

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392851** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.12.12

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

(22) Дата подачи заявки  
2022.04.12

(54) **ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА**

(31) 63/173,527

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.12

**Шейкх Фарах, Брэдфорд Уильям (US)**

(33) US

(86) PCT/US2022/024478

(74) Представитель:

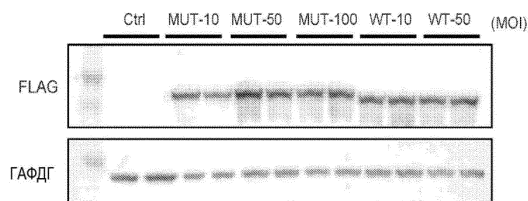
(87) WO 2022/221320 2022.10.20

**Хмара М.В. (RU)**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ РЕДЖЕНТС ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ  
(US)**

(57) Композиции и способы предотвращения и лечения сердечной аритмии. Способы предотвращения или лечения аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (АКПЖ), включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, профилактического или эффективного для лечения количества композиции, содержащей ген плакофилина-2 (РКР2). Композиция дополнительно содержит вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для доставки гена РКР-2. В вариантах реализации изобретение предусматривает, что AAV представляет собой AAV кардиотропного серотипа и содержит кардиоспецифичный промотор. Способ лечения сердечно-сосудистого заболевания, характеризующегося нарушением комплекса межклеточных соединений кардиомиоцитов, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, профилактического или эффективного для лечения количества композиции, содержащей ген плакофилина-2 (РКР2).



**202392851  
A1**

**202392851  
A1**

## ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [1] Данная заявка заявляет приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/173,527, поданной 12 апреля 2021 г. Содержание данной заявки включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

### 10 ВКЛЮЧЕНИЕ В ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ СВЕДЕНИЙ ПУТЁМ ССЫЛКИ НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[2] Содержание текстового файла с названием «24978-0711\_SeqList\_ST25», который был создан 12 апреля 2022 г. и имеет размер 89 КБ, включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

15

### ГОСУДАРСТВЕННОЕ ФИНАНСИРОВАНИЕ

[3] Данное изобретение было выполнено при государственной поддержке по гранту № HL142251, присужденному Национальным институтом здравоохранения. Государство имеет определенные права на данное изобретение.

20

### ВКЛЮЧЕНИЕ В ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ СВЕДЕНИЙ ПУТЁМ ССЫЛКИ НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[4] Содержание текстового файла с названием «XXXX», который был создан XXX и имеет размер XXX КБ, включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

25

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[5] Данное изобретение относится к генной терапии аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (АКПЖ).

30

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[6] На сегодняшний день не существует эффективных способов лечения аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (АКПЖ), а также нет рандомизированных клинических исследований способов лечения, схем скрининга или препаратов, специфичных для АКПЖ (1). Современные подходы направлены на облегчение симптомов и сосредоточены на изменении образа жизни (избегание

35

спортивных соревнований, которые могут спровоцировать внезапную сердечную смерть) и фармакологическом вмешательстве (антиаритмические препараты, бета-блокаторы) (2,3). Эти подходы могут перейти к более инвазивным действиям, которые включают имплантируемые кардиовертердефибрилляторы (ИКД), катетерную абляцию сердца или трансплантацию сердца, если пациент становится нечувствительным к фармакотерапии или неспособным переносить фармакотерапию (2,3). При использовании ИКД часто возникают осложнения, связанные с устройством/проводником, катетерная абляция подвержена рецидивам из-за образования новых аритмогенных очагов, а уровень смертности при трансплантации сердца через 10 лет после процедуры составляет 23% (3). Эти факторы подчеркивают острую необходимость определения новых профилактических и терапевтических стратегий, которые могут направленно воздействовать на молекулярные триггеры (нарушение межклеточных контактов) при АКПЖ, чтобы предотвратить или остановить прогрессирование заболевания.

15

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[7]** В данном изобретении предложен вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий в направлении от 5'- к 3'-концу: а) первую последовательность ITR AAV; б) промоторную последовательность; в) молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, причем молекула трансгенной нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид плакофилина-2 (PKP2); д) посттранскрипционный регуляторный элемент; е) последовательность полиА; и ф) вторую последовательность ITR AAV.

