav S, DiPrimio N, Nam HJ, Agbandje-McKenna M et al (2010) Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol* 28: 79-82

Bass-Stringer S, Bernardo BC, May CN, Thomas CJ, Weeks KL, McMullen JR. Adeno-Associated Virus Gene Therapy: Translational Progress and Future Prospects in the Treatment of Heart Failure. *Heart Lung Circ.* 2018 Nov;27(11):1285-1300. doi: 10.1016/j.hlc.2018.03.005. Epub 2018 Mar 17. PMID: 29703647.)

Bortnov V, Annis DS, Fogerty FJ, Barretto KT, Turton KB, Mosher DF (2018) Myeloid-derived growth factor is a resident endoplasmic reticulum protein. *J Biol Chem* 293: 13166-13175

Bortnov V, Tonelli M, Lee W, Lin Z, Annis DS, Demerdash ON, Bateman A, Mitchell JC, Ge Y, Markley JL et al (2019) Solution structure of human myeloid-derived growth factor suggests a conserved function in the endoplasmic reticulum. *Nat Commun* 10: 5612

Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM et al (2014) Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* 11: 855-860

Capitani Mirco, Sallèse Michele, The KDEL receptor: New functions for an old protein, *FEBS Letters*, Volume 583, Issue 23, 2009, Pages 3863-3871, ISSN 0014-5793, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.053>.

Chamberlain K, Riyad JM, Weber T (2017) Cardiac gene therapy with adeno-associated virus-based vectors. *Curr Opin Cardiol*

Chemaly ER, Hajjar RJ, Lipskaia L (2013) Molecular targets of current and prospective heart failure therapies. *Heart* 99: 992-1003

Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F (2018) Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 8: 87-104

Drawnel FM, Boccardo S, Prummer M, Delobel F, Graff A, Weber M, Gerard R, Badi L, Kam-Thong T, Bu L et al (2014) Disease modeling and phenotypic drug screening for diabetic cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells. *Cell Rep* 9: 810-821

Ebenhoch R., Akhdar A., Reboll M.R., Korf-Klingebiel M., Gupta P., Armstrong J., et al. Crystal structure and receptor-interacting residues of MYDGF - a protein mediating ischemic tissue repair. *Nat Commun.* 2019 Nov; 10 (1): 1-10.

England J, Granados-Riveron J, Polo-Parada L, Kuriakose D, Moore C, Brook JD, Rutland CS, Setchfield K, Gell C, Ghosh TK et al (2017) Tropomyosin 1: Multiple roles in the developing

heart and in the formation of congenital heart defects. *J Mol Cell Cardiol* 106: 1-13

Foinquinos A, Batkai S, Genschel C, Viereck J, Rump S, Gyongyosi M, Traxler D, Riesenhuber M, Spannauer A, Lukovic D et al (2020) Preclinical development of a miR-132 inhibitor for heart failure treatment. *Nat Commun* 11: 633

Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, Barnard D, Bouchard A, Jaski B, Lyon AR et al (2016) Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet* 387: 1178-1186

Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, Barnard D, Bouchard A, Jaski B, Lyon AR, Pogoda JM, Rudy JJ, Zsebo KM. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet*. 2016 Mar 19;387(10024):1178-86. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00082-9. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26803443.

Hordeaux J, Wang Q, Katz N, Buza EL, Bell P, Wilson JM (2018) The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. *Mol Ther* 26: 664-668

Irene Gil-Farina, Raffaele Fronza, Christine Kaepfel, Esperanza Lopez-Franco, Valerie Ferreira, Delia D'Avola, Alberto Benito, Jesus Prieto, Harald Petry, Gloria Gonzalez-Asequinolaza, Manfred Schmidt, Recombinant AAV Integration Is Not Associated With Hepatic Genotoxicity in Nonhuman Primates and Patients, *Molecular Therapy*, Volume 24, Issue 6, 2016, Pages 1100-1105, ISSN 1525-0016, <https://doi.org/10.1038/mt.2016.52>.

Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Dittrich H, Hajjar RJ et al (2011) Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 124: 304-313

Korbelin J, Dogbevia G, Michelfelder S, Ridder DA, Hunger A, Wenzel J, Seismann H, Lampe M, Bannach J, Pasparakis M et al (2016a) A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Mol Med* 8: 609-625

Korbelin J, Sieber T, Michelfelder S, Lunding L, Spies E, Hunger A, Alawi M, Rapti K, Indenbirken D, Muller OJ et al (2016b) Pulmonary Targeting of Adeno-associated Viral Vectors by Next-generation Sequencing-guided Screening of Random Capsid Displayed Peptide Libraries. *Mol Ther* 24: 1050-1061

Korf-Klingebiel M, Reboil MR, Klede S, Brod T, Pich A, Polten F, Napp LC, Bauersachs J, Ganser A, Brinkmann E et al (2016) Corrigendum: Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat Med* 22: 446

Korf-Klingebiel M., Reboil M.R., Klede S., Brod T., Pich A., Polten F., et al. Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat Med*. 2015 Feb; 21 (2): 140-149.

Korf-Klingebiel M, Reboll MR, Polten F, Weber N, Jäckle F, Wu X, Kallikourdis M, Kunderfranco P, Condorelli G, Giannitsis E, Kustikova OS, Schambach A, Pich A, Widder JD, Bauersachs J, Heuvel J, Kraft T, Wang Y, Wollert KC (2021), Myeloid-Derived Growth Factor Protects Against Pressure Overload-Induced Heart Failure by Preserving Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Expression in Cardiomyocytes, *Circulation*, 144:1227-1240

Lyon AR, Babalis D, Morley-Smith AC, Hedger M, Suarez Barrientos A, Foldes G, Couch LS, Chowdhury RA, Tzortzis KN, Peters NS, Rog-Zielinska EA, Yang HY, Welch S, Bowles CT, Rahman Haley S, Bell AR, Rice A, Sasikaran T, Johnson NA, Falaschetti E, Parameshwar J, Lewis C, Tsui S, Simon A, Pepper J, Rudy JJ, Zsebo KM, Macleod KT, Terracciano CM, Hajjar RJ, Banner N, Harding SE. Investigation of the safety and feasibility of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with chronic heart failure supported with a left ventricular assist device - the SERCA-LVAD TRIAL. *Gene Ther*. 2020 Dec;27(12):579-590. doi: 10.1038/s41434-020-0171-7. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32669717; PMCID: PMC7744277.

Morrison M, Klein C, Clemann N, Collier DA, Hardy J, Heisserer B, Cader MZ, Graf M, Kaye J (2015) StemBANCC: Governing Access to Material and Data in a Large Stem Cell Research Consortium. *Stem Cell Rev Rep* 11: 681-687

Pang JKS, Phua QH, Soh BS (2019) Applications of miRNAs in cardiac development, disease progression and regeneration. *Stem Cell Res Ther* 10: 336

Patten RD and Hall-Porter MR (2009), Small Animal Models of Heart Failure, Development of Novel Therapies, Past and Present, *Circulation: Heart Failure*, 2:138-144

Powell SK, Rivera-Soto R, Gray SJ (2015) Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med* 19: 49-57

Qiao C, Yuan Z, Li J, He B, Zheng H, Mayer C, Li J, Xiao X (2011) Liver-specific microRNA-122 target sequences incorporated in AAV vectors efficiently inhibits transgene expression in the liver. *Gene Ther* 18: 403-410

Riehle C and Bauersachs J (2019), Small animal models of heart failure, *Cardiovascular Research*, Volume 115, Issue 13, 1838-1849

Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y; Lentiviral vectors: basic to translational, *Biochem J*, 443 (3): 603-618

Strobel B, Zuckschwerdt K, Zimmermann G, Mayer C, Eytner R, Rechtsteiner P, Kreuz S, Lamla T (2019) Standardized, Scalable, and Timely Flexible Adeno-Associated Virus Vector Production Using Frozen High-Density HEK-293 Cell Stocks and CELLdiscs. *Hum Gene Ther Methods* 30: 23-33

Tarantal AF, Lee CCI, Martinez ML, Asokan A, Samulski RJ (2017) Systemic and Persistent Muscle Gene Expression in Rhesus Monkeys with a Liver De-Targeted Adeno-Associated Virus Vector. *Hum Gene Ther* 28: 385-391

Tilemann L, Ishikawa K, Weber T, Hajjar RJ (2012) Gene therapy for heart failure. *Circ Res* 110: 777-793

Ucar A, Gupta SK, Fiedler J, Erikci E, Kardasinski M, Batkai S, Dangwal S, Kumarswamy R, Bang C, Holzmann A et al (2012) The miRNA-212/132 family regulates both cardiac

hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat Commun* 3: 1078

Wilson JM, Flotte TR (2020) Moving Forward After Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy. *Hum Gene Ther* 31: 695-696

Writing Group M, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Despres JP et al (2016) Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 133: e38-360

Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72: 2224-2232

Xu T, Zhou Q, Che L, Das S, Wang L, Jiang J, Li G, Xu J, Yao J, Wang H et al (2016) Circulating miR-21, miR-378, and miR-940 increase in response to an acute exhaustive exercise in chronic heart failure patients. *Oncotarget* 7: 12414-12425

Yang L, Jiang J, Drouin LM, Agbandje-McKenna M, Chen C, Qiao C, Pu D, Hu X, Wang DZ, Li J et al (2009) A myocardium tropic adeno-associated virus (AAV) evolved by DNA shuffling and in vivo selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3946-3951

Yamada KP, Tharakan S, Ishikawa K. Consideration of clinical translation of cardiac AAV gene therapy. *Cell Gene Ther Insights*. 2020;6(5):609-615. doi:10.18609/cgti.2020.073

Ying Y, Muller OJ, Goehring C, Leuchs B, Trepel M, Katus HA, Kleinschmidt JA (2010) Heart-targeted adeno-associated viral vectors selected by in vivo biopanning of a random viral display peptide library. *Gene Ther* 17: 980-990

Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, Wagner K, Greenberg B, Jessup M, Hajjar RJ (2014) Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res* 114: 101-108

Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, Wagner K, Greenberg B, Jessup M, Hajjar RJ. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res*. 2014 Jan 3;114(1):101-8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302421. Epub 2013 Sep 24. PMID: 24065463.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Капсидный белок, который обеспечивает специфическую трансдукцию мышинных эндотелиальных клеток для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у приматов, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов приматов.

2. Капсидный белок для применения в способе по п.1, где указанный капсидный белок содержит:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или 3; или
- (c) вариант (a) или (b), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты.

3. Капсидный белок для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у примата, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата, где указанный капсидный белок содержит:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или 3; или
- (c) вариант (a) или (b), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты.

4. Капсидный белок для применения в способе лечения или профилактики кардиомиопатии, где указанный капсидный белок содержит

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или 3; или
- (c) вариант (a) или (b), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты.

5. Капсидный белок для применения в способе по любому из пп. 1-4, где указанный капсидный белок имеет длину от 300 до 800 аминокислот.

6. Капсидный белок для применения в способе по любому из пп. 1-5, где указанный капсидный белок представляет собой капсидный белок вируса, принадлежащего к семейству *Parvoviridae*, а предпочтительно капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV).

7. Капсидный белок для применения в способе по п.6, где указанный AAV выбран из группы, состоящей из AAV серотипов 2, 4, 6, 8 и 9, и где указанный AAV предпочтительно относится к серотипу 2.

8. Капсидный белок для применения в способе по п.7, где указанный капсидный

белок представляет собой белок VP1 серотипа 2 AAV.

9. Капсидный белок для применения в способе по любому из пп. 1-8, где указанная аминокислотная последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 или ее вариант встроены в область аминокислот 550-600 капсидного белка.

10. Капсидный белок для применения в способе по любому из пп. 1-9, где указанный капсидный белок содержит:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8;
- (b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8; или
- (c) фрагмент одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a) или (b).

11. Капсидный белок для применения в способе по любому из пп. 2-9, где указанный капсидный белок содержит:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25;
- (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;
- (d) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27; или
- (e) вариант (a), (b), (c) или (d), который отличается от последовательности SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 или SEQ ID NO:27, соответственно, модификацией одной аминокислоты.

12. Вирусный капсид, содержащий капсидный белок по любому из пп. 1-11, для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у приматов, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата.

13. Нуклеиновая кислота, кодирующая капсидный белок по любому из пп. 1-11, для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у приматов, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата.

14. Плаزمид, содержащая нуклеиновую кислоту по п.13, для применения в способе лечения или профилактики заболевания сердца у приматов, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата.

15. Рекомбинантный вирусный вектор, где вектор содержит капсид и упакованный в него трансген, где капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий:

- (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;
- (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;

- (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3;
 - (d) вариант (a), (b) или (c), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты;
 - (e) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24;
 - (f) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25;
 - (g) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;
 - (h) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;
 - (i) вариант (e), (f), (g) или (h), который отличается от последовательности SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 модификацией одной аминокислоты,
 - (j) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8; или
 - (k) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8;
- для применения:

(A) в способе лечения или профилактики заболевания сердца у примата, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата; или

(B) в способе лечения или профилактики кардиомиопатии у приматов; или

(C) в способе лечения или профилактики сердечной недостаточности или хронической сердечной недостаточности у приматов.

16. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.15, где указанная кардиомиопатия выбрана из группы, состоящей из гипертрофической кардиомиопатии (HCM), дилатационной кардиомиопатии (DCM), аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (ARVC), рестриктивной кардиомиопатии (RCM) и левожелудочковой некомпактной кардиомиопатии (LVNC).

17. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.15, где указанная кардиомиопатия выбрана из группы, состоящей из первичной кардиомиопатии, предпочтительно наследственной кардиомиопатии, кардиомиопатии, вызванной спонтанными мутациями, и приобретенной кардиомиопатии, предпочтительно ишемической кардиомиопатии, вызванной атеросклеротическими или другими заболеваниями коронарных артерий, кардиомиопатии, вызванной инфекцией или интоксикацией миокарда.

18. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.15, где указанное заболевание сердца выбрано из группы, состоящей из стенокардии, фиброза сердца и сердечной гипертрофии.

19. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.15, где

указанная сердечная недостаточность или хроническая сердечная недостаточность представляет собой сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), сердечную недостаточность со сниженной фракцией выброса (HFGrEF) или сердечную недостаточность со средним диапазоном фракции выброса (HFmrEF).

20. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.19, где указанный HFpEF представляет собой HFpEF стадии С или стадии D, или где указанный HFGrEF представляет собой HFGrEF стадии С или стадии D.

21. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по любому из пп. 15-20, где указанный вектор представляет собой рекомбинантный вектор AAV.

22. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.21, где указанный AAV выбран из группы, состоящей из AAV серотипа 2, 4, 6, 8 и 9, и предпочтительно AAV серотипа 2.

23. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по любому из пп. 15-22, где трансген присутствует в форме оцДНК или дцДНК.

24. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по любому из пп. 15-23, где трансген кодирует белок, выбранный из группы факторов репарации тканей сердца, регуляторов кальция или проангиогенных факторов.

25. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.24, где трансген кодирует фактор репарации ткани сердца huMydggf.

26. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.24, где трансген кодирует регулятор кальция, выбранный из группы, состоящей из SERCA2a, SUMO1 и S100A1.

27. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.24, где трансген кодирует проангиогенный фактор VEGF.

28. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по любому из пп. 15-23, где трансген кодирует микроРНК (миРНК).

29. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.28, где указанная микроРНК участвует в регуляции пути MAPK, пути MYOD, пути FOXO3 или пути ERK-MAPK.

30. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.28 или 29, где указанная микроРНК выбрана из группы, состоящей из miR-378, miR669a, miR-21, miR212 и miR132.

31. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по любому из пп. 15-30, где трансген представляет собой ген, который должен восполнять дефектный ген у примата, подлежащего лечению.

32. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по п.31, где указанный ген кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из тяжелой цепи бета-миозина (MYH7), миозин-связывающего белка С (MYBPC3), тропонина I (TNNI3), тропонина Т (TNNT2), цепи альфа-1 тропомиозина (TPM1) или легкой цепи миозина (MYL3).

33. Рекомбинантный вирусный вектор для применения в способе по любому из пп. 15-32, где вектор был получен для внутривенного введения.

34. Рекомбинантный вирусный вектор, содержащий капсид и упакованный в него трансген, где капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;

(c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; или

(d) вариант (a), (b) или (c), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты;

и где трансген кодирует фактор репарации ткани сердца huMydggf.

35. Рекомбинантный вирусный вектор по п.34, где указанный huMydggf содержит:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 20, 33 или 34;

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, 20, 33 или 34; или

(c) фрагмент одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (a) или (b).

36. Рекомбинантный вирусный вектор по п.34 или 35, где указанный капсидный белок содержит:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25;

(c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;

(d) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;

(e) вариант (a), (b), (c) или (d), который отличается от последовательности SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27 модификацией одной аминокислоты.

37. Рекомбинантный вирусный вектор по любому из пп. 34-36, содержащий капсид и упакованный в него трансген, где капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;

(с) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; или

(d) вариант (а), (b) или (с), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты, где huMydggf не имеет функционального сигнала хранения в аппарате Гольджи/эндоплазматическом ретикулуме, а предпочтительно huMydggf, который содержит последовательность SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:34.

38. Рекомбинантный вирусный вектор по любому из пп. 34-37 для применения в способе лечения или профилактики:

(i) заболевания сердца у примата, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата; или

(ii) кардиомиопатии у приматов; или

(iii) сердечной недостаточности или хронической сердечной недостаточности у приматов.

39. Рекомбинантный вирусный вектор, содержащий капсид и упакованный в него трансген, где капсид содержит по меньшей мере один капсидный белок, содержащий:

(а) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

(с) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; или

(d) вариант (а), (b) или (с), который отличается от последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3 модификацией одной аминокислоты; и где трансген кодирует человеческий регулятор кальция SERCA2a.

40. Рекомбинантный вирусный вектор по п.39, где человеческий регулятор кальция SERCA2a содержит:

(а) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 28-32;

(b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28-32; или

(с) фрагмент одной из аминокислотных последовательностей, определенных в (а) или (b).

41. Рекомбинантный вирусный вектор по п.39 или 40, где указанный капсидный белок содержит:

(а) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25;

(с) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26;

(d) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27;

(е) вариант (а), (b), (с) или (d), который отличается от последовательности SEQ ID

NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27 модификацией одной аминокислоты.

42. Рекомбинантный вирусный вектор по любому из пп. 39-41 для применения в способе лечения или профилактики:

(i) заболевания сердца у примата, где указанный способ лечения или профилактики заболевания сердца включает трансдукцию кардиомиоцитов примата;

(ii) хронической сердечной недостаточности; или

(iii) сердечной недостаточности у пациентов со сниженной фракцией выброса.

43. Фармацевтическая композиция, содержащая капсидный белок по любому из пп. 1-11, вирусный капсид по п.12, нуклеиновую кислоту по п.13, плазмиду по п.14 или рекомбинантный вирусный вектор по любому из пп. 15-42.

44. Капсидный белок для применения в способе по любому из пп. 1-11, вирусный капсид для применения в способе по п.12, нуклеотидная последовательность для применения в способе по п.13, плазида для применения в способе по п.14, рекомбинантный вектор AAV для применения в способе по пп. 15-33, 38 и 42 или фармацевтическая композиция для применения в способе по п.43, где указанным приматом является человек.

45. Применение капсидного белка по любому из пп. 1-11, вирусного капсида по п. 12, нуклеиновой кислоты по п.13, плазмиды по п.14, рекомбинантного вирусного вектора по любому из пп. 15-42 или фармацевтической композиции по п.43, для получения лекарственного средства для лечения или профилактики заболеваний сердца у приматов.

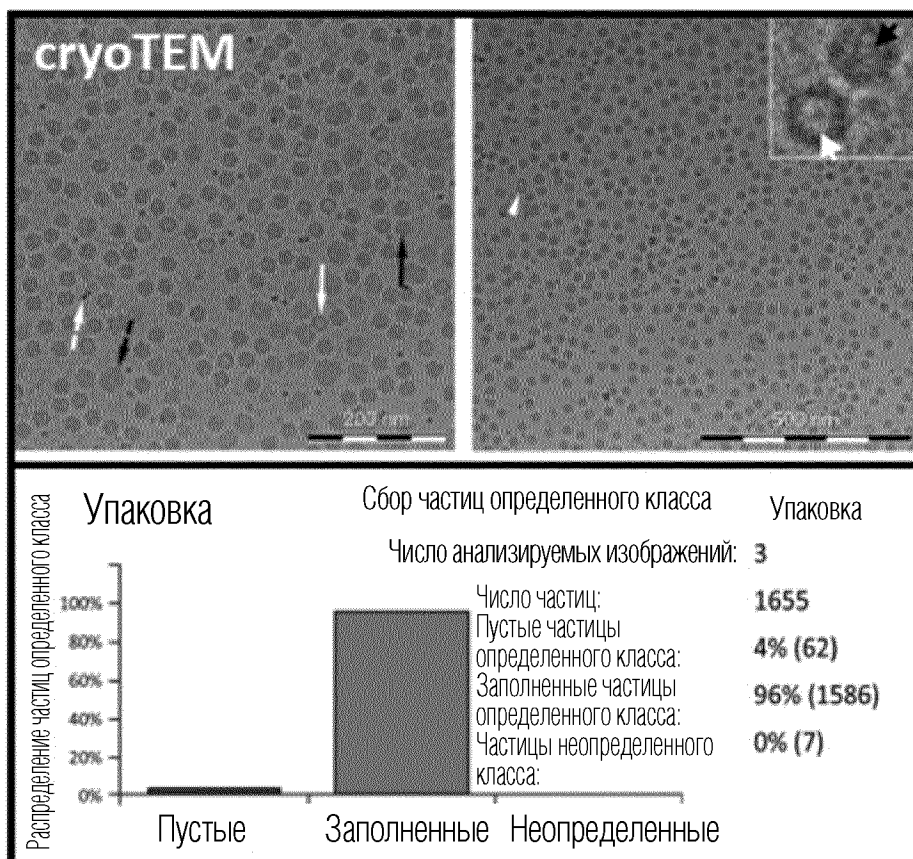
46. Применение вектора по любому из пп. 15-42 для трансдукции выделенных клеток ткани сердца крысы или примата, предпочтительно выделенных кардиомиоцитов.

По доверенности

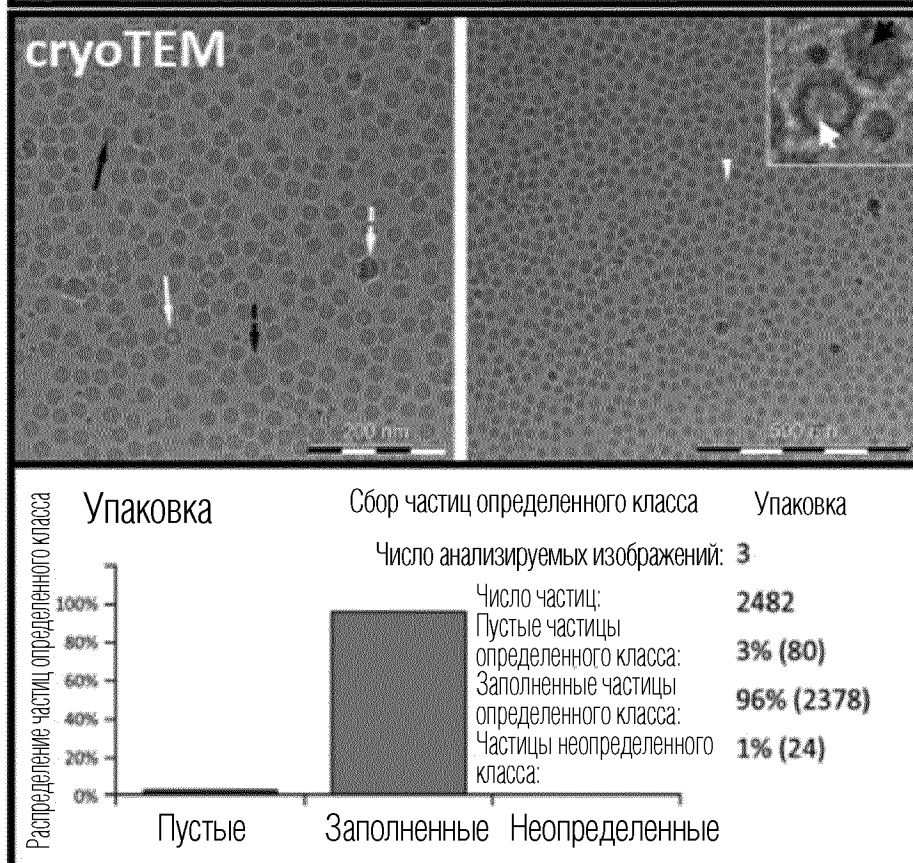
1/24

ФИГ. 1А

VI-15.1

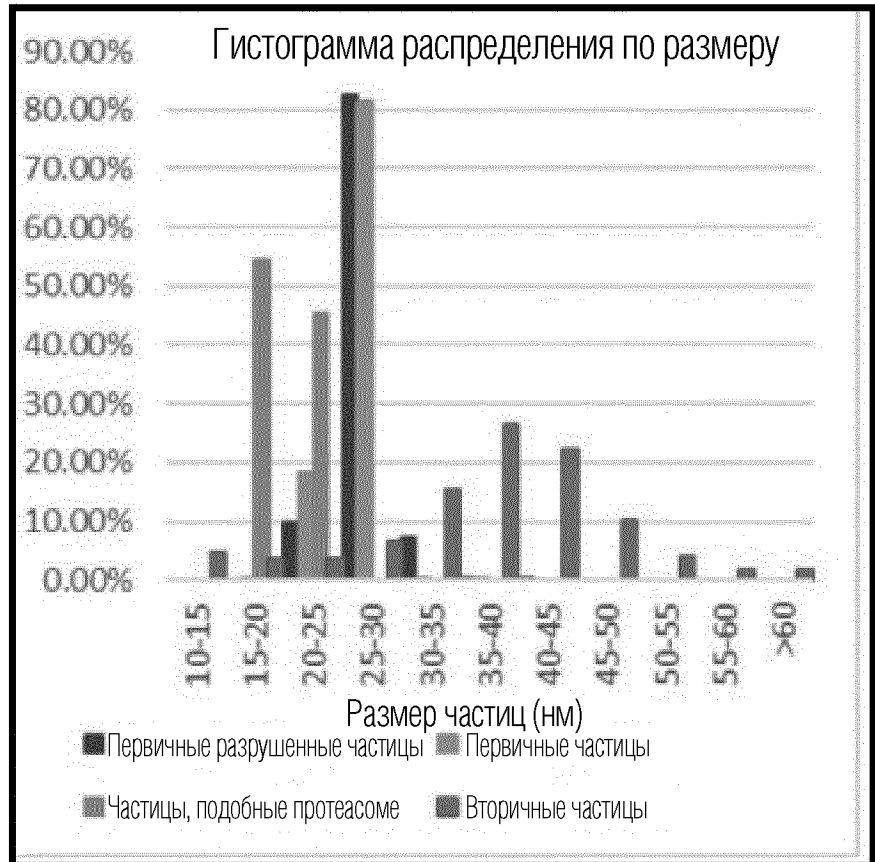


VI-15.2

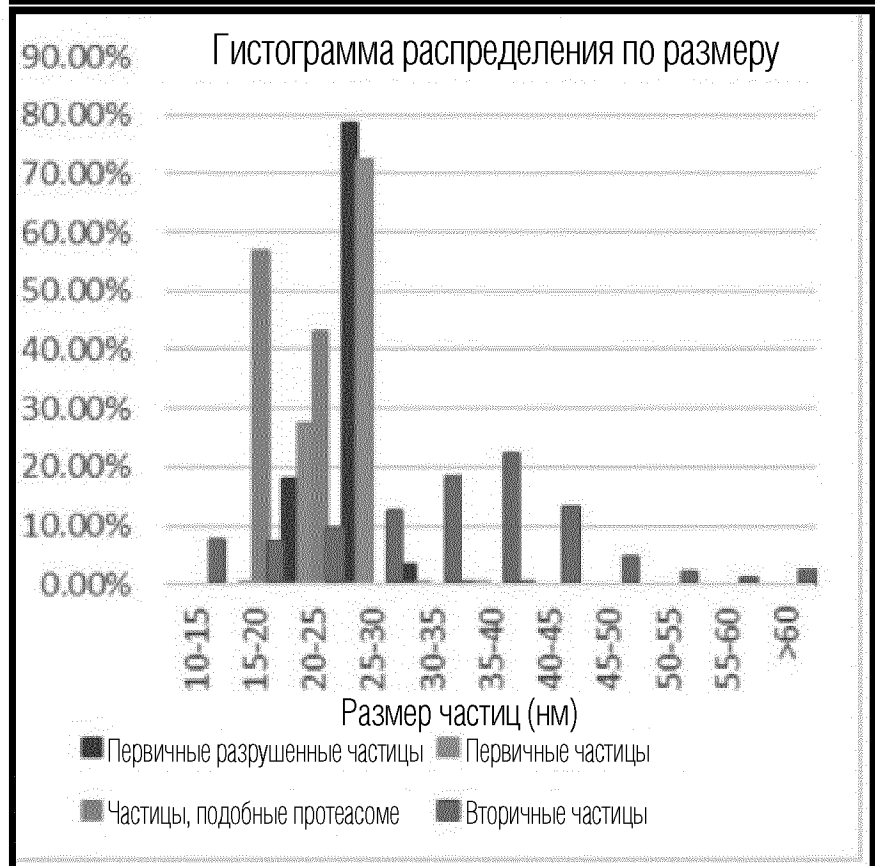


ФИГ. 1В

VI-15.1

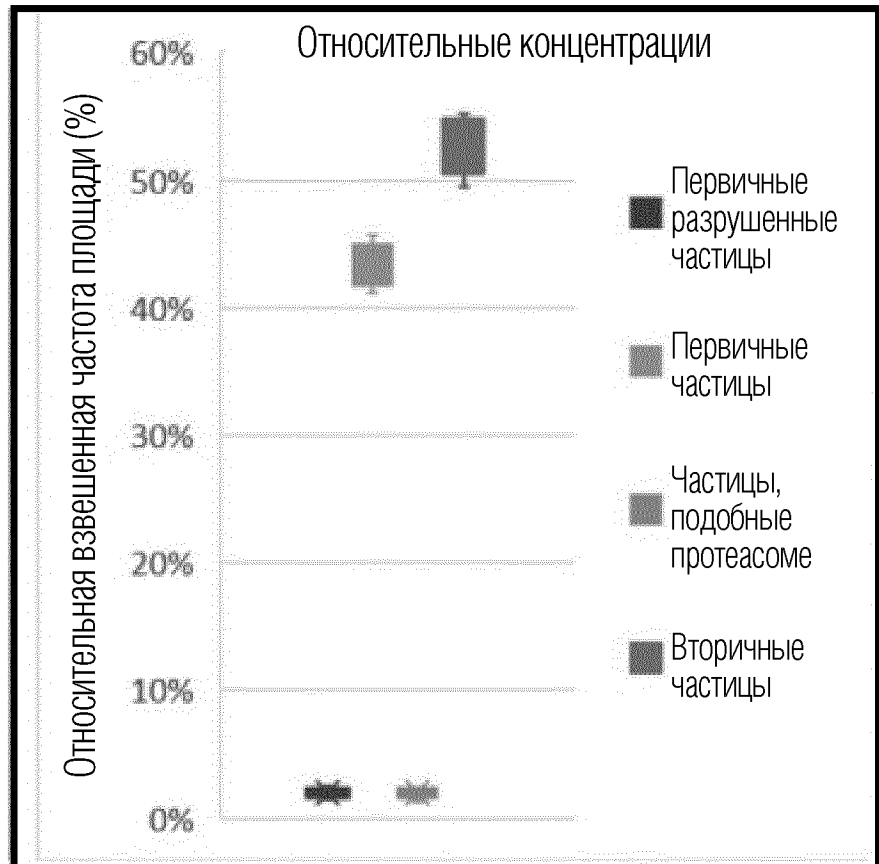


VI-15.2

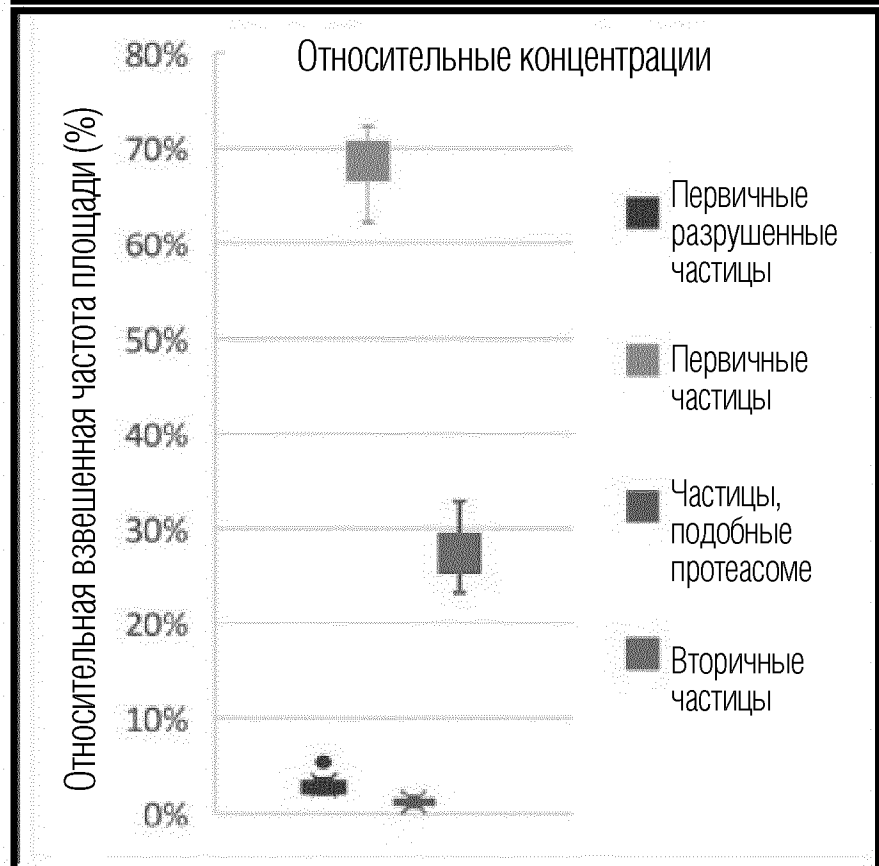


ФИГ. 1С

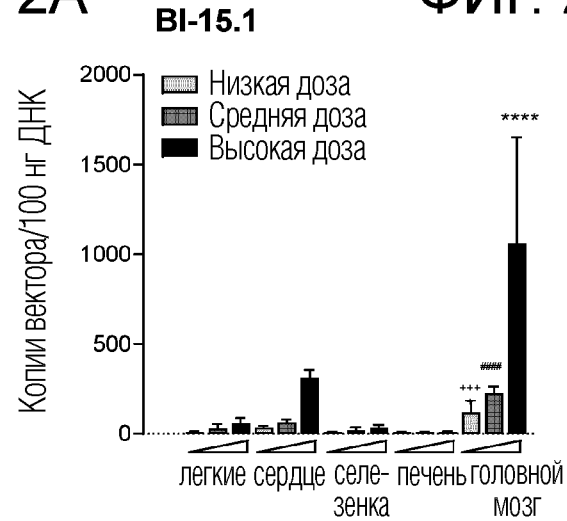
VI-15.1



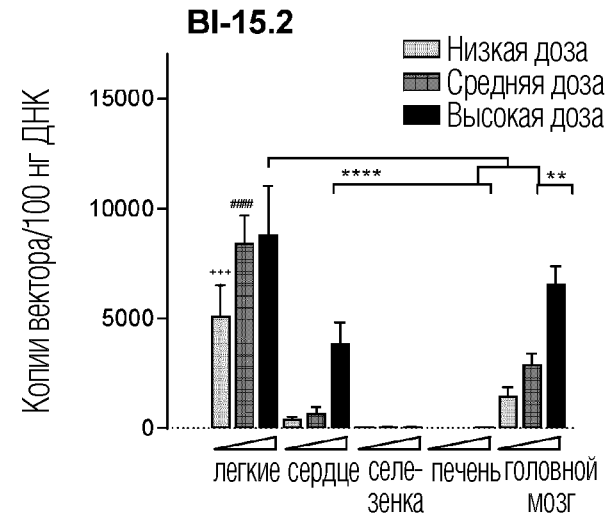
VI-15.2



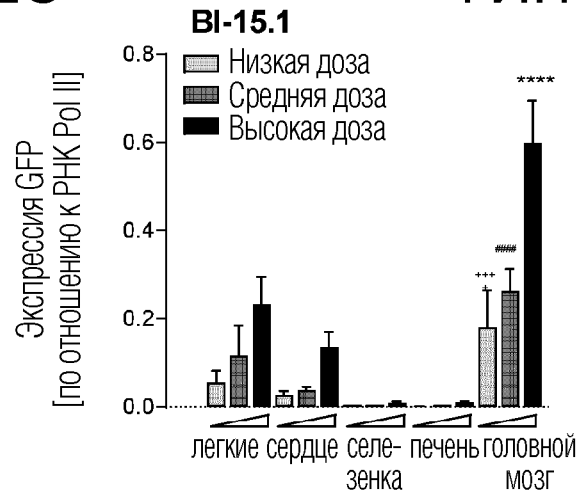