**[8]** В данном изобретении предложен вектор rAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.

**[9]** В некоторых аспектах, полипептид PKP2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13.

**[10]** В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14.

**[11]** В некоторых аспектах первая последовательность ITR AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO, 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO:

35

25. В некоторых аспектах вторая последовательность ITR AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO, 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 25.

5 **[12]** В других аспектах промоторная последовательность представляет собой кардиоспецифичную промоторную последовательность.

**[13]** В некоторых аспектах промоторная последовательность содержит промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор бета-актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK), промотор U6, промотор H1, промотор CAG, промотор  $\beta$ -актина кур, промотор MeCP2, промотор EF1, универсальный гибридный промотор  $\beta$ -актина кур (CBh), промотор U1a, промотор U1b, промотор MeCP2, промотор MeP418, промотор MeP426, минимальный промотор MeCP2, промотор VMD2, промотор mRho, промотор EFla, промотор Ubc, промотор  $\beta$ -актина человека, промотор TRE, промотор Ac5, промотор полиэдрина, промотор CaMKIIa, промотор Gal1, промотор TEF1, промотор GDS, промотор ADH1, промотор Ubi или промотор  $\alpha$ -1-антитрипсина (hAAT). В некоторых аспектах промоторная последовательность содержит промоторную последовательность кардиотропонина T (cTnT). В некоторых аспектах промоторная последовательности cTnT содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 2.

10  
15  
20

**[14]** В некоторых аспектах последовательности полиА содержит последовательность полиА бета-глобина кролика. В некоторых аспектах последовательность полиА бета-глобина кролика содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 6.

25

**[15]** В некоторых аспектах посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой посттранскрипционный регуляторный элемент oPRE. В некоторых аспектах посттранскрипционный регуляторный элемент oPRE содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

30

В данном изобретении предложен вектор rAAV по любому из предыдущих вариантов реализации данного изобретения, содержащий в направлении от 5'- к 3'-концу: а) первую последовательность ITR AAV, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7; б) промоторную последовательность, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 2; в) молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты,

35

причем молекула трансгенной нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PKP2, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 4; d) 5 посттранскрипционный регуляторный элемент, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 5; e) последовательность полиА, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 6; и f) вторую последовательность ITR AAV, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 8.

10 **[16]** В данном изобретении предложен вирусный вектор гAAV, содержащий (i) капсидный белок AAV; и (ii) вектор гAAV по любому из предшествующих пунктов.

**[17]** В некоторых аспектах капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV1, капсидный белок AAV2, капсидный белок AAV4, капсидный белок AAV5, капсидный белок AAV6, капсидный белок AAV7, капсидный белок 15 AAV8, капсидный белок AAV9, капсидный белок AAV10, капсидный белок AAV11, капсидный белок AAV12, капсидный белок AAV13, капсидный белок AAVPHP.B, капсидный белок AAVrh74 или капсидный белок AAVrh10. В некоторых аспектах капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV9 или AAVrh10.

**[18]** В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, 20 содержащая: а) вирусный вектор гAAV по любому варианту реализации данного изобретения; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент и/или добавку.

**[19]** В данном изобретении предложен способ лечения субъекта, 25 имеющего заболевание и/или расстройство, связанное с геном PKP2, причем способ включает введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества вирусного вектора гAAV по любому варианту реализации данного изобретения или фармацевтической композиции по любому варианту реализации данного изобретения.

**[20]** В некоторых аспектах заболевание и/или расстройство, связанное с 30 геном PKP2, представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, характеризующееся нарушением межклеточных контактов кардиомиоцитов.

**[21]** В некоторых аспектах заболевание и/или расстройство, связанное с геном PKP2, представляет собой аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (АКПЖ).

35 **[22]** В некоторых аспектах эффективное количество улучшает электрическую и структурную целостность сердца у субъекта. В некоторых аспектах

эффективное количество спасает и восстанавливает белки межклеточных контактов у субъекта. В некоторых аспектах эффективное количество улучшает сердечную функцию у субъекта. В некоторых аспектах эффективное количество сохраняет электрическую и структурную целостность, предотвращая АКПЖ у субъекта.

- 5 **[23]** В некоторых аспектах вирусный вектор gAAV или фармацевтическую композицию вводят субъекту в дозе в диапазоне от около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $2,5 \times 10^{14}$  вг/кг. В некоторых аспектах вирусный вектор gAAV или фармацевтическую композицию вводят субъекту в дозе в диапазоне от около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $5,0 \times 10^{13}$  вг/кг.
- 10 **[24]** В некоторых аспектах вирусный вектор gAAV или фармацевтическую композицию вводят субъекту путем внутривенного, интратекального, интрацеребрального, внутрижелудочкового, интраназального, интратрахеального, внутриушного, внутриглазного или окологлазного, перорального, ректального, чресслизистого, ингаляционного, чрескожного, парентерального, подкожного, 15 внутрикожного, внутримышечного, интрацистернального, интраневрального, внутриплеврального, местного, внутрилимфатического, интрацистернального или внутринервного введения.
- [25]** В некоторых аспектах вирусный вектор gAAV по любому из вариантов реализации данного изобретения или фармацевтическая композиция по любому 20 варианту реализации данного изобретения предназначены для лечения заболевания и/или расстройства, связанного с геном *PKP2*, у субъекта, нуждающегося в этом.
- [26]** В некоторых аспектах заболевание и/или расстройство, связанное с геном *PKP2*, представляет собой АКПЖ.
- 25 **[27]** В некоторых аспектах вирусный вектор gAAV или фармацевтическая композиция предназначены для введения субъекту в дозе в диапазоне от около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $2,5 \times 10^{14}$  вг/кг. В некоторых аспектах вирусный вектор gAAV или фармацевтическая композиция предназначены для введения субъекту в дозе в диапазоне от около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $5,0 \times 10^{13}$  вг/кг.
- 30 **[28]** В некоторых аспектах вирусный вектор gAAV или фармацевтическая композиция предназначены для внутривенного, интратекального, интрацеребрального, внутрижелудочкового, интраназального, интратрахеального, внутриушного, внутриглазного или окологлазного, перорального, ректального, чресслизистого, ингаляционного, чрескожного, парентерального, подкожного, 35 внутрикожного, внутримышечного, интрацистернального, интраневрального, внутриплеврального, местного, внутрилимфатического, интрацистернального или

внутринервного введения субъекту. В некоторых аспектах вирусный вектор rAAV или фармацевтическая композиция предназначены для внутривенного введения.

## 5 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[29]** На Фиг. 1А-1С продемонстрировано, что с помощью технологии на основе адено(-ассоциированного) вируса можно стабильно экспрессировать белок PKP2. На Фиг. 1А представлен вестерн-блоттинг мутантного (Мут) и дикого типа (WT) белка PKP2 после аденовирусной трансдукции неонатальных кардиомиоцитов при указанном множественном заражении (MOI). FLAG-антитело способствует детектированию PKP2, а ГАФДГ служит контролем нагрузки. На Фиг. 1В представлена схема ранней внутрибрюшинной инъекции AAV9 PKP2 на 2-й день постнатального развития (P2) мышам дикого типа (WT) и анализ сердца через 4 недели. На Фиг. 1С представлен вестерн-блоттинг белка PKP2 после инъекции AAV9 PKP2 на 2-й день постнатального периода (P2). Антитело против PKP2 выявляет эндогенный и трансдуцированный PKP2, FLAG-антитело выявляет только трансдуцированный PKP2, а ГАФДГ служит контролем нагрузки.

**[30]** На Фиг. 2 продемонстрировано, что повышение дозы белка PKP2 *in vitro* восстанавливает межклеточные контакты кардиомиоцитов. Вестерн-блоттинг десмосомальных белков (PKP2, DSP, DSG2, JUP), белков адгезионных межклеточных контактов (N-Cad) и белков межклеточных щелевых контактов (CX43) после трансдукции неонатальных кардиомиоцитов с гомозиготным мутантным PKP2 (Гом CM) с использованием аденовируса с диким типом (WT) PKP2 или мутантный (Мут) PKP2. ГАФДГ служит контролем нагрузки.