ФИГ. 2А



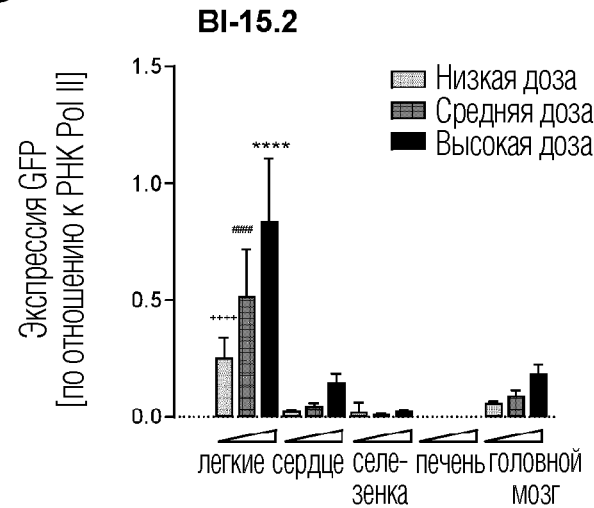
ФИГ. 2В



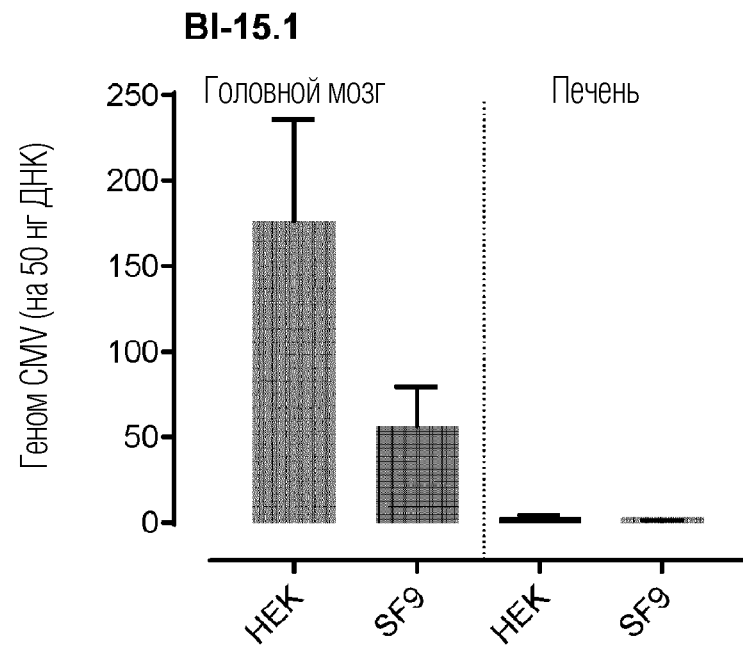
ФИГ. 2С



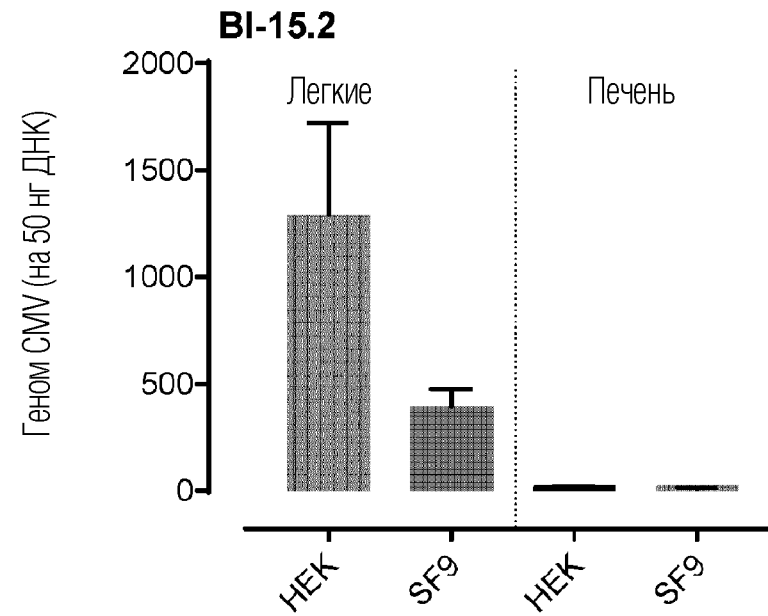
ФИГ. 2D



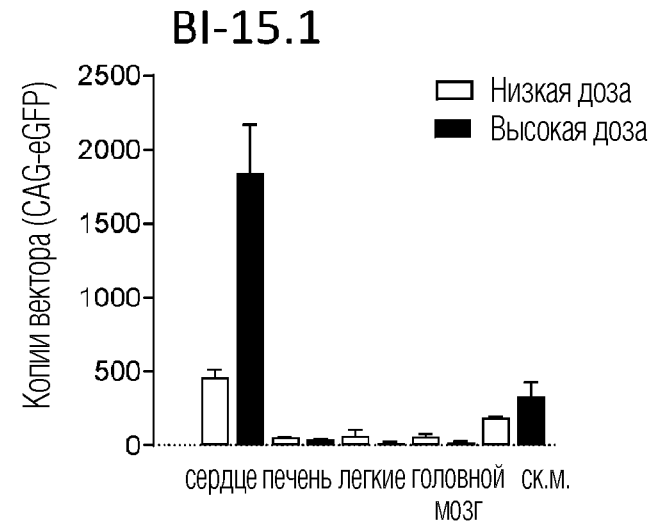
ФИГ. 2Е



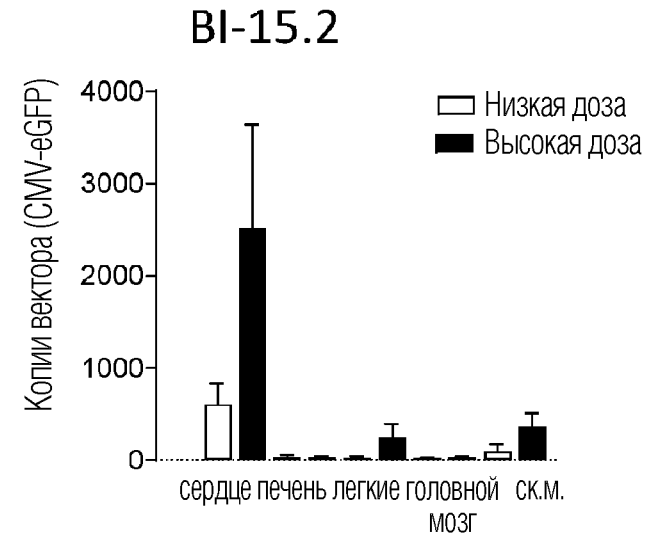
ФИГ. 2F



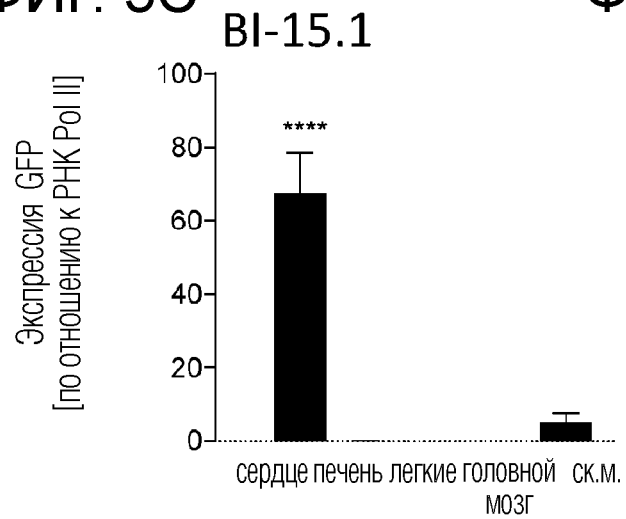
ФИГ. 3А



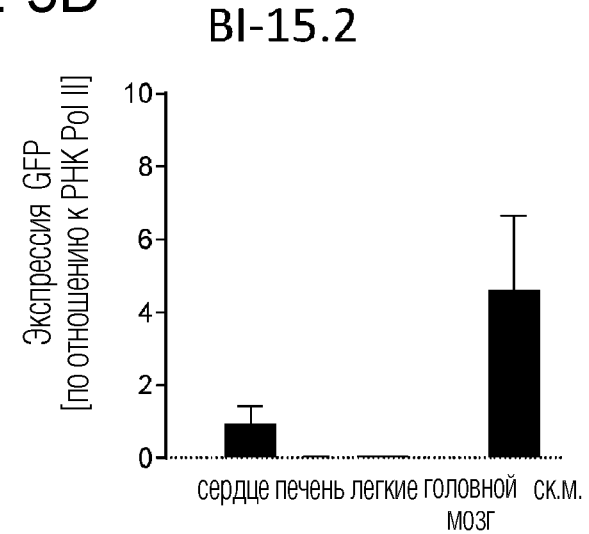
ФИГ. 3В



ФИГ. 3С

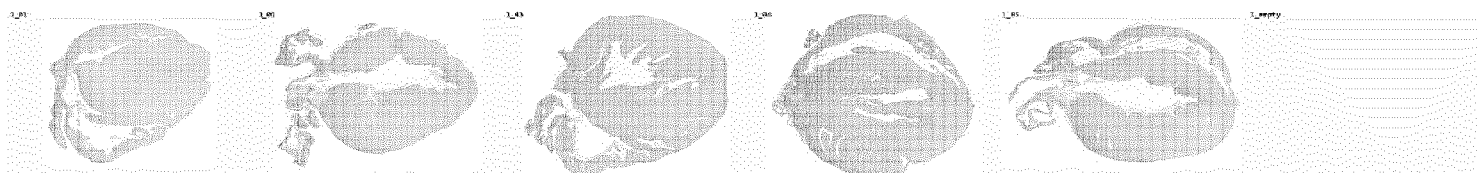


ФИГ. 3Д



ФИГ. 4А

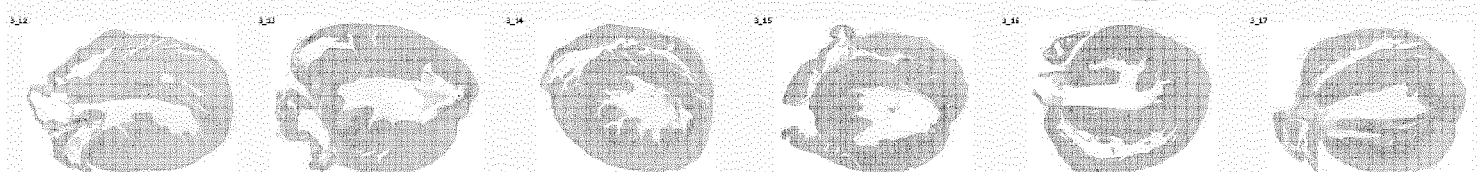
Носитель



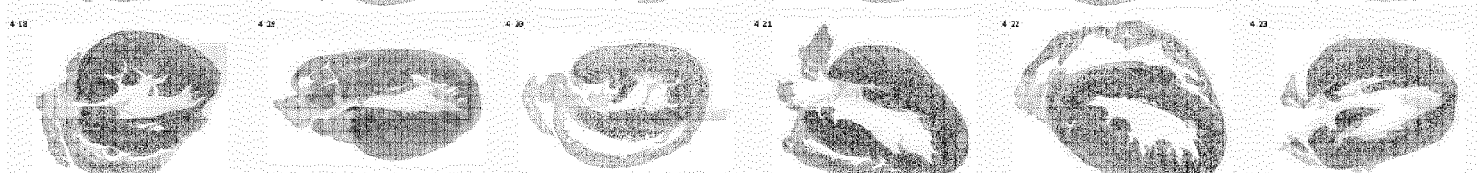
Низкая доза
BI-15.2



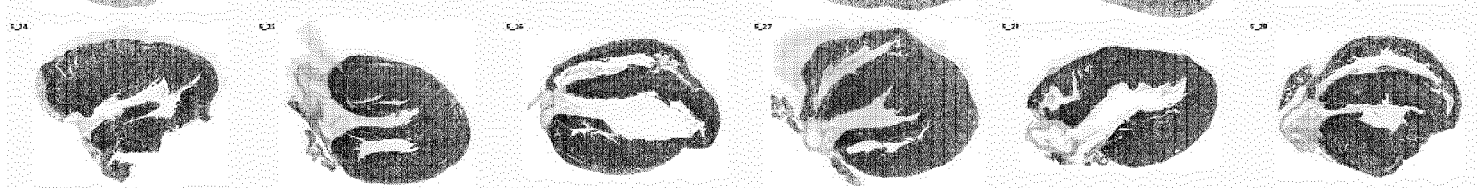
Высокая доза
BI-15.2



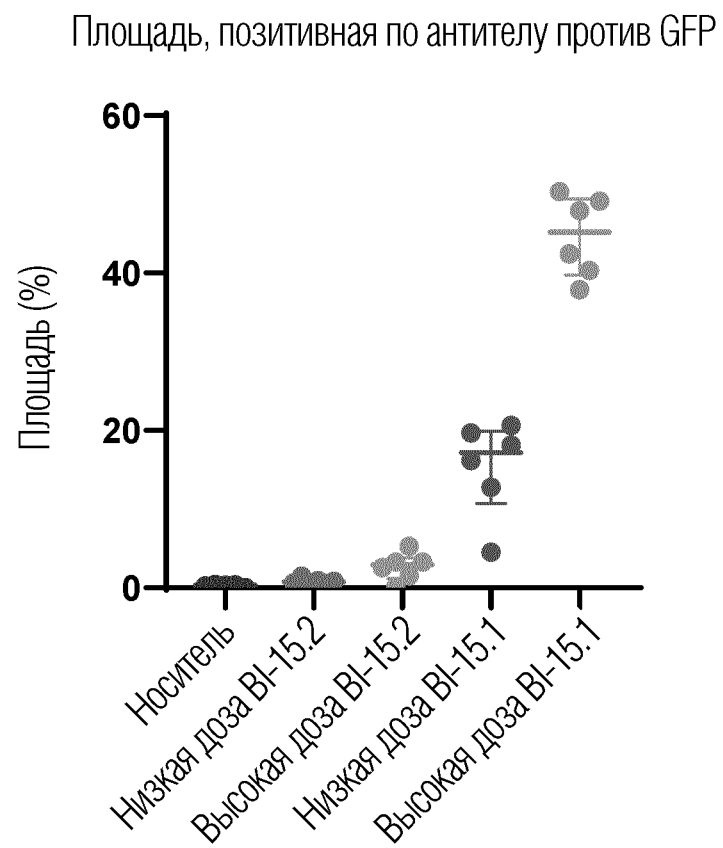
Низкая доза
BI-15.1



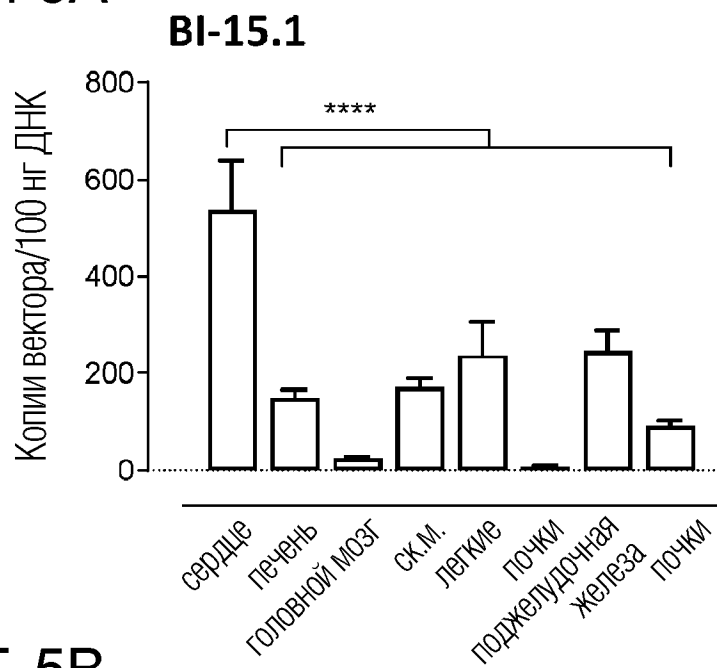
Высокая доза
BI-15.1



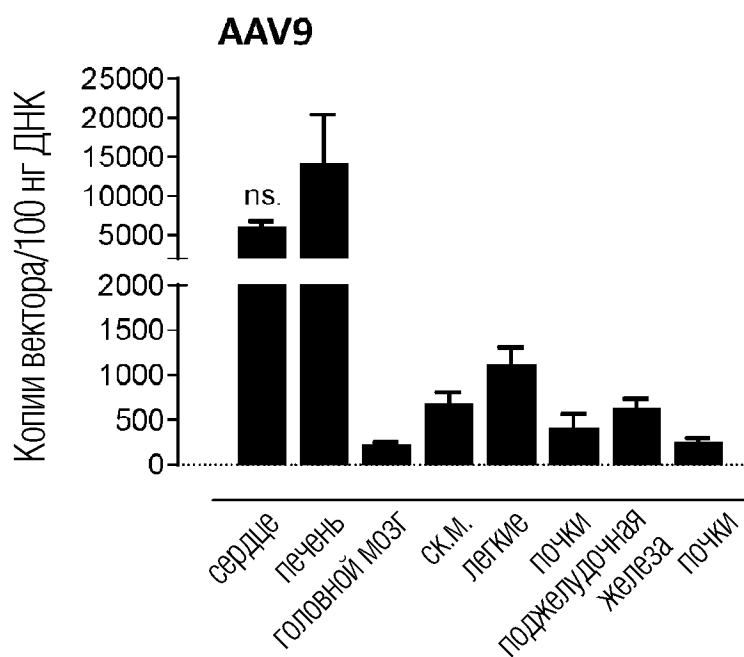
ФИГ. 4В



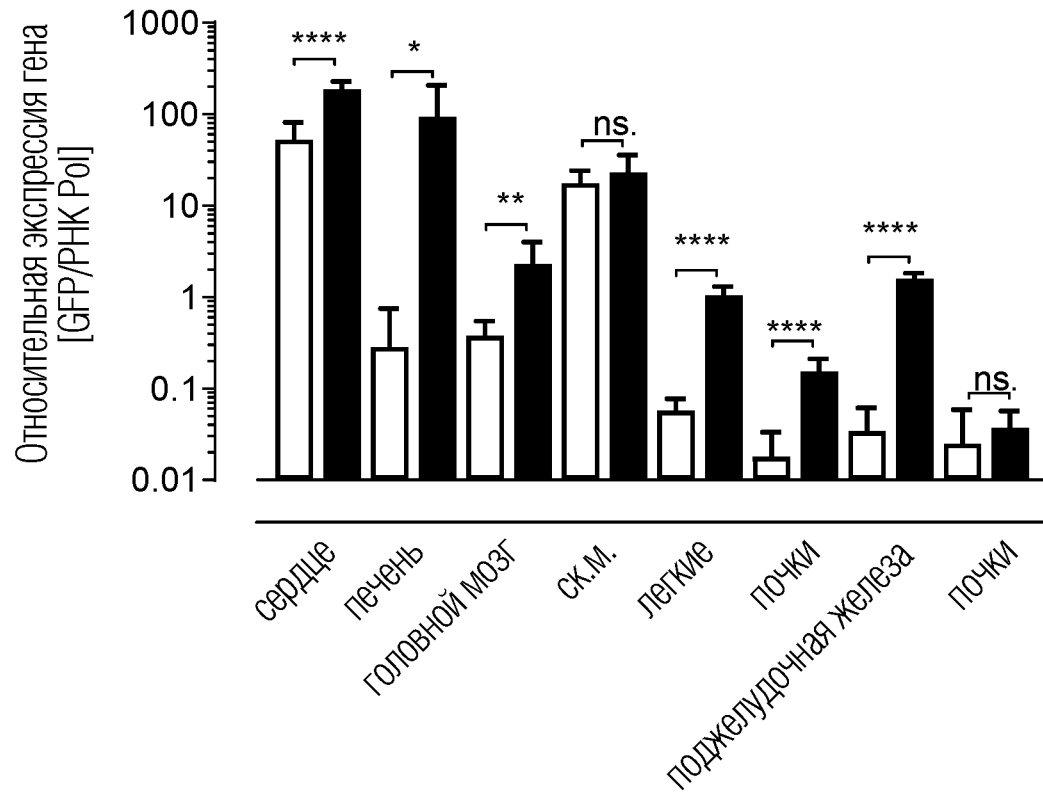
ФИГ. 5А



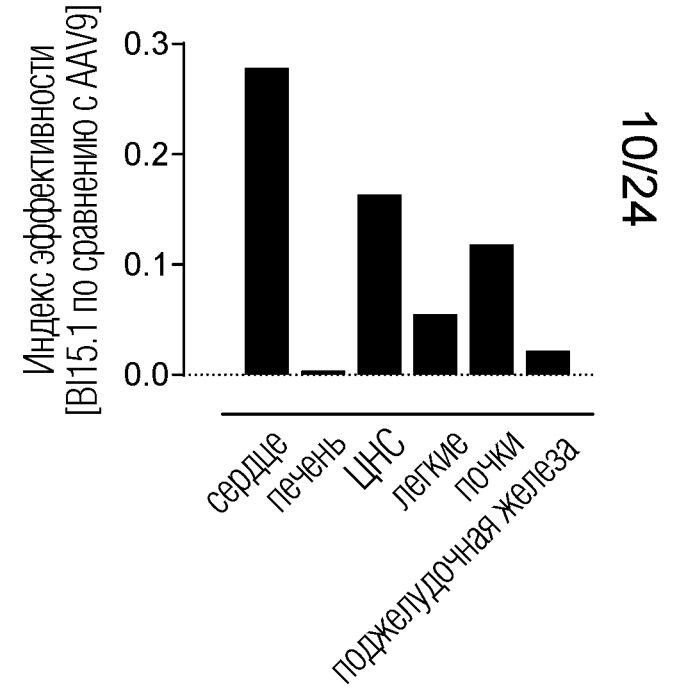