**[31]** На Фиг. 3А-3С продемонстрировано, что раннее введение AAV9 PKP2 восстанавливает межклеточный контакт кардиомиоцитов и улучшает морфологию сердца. На Фиг. На фигуре 3А представлена схема ранней внутрибрюшинной инъекции AAV9 PKP2 на 2-й день постнатального развития (P2) мышам с гомозиготной мутацией PKP2 (Гом PKP2) и анализ сердца через 4 недели. На Фиг. 3В представлен вестерн-блоттинг для контрольного сердца (Контр. группы), сердец с Гом PKP2, обработанных AAV9-PKP2, и сердец с Гом PKP2 без воздействия вируса для десмосомальных белков (PKP2, DSP, DSG2, JUP), белка адгезионных межклеточных контактов (N-Cad) и белка межклеточных щелевых контактов (CX43). ГАФДГ служит контролем нагрузки. На Фиг. 3С представлен анализ соотношения массы сердца (МС) к массе тела (МТ) контрольных (Контр.), необработанных сердец с гомозиготной мутацией PKP2 (Гом) и сердец с Гом PKP2, обработанных AAV9-

PKP2. Средние значения со стандартным отклонением. n=5 Контр., n=5 Гом., n=3 Гом-AAV9 PKP2. Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. \*\*, p<0,01.

**[32]** На Фиг. 4А-4Е изображено, что раннее введение PKP2 AAV9 предотвращает механическую и электрическую дисфункцию сердца. На Фиг. 4А представлены типичные снимки изображений сердца по короткой оси, полученные с помощью магнитно-резонансной томографии, для контрольной группы (Контр.), сердца с гомозиготной мутацией (Гом) PKP2, обработанного AAV9 GFP, и сердца с Гом PKP2, обработанного AAV9 PKP2. На Фиг. 4В представлена количественная оценка частоты сердечных сокращений, а также фракции выброса (ФВ), конечно-диастолических объемов (КДО) крови и конечно-систолических объемов (КСО) крови в левых желудочках (ЛЖ) и правых желудочках (ПЖ). Средние значения со стандартным отклонением. n=5 Контр., n=5 Гом-AAV9 GFP, n=6 Гом-AAV9 PKP2. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. \*\*\*\*, p<0,0001. \*\*, p<0,01. \*, p<0,05. На Фиг. 4С представлены типичные комбинированные электрокардиограммы с поверхности тела для контрольной группы (Контр.), сердца с гомозиготной мутацией (Гом) PKP2, обработанного AAV9 GFP, и сердца с Гом PKP2, обработанного AAV9 PKP2. Масштабная линейка = 20 мсек. На Фиг. 4D представлена количественная оценка частоты сердечных сокращений, PR-интервала и QRS-интервала. Средние значения со стандартным отклонением. n=5 Контр., n=5 Гом-AAV9 GFP, n=4 Гом-AAV9 PKP2. Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. \*, p<0,05. На Фиг. 4Е представлены типичные электрокардиограммы с поверхности тела, отображающие электрическую активность во времени. Преждевременные сокращения желудочков (ПСЖ) показаны стрелками. Количественная оценка процентного содержания мышечной ткани с ПСЖ для каждого состояния.

**[33]** На Фиг. 5А-5С продемонстрировано, что раннее введение PKP2 AAV9 сохраняет морфологию сердца и предотвращает ремоделирование патогенной ткани. На Фиг. 5А представлены типичные гистологические срезы сердца с окраской гематоксилином и эозином для контрольной группы (Контр.), сердца с гомозиготной мутацией PKP2 (Гом), обработанного AAV9 GFP, и сердца с Гом PKP2, обработанного AAV9 PKP2. Масштабная линейка = 1 мм. На Фиг. 5В представлены типичные гистологические срезы сердца с трихромным окрашиванием по Массону для выявления фиброза для Контр. группы, Гом-AAV9 GFP и Гом-AAV9 PKP2 из левых желудочков (ЛЖ) и правых желудочков (ПЖ). Масштабная линейка = 100 мкм. На Фиг. 5С представлен количественный ПЦР-анализ с обратной транскрипцией



профибротического гена коллагена типа I альфа 1 (Col1a1) с использованием РНК из Контр. группы, сердец с Гом-AAV9 GFP и Гом-AAV9 PKP2. Средние значения со стандартным отклонением. n=4 Контр., n=4 Гом-AAV9 GFP, n=6 Гом-AAV9 PKP2. Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. \*, p<0,05.