ФИГ. 5В



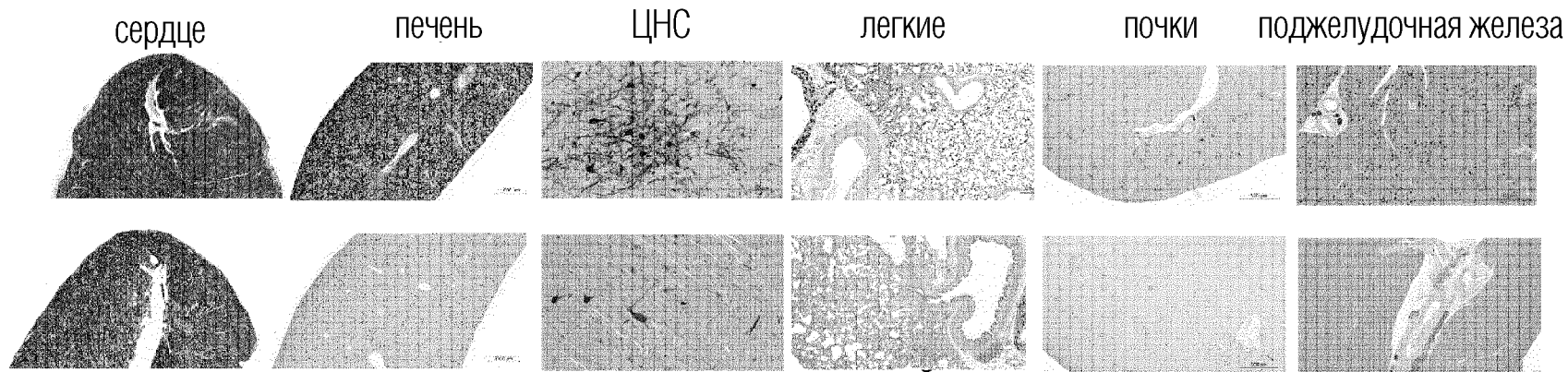
ФИГ. 5С



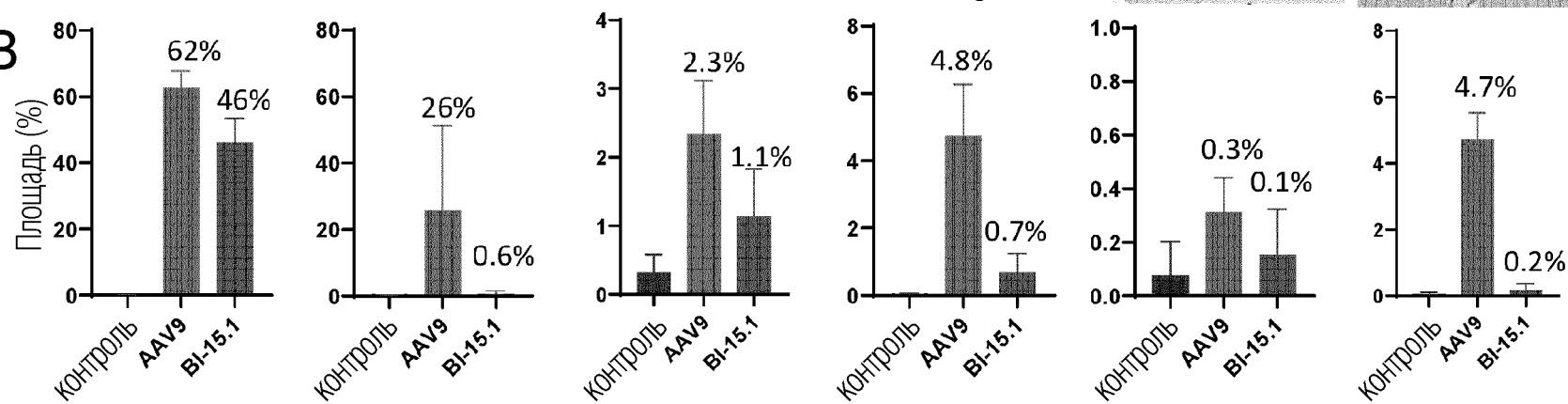
ФИГ. 5D



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В

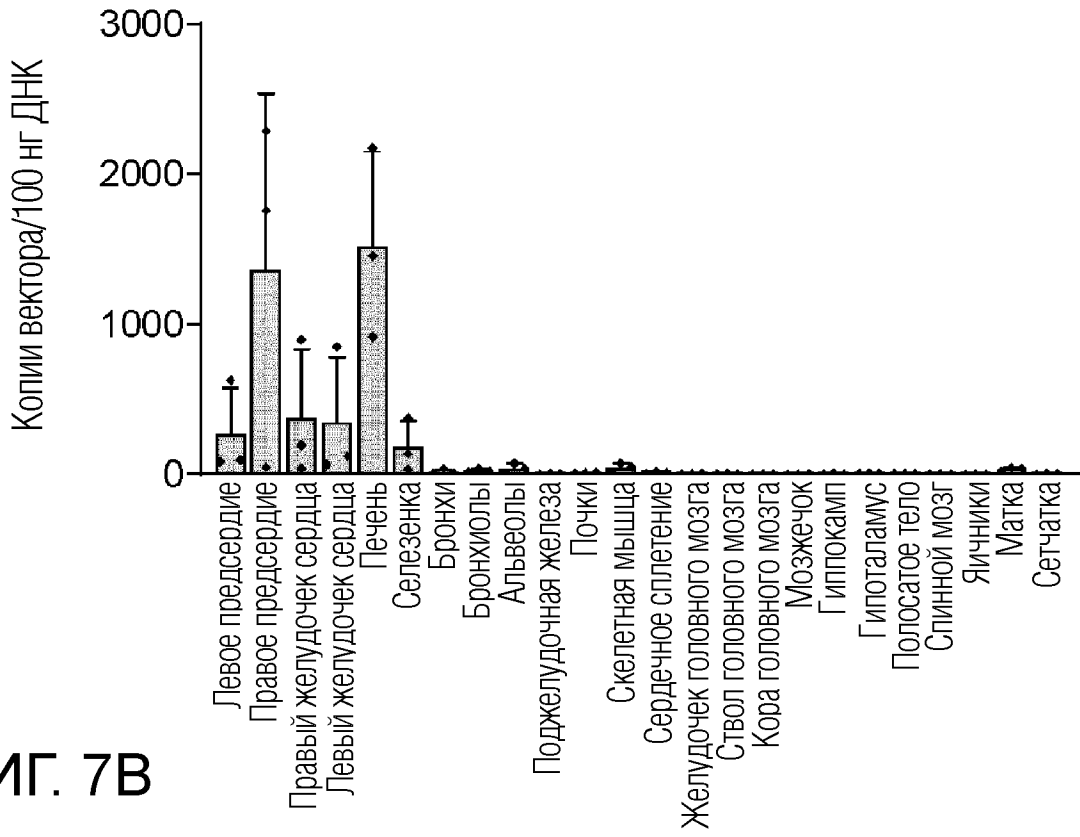


11/24

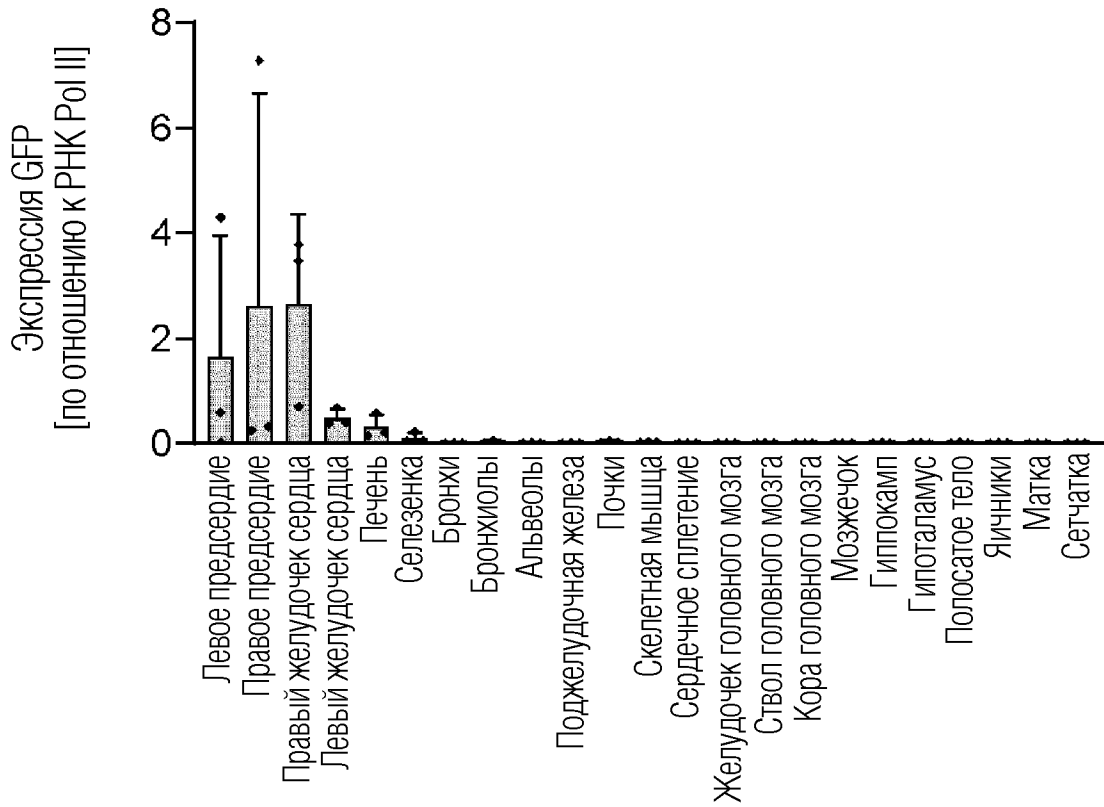
ФИГ. 6С

в 0,74 раза в 0,02 раза в 0,48 раза в 0,15 раза в 0,33 раза в 0,04 раза

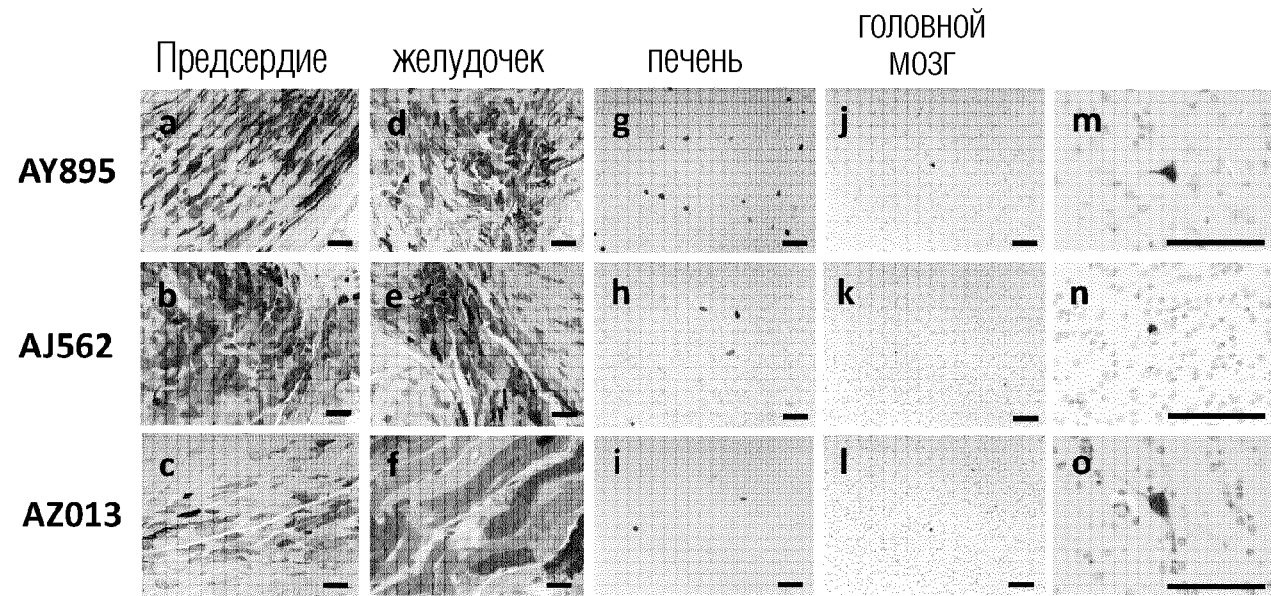
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

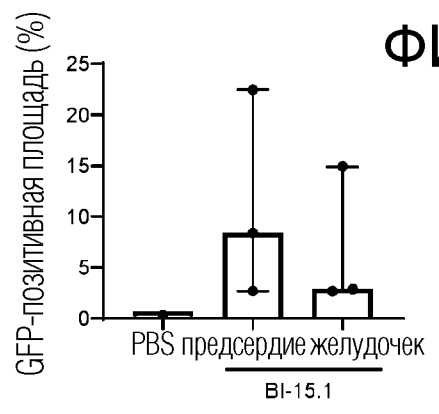


ФИГ. 7С

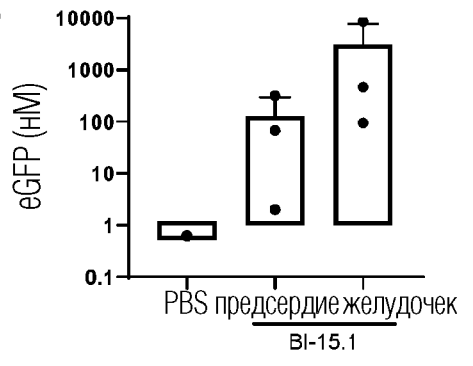


13/24

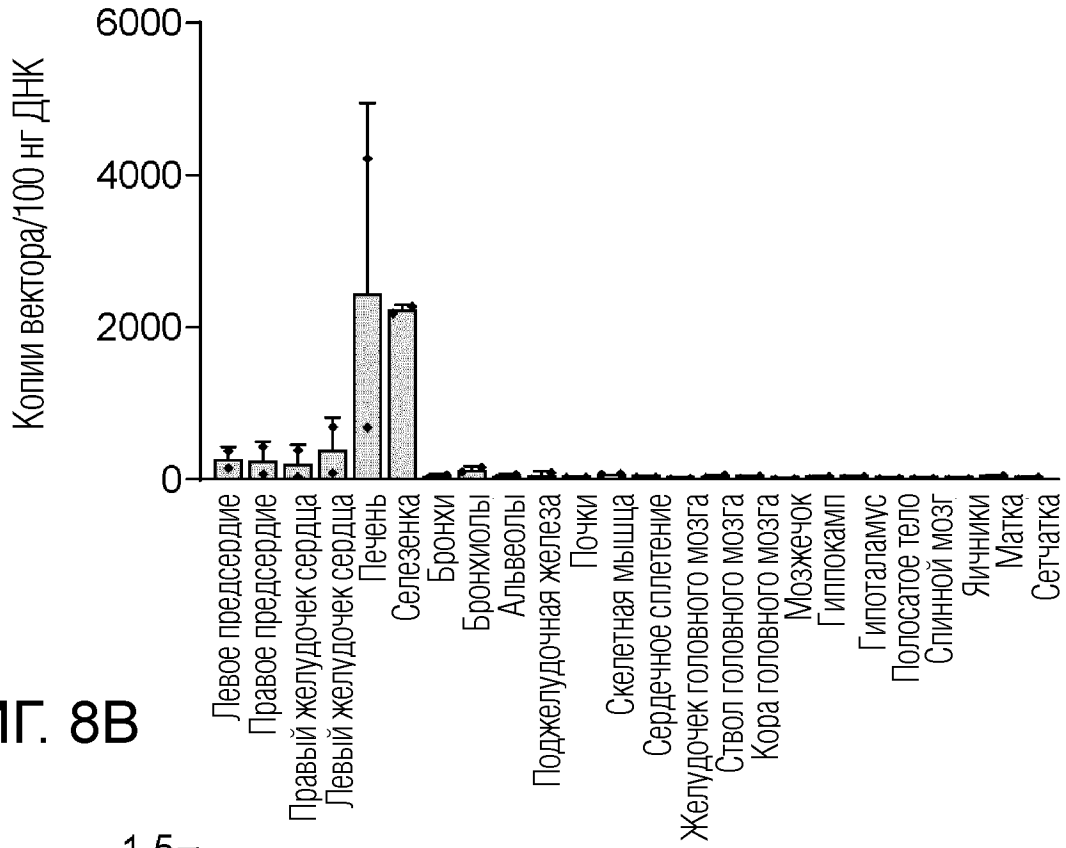
ФИГ. 7D



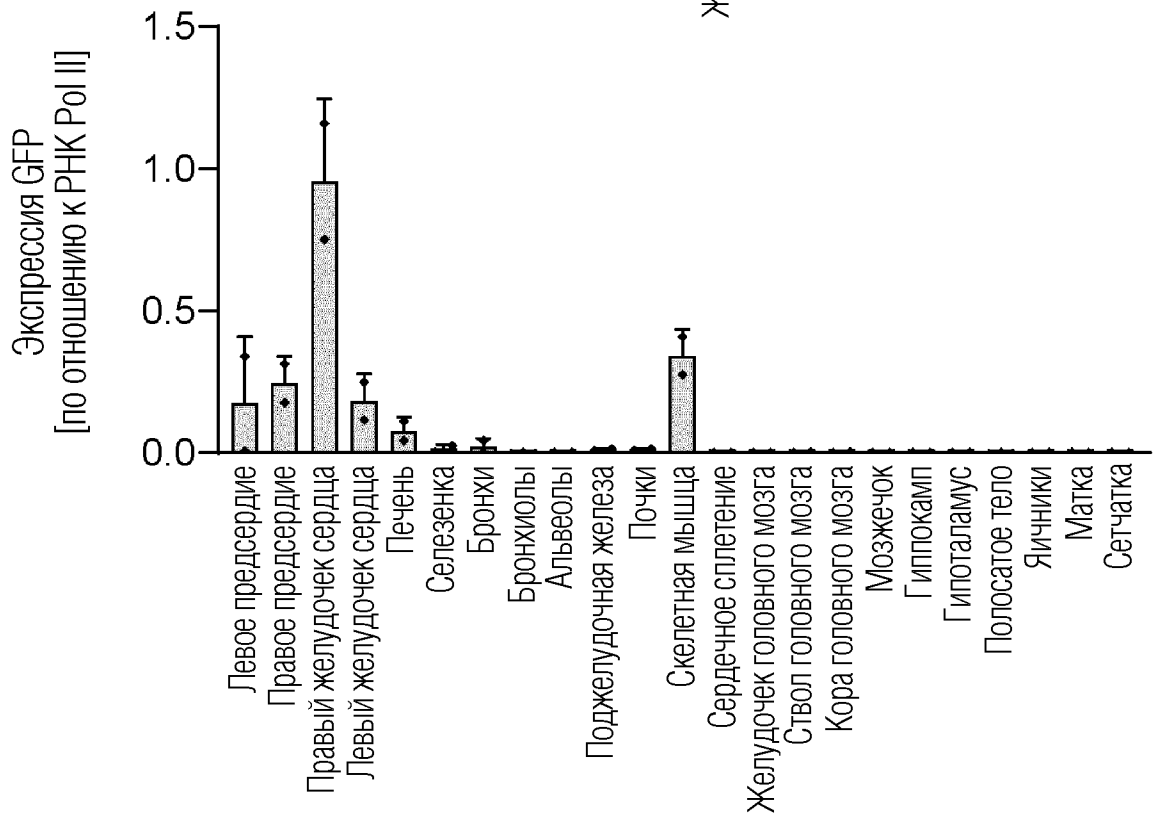
ФИГ. 7E



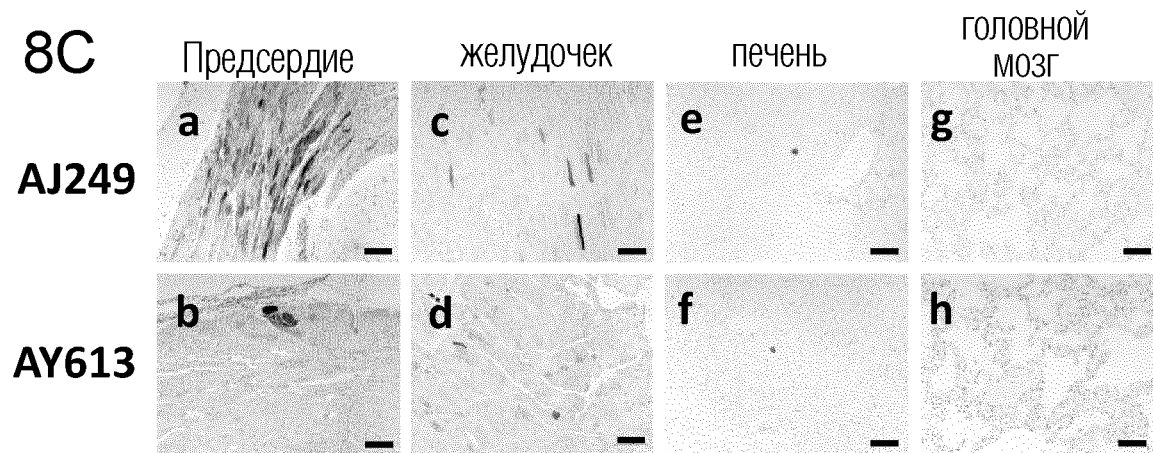
ФИГ. 8А



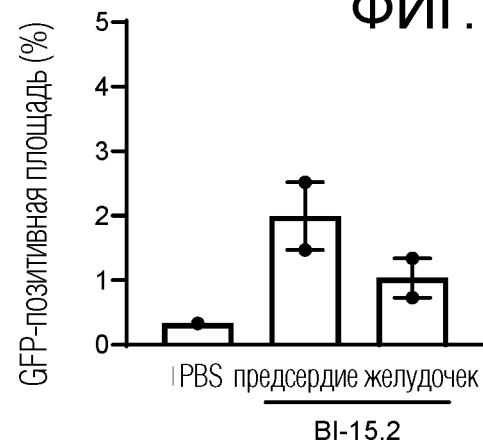
ФИГ. 8В



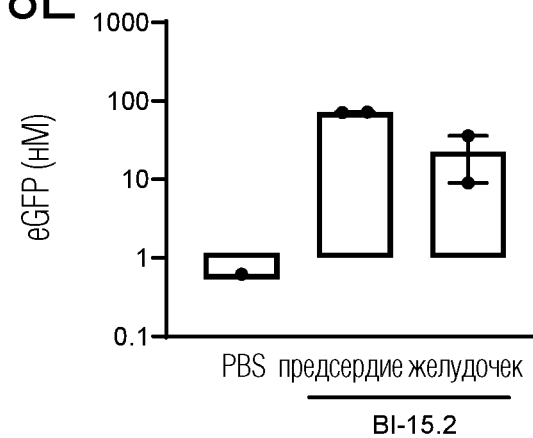
ФИГ. 8С



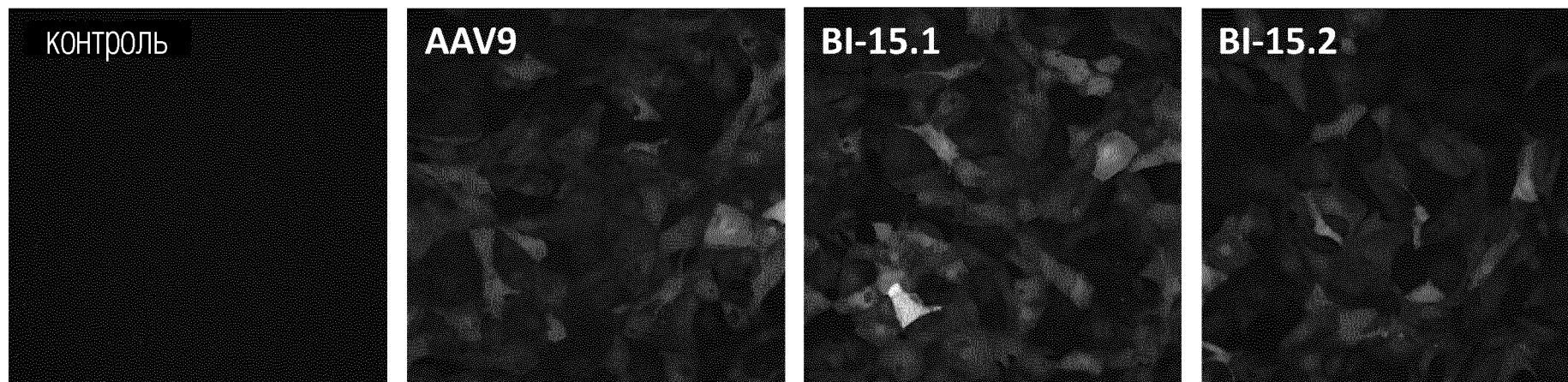
ФИГ. 8D



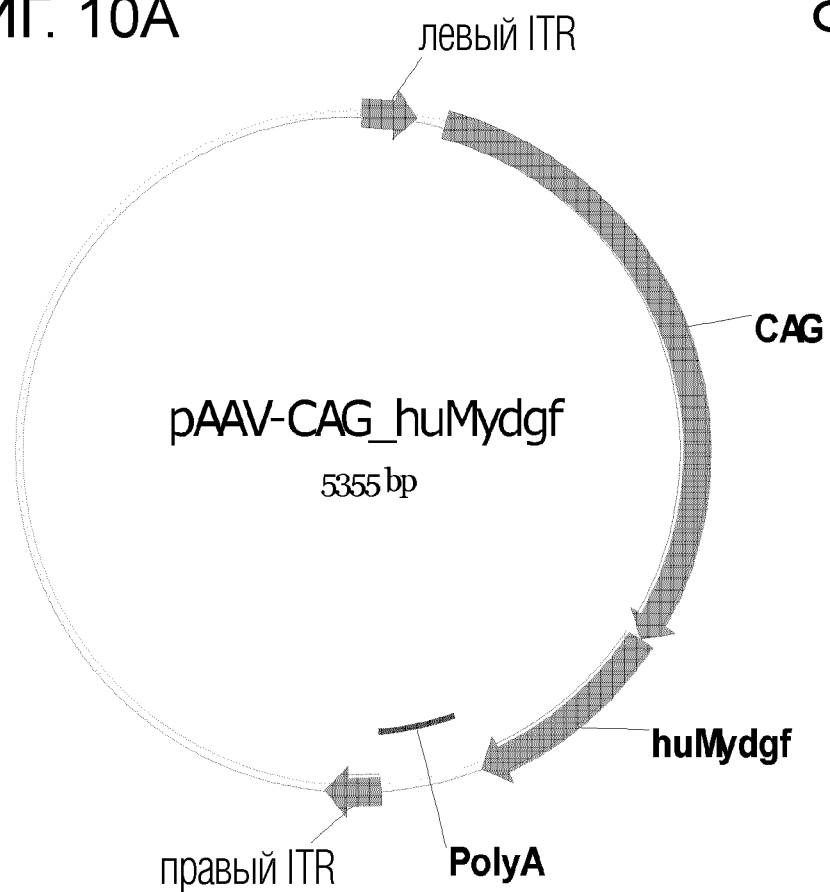
ФИГ. 8Е



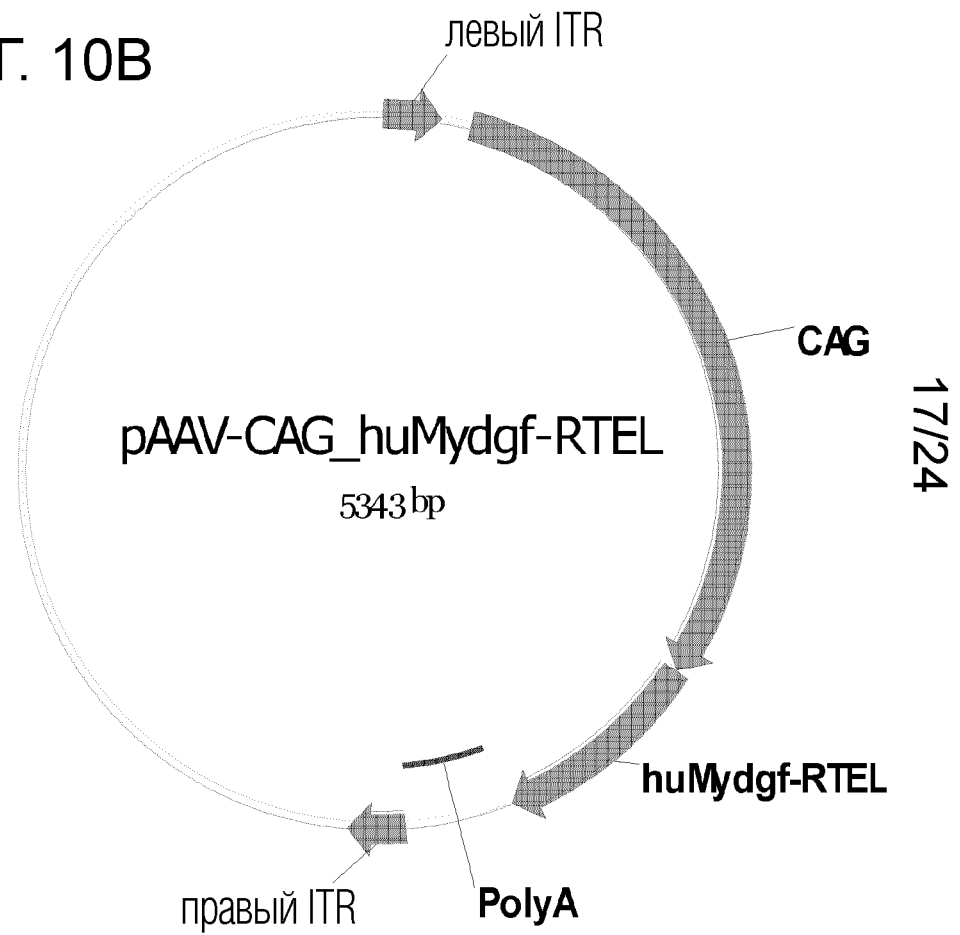
ФИГ. 9



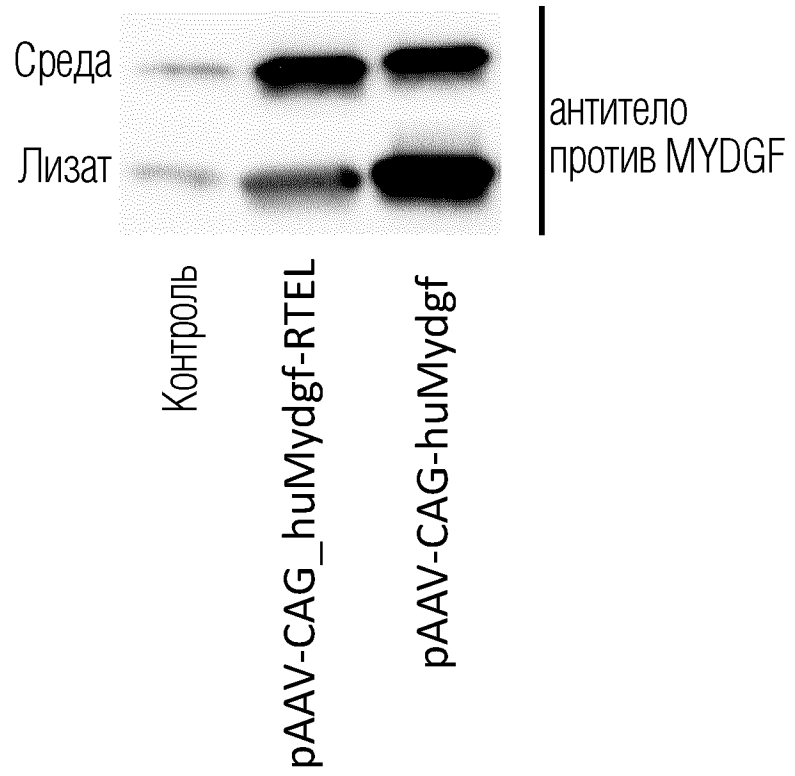
ФИГ. 10А



ФИГ. 10В