5 **[34]** На Фиг. 6A-6G продемонстрировано, что раннее введение AAV9 PKP2 улучшает выживаемость и обеспечивает надежную защиту сердца. На Фиг. 6A представлен анализ выживаемости мышей Контр. группы, мышей из группы с гомозиготной мутацией PKP2 (Гом) и мышей группы с PKP2 Гом-AAV9 PKP2. На Фиг. 6B представлены типичные снимки изображений сердца по короткой оси, 10 полученные с помощью магнитно-резонансной томографии, для Контр. группы и сердца с PKP2 Гом-AAV9 PKP2 в возрасте 6 месяцев. На Фиг. 6C представлено количественное определение фракции выброса (ФВ) левых желудочков (ЛЖ) и правых желудочков (ПЖ) в возрасте 6 месяцев. Средние значения со стандартным отклонением. n=2 Контр., n=4 Гом-AAV9 PKP2. Двухфакторный дисперсионный 15 анализ с апостериорным тестом Тьюки. На Фиг. 6D представлены типичные электрокардиограммы с поверхности тела для Контр. группы и сердца с PKP2 Гом-AAV9 PKP2 в возрасте 6 месяцев. Масштабная линейка = 10 мсек. На Фиг. 6E представлена количественная оценка частоты сердечных сокращений, PR-интервала и QRS-интервала. Средние значения со стандартным отклонением. n=2 20 Контр., n=4 Гом-AAV9 PKP2. t-критерий для независимых выборок. На Фиг. 6F представлен вестерн-блоттинг для Контр. группы сердца и сердца с PKP2 Гом-AAV9 PKP2 для десмосомальных белков (PKP2, DSP, DSG2, JUP), белка адгезионных межклеточных контактов (N-Cad) и белка межклеточных щелевых контактов (CX43). ГАФДГ служит контролем нагрузки. На Фиг. 6G представлен анализ сыворотки крови 25 на уровне ферментов печени - щелочной фосфатазы (ЩФ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Средние значения со стандартным отклонением. n=5 Контр., n=6 Гом-AAV9 PKP2. t-критерий для независимых выборок.

**[35]** На Фиг. 7A-7D продемонстрировано, что введение AAV9 PKP2 на поздней стадии улучшает уровни белка межклеточного контакта и механическую 30 функцию. На Фиг. 7A представлена схема ретроорбитальной инъекции AAV9 PKP2 через 4 недели (присутствуют признаки заболевания) мышам с гомозиготной мутацией PKP2 (Гом PKP2) и анализ сердца через 2 недели. На Фиг. 7B представлен вестерн-блоттинг для Контр. группы, сердца с PKP2 Гом-AAV9 GFP и сердца с PKP2 Гом-AAV9 PKP2 для десмосомальных белков (PKP2, DSP, DSG2, 35 JUP), белка адгезионных межклеточных контактов (N-Cad) и белка межклеточных щелевых контактов (CX43). ГАФДГ служит контролем нагрузки. На Фиг. 7C

представлены типичные снимки изображений сердца по короткой оси, полученные с помощью магнитно-резонансной томографии, для сердца с РКР2 Гом-AAV9 GFP и сердца с РКР2 Гом-AAV9 РКР2 как во время конечной диастолы, так и во время конечной систолы через две недели после инъекции. На Фиг. 7D представлено  
 5 количественное определение фракции выброса (ФВ) левых желудочков (ЛЖ) и правых желудочков (ПЖ) через две недели после инъекции. Средние значения со стандартным отклонением. n=6 Гом-AAV9 GFP, n=6 Гом-AAV9 РКР2. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. \*\*, p<0,01. \*, p<0,05. На Фиг. 7E представлен анализ выживаемости мышей из Контр. группы,  
 10 групп РКР2 Гом-AAV9 GFP и РКР2 Гом-AAV9 РКР2. Логарифмический ранговый критерий. \*\*\*, p<0,001.

**[36]** На Фиг. 8A-8C продемонстрировано, что с помощью технологии на основе адено(-ассоциированного) вируса можно стабильно экспрессировать белок РКР2 человека в сердце взрослой мыши и предотвращать исходы заболевания  
 15 АКПЖ у мышей с Гом РКР2.

**[37]** На Фиг. 8A представлен вестерн-блоттинг AAV9-hPKP2 или AAVrh10-PKP2, доставленных в сердца взрослых контрольных мышей дикого типа. Исследование 1 с использованием AAV9-hPKP2 длилось 10 дней, прежде чем была оценена экспрессия в сердце мышей. Исследование 2 с использованием AAVrh10-  
 20 hPKP2 длилось 21 день, прежде чем была оценена экспрессия в сердце и печени мышей. Экспрессию РКР2 и DSP оценивали с использованием бета-актина и ГАФДГ, служащих контролем нагрузки.

**[38]** На Фиг. 8B представлена кривая выживаемости через четыре недели после раннего введения (постнатальный день 2 (P2)) состава и hPKP2 (при  
 25 использовании AAV9 и AAVrh10) мышам с Гом РКР2.

**[39]** На Фиг. 8C представлены гистограммы анализа эктопических систол/преждевременных сокращений желудочков (ПСЖ) у мышей с Гом РКР2 после анализа ЭКГ с поверхности тела и раннего введения (P2) состава и hPKP2 (с  
 использованием AAV9 и AAVrh10).

**[40]** На Фиг. 8D представлены типичные снимки изображений сердца по короткой оси, полученные с помощью магнитно-резонансной томографии, во время конечной диастолы для контрольных мышей дикого типа, не получавших лечения, для мышей с Гом РКР2, получивших состав, мышей с Гом РКР2, получивших AAV9-hPKP2 и мышей с Гом РКР2, получивших AAVrh10-hPKP2. Размеры правого  
 35 желудочка (ПЖ) и левого желудочка (ЛЖ) указаны в каждой группе во время конечной диастолы.

**[41]** На Фиг. 8Е представлен вестерн-блоттинг PKP2 и белков межклеточных контактов (десмоплакина (DSP), десмоглеина-2 (DSG2), коннексина43 (Cx43), N-кадгерина (NCAD), плакоглобина (JUP)) для сердец мышей дикого типа, не получавших лечения, мышей с Гом PKP2, получивших состав, мышей с Гом PKP2, получивших AAV9-hPKP2 и мышей с Гом PKP2, получивших AAVrh10-hPKP2.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[42]** Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки, в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.

**[43]** Если не указано иное, все технические и научные термины и любые сокращения, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области техники данного изобретения. Хотя при практической реализации данного изобретения можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, далее в данном документе будут описаны иллюстративные способы, устройства и материалы.

**[44]** При практической реализации данного изобретения будут применять, если не указано иное, традиционные способы молекулярной биологии (включая рекомбинантные способы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в рамках данной области техники. Такие способы в полном объеме объясняются в литературе, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. (Sambrook et al., 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis et al., eds., 1994); Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>th</sup> ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003) и Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 22<sup>th</sup> ed., (Pharmaceutical Press and Philadelphia College of Pharmacy at University of the Sciences 2012).

**[45]** В данном изобретении предложены композиции и способы профилактики и лечения сердечной аритмии. В некоторых аспектах в данном изобретении предложен способ профилактики или лечения аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (АКПЖ), включающие введение субъекту,

нуждающемуся в этом, профилактического или эффективного для лечения количества композиции, содержащей ген плакофилина-2 (PKP2).

**[46]** В некоторых аспектах в данном изобретении предложена композиция, которая дополнительно содержит вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для доставки гена PKP2. В некоторых аспектах в данном изобретении предусматривается, что AAV представляет собой AAV кардиотропного серотипа и содержит кардиоспецифичный промотор.

**[47]** В данном изобретении предложены, среди прочего, выделенные полинуклеотиды, векторы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) и вирусные векторы rAAV, содержащие трансгенные молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды плакофилина-2 (PKP2). В данном изобретении также предложены способы производства этих выделенных полинуклеотидов, векторов rAAV и вирусных векторов rAAV, а также их использование для доставки трансгенов для лечения или предотвращения заболевания или расстройства, включая заболевания, связанные с утратой и/или нарушением функции гена PKP2.