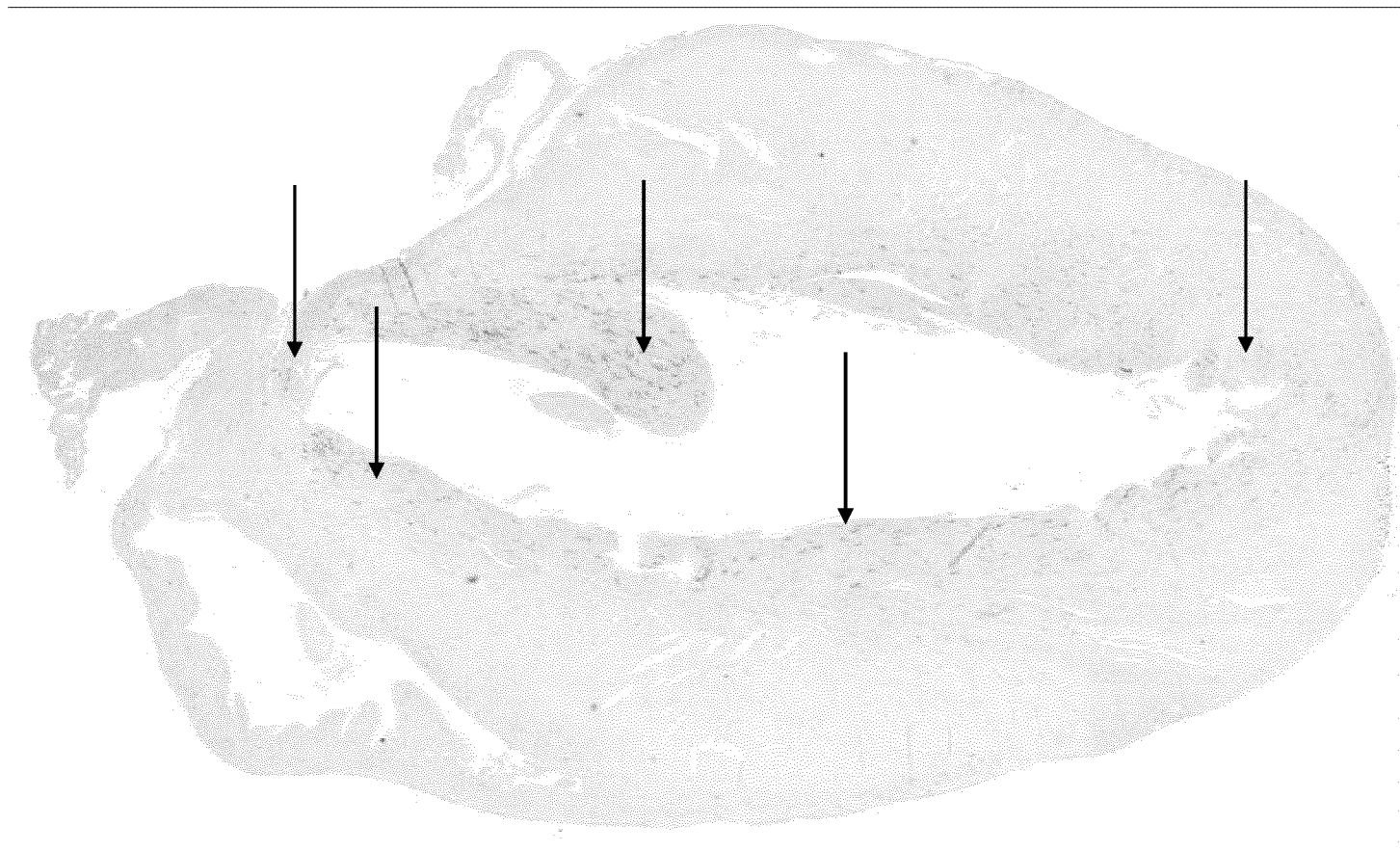
ФИГ. 11



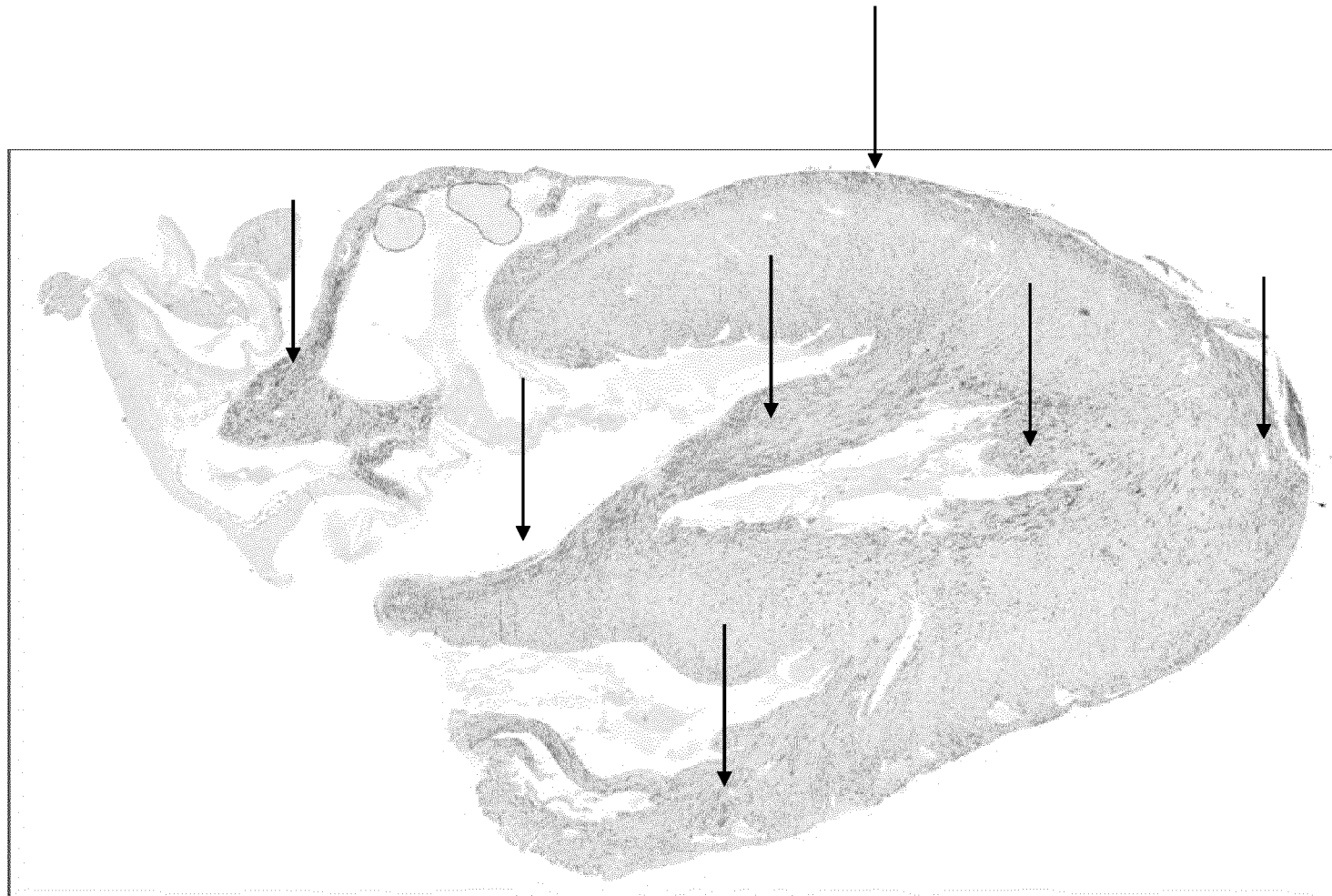
ФИГ. 12



ФИГ. 13

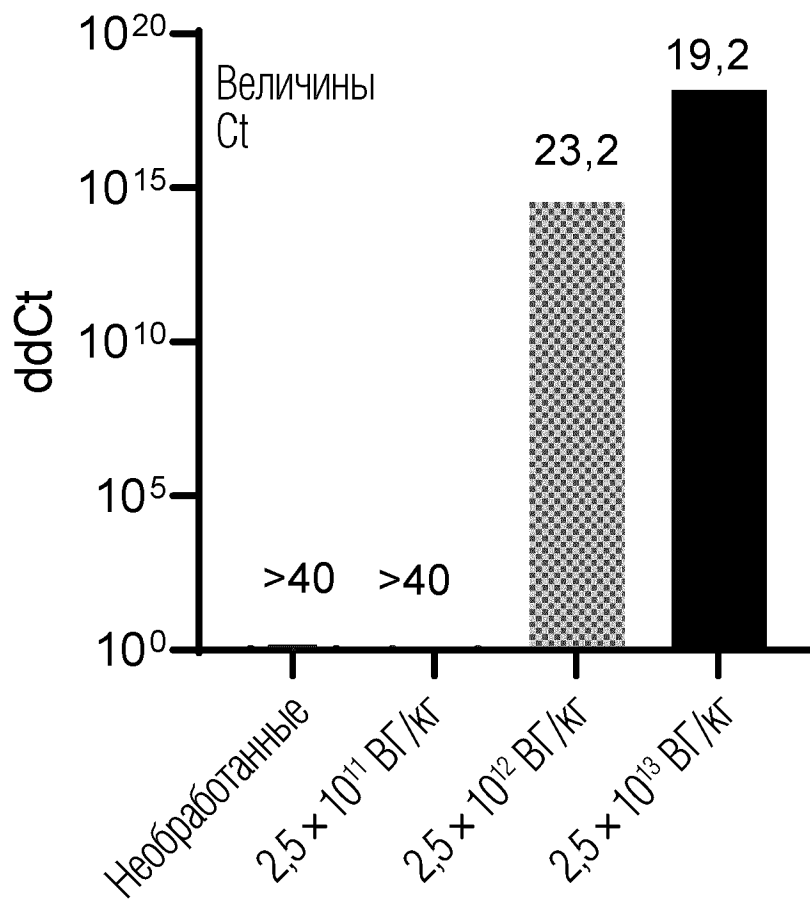


ФИГ. 14

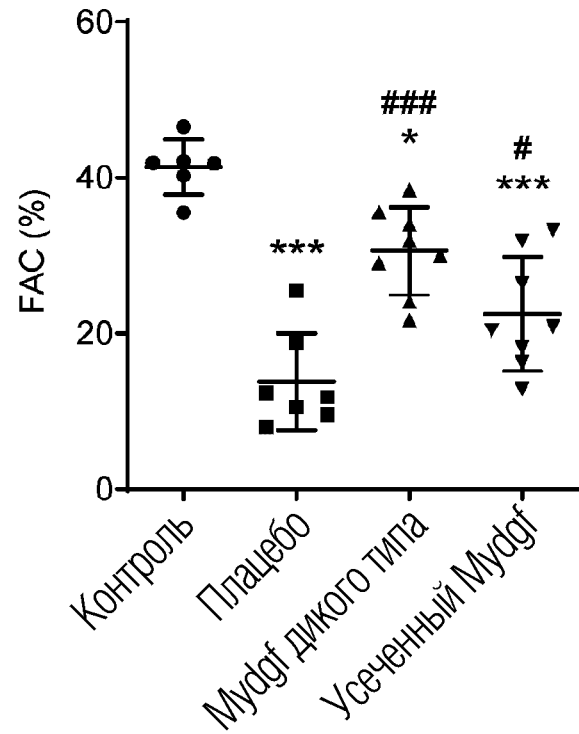


ФИГ. 15

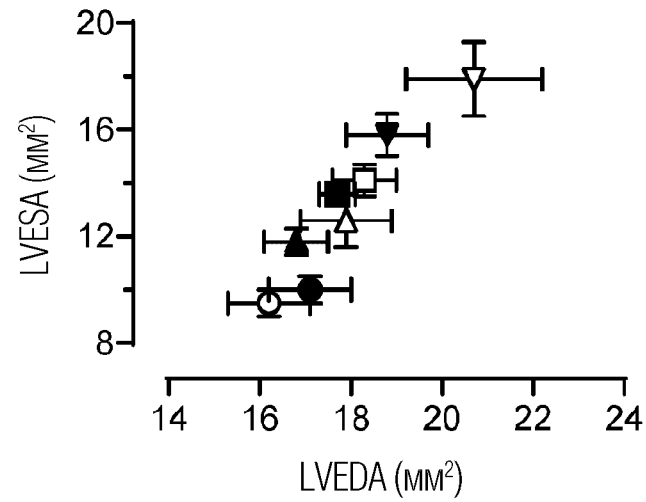
Экспрессия мРНК Myd8f
в ткани сердца



ФИГ. 16А

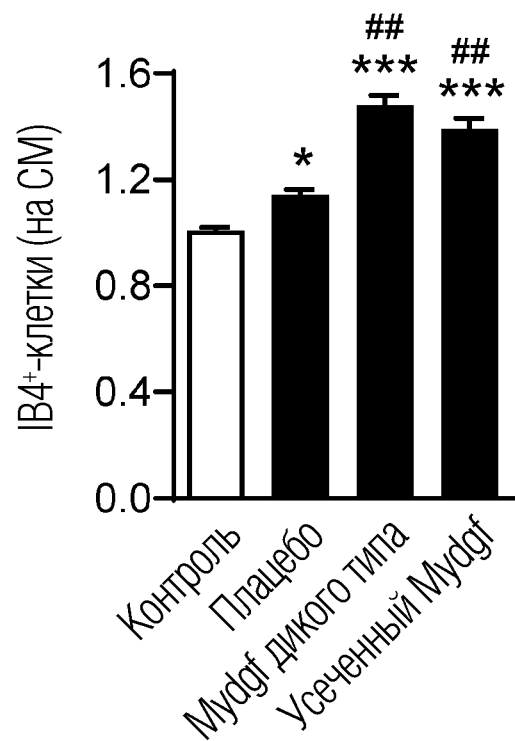


ФИГ. 16В



- Контроль, 6 дней
- ▼ Плацебо, IR, 6 дней
- ▲ Myd8f дикого типа, IR, 6 дней
- Усеченный Myd8f, IR, 6 дней
- Контроль, 28 дней
- ▽ Плацебо, IR, 28 дней
- △ Myd8f дикого типа, IR, 28 дней
- Усеченный Myd8f, IR, 28 дней

ФИГ. 17А



ФИГ. 17В