**[48]** В данном изобретении предложены векторы rAAV или вирусные векторы rAAV, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую плакофилин-2 (PKP2), для создания каркаса и восстановления комплекса межклеточных контактов кардиомиоцитов и уменьшения как электрических, так и структурных нарушений при АКПЖ. Никакие опубликованные исследования не продемонстрировали достаточности одного гена (десмосомального или другого) для восстановления комплекса межклеточных контактов кардиомиоцитов и предотвращения развития заболевания АКПЖ. Помимо прочего, в данном изобретении продемонстрировано, что AAV-опосредованная доставка PKP2 в неонатальные кардиомиоциты, несущие распространенную мутацию PKP2 человека, может восстановить утрату белков межклеточных контактов кардиомиоцитов, что позволяет устранить нарушения электрической активности и структуры сердца в данной модели заболевания. Кроме того, в данном изобретении продемонстрировано, что AAV-опосредованная доставка PKP2 в неонатальные кардиомиоциты, мутантные по PKP2, несущие эту распространенную мутацию PKP2 человека, может аналогичным образом восстановить утрату белков межклеточных контактов кардиомиоцитов, что позволяет предположить, что потеря дозы белка PKP2 является ключевым фактором, обуславливающим структурные и электрические нарушения сердца в данной модели заболевания. В данном изобретении дополнительно продемонстрировано, что раннее введение генной

терапии РКР2, осуществляемой с помощью AAV, у новорожденных мышей, несущих эту распространенную мутацию человеческого гена РКР2, было достаточно для предотвращения постнатального разрушения комплекса межклеточных контактов кардиомиоцитов и предотвращения развития АКПЖ у взрослых (сохранение 5 электрической и механической функции сердца), а также значимого улучшения продолжительности жизни мышей. В данном изобретении дополнительно продемонстрировано, что позднее введение генной терапии РКР2, осуществляемое с помощью вирусов AAV, у взрослых мышей, несущих эту распространенную мутацию человеческого гена РКР2, оказалось достаточным для восполнения и 10 восстановления белков межклеточных контактов кардиомиоцитов, улучшения функции сердца и предотвращения смертности. Эти данные в целом подчеркивают, что РКР2 функционирует как эффективный молекулярный каркас, способный восстанавливать межклеточный контакт кардиомиоцитов, а генная терапия РКР2 может служить ценным терапевтическим вариантом для пациентов с АКПЖ при 15 профилактическом применении или на поздних стадиях прогрессирования заболевания.

**[49]** Термин «аденоассоциированный вирус» или «AAV», используемый в контексте данного документа, относится к члену класса вирусов, связанных с этим названием и принадлежащих к роду Dependoparvovirus, семейству Parvoviridae. 20 Аденоассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК-вирус, размножающийся в клетках, в которых определенные функции обеспечивает коинфицирующий вирус-помощник. Общую информацию и обзоры AAV можно найти, например, в Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169- 228, and Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York). Вполне ожидаемо, что 25 те же принципы, описанные в этих обзорах, будут применимы к дополнительным серотипам AAV, охарактеризованным после дат публикации обзоров, поскольку хорошо известно, что различные серотипы довольно тесно связаны как структурно, так и функционально, даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; и Rose, 30 Comprehensive Virology 3: 1-61 (1974)). Например, все серотипы AAV, по-видимому, демонстрируют очень сходные свойства репликации, опосредованные гомологичными Rep-генами; и все они несут три родственных капсидных белка, таких как те, которые экспрессируются в AAV2. Степень родства дополнительно подтверждается гетеродуплексным анализом, который выявляет обширную 35 перекрестную гибридизацию между серотипами по длине генома; и наличие аналогичных самоотжигающихся сегментов на концах, которые соответствуют

«последовательностям инвертированного концевых повтора» (ITR). Сходные закономерности инфекционности также позволяют предположить, что функции репликации в каждом серотипе находятся под одинаковым регуляторным контролем. Известно, что несколько серотипов этого вируса подходят для доставки генов; все известные серотипы могут инфицировать клетки различных типов тканей. В данной области техники известно по меньшей мере 11 последовательно пронумерованных серотипов AAV. Неограничивающие иллюстративные серотипы, которые применяются в описанных в данном документе способах, включают любой из 11 серотипов, например, AAV2, AAV8, AAV9, или варианты серотипов, например, AAV-DJ и AAV PHP.B. Частица AAV содержит, состоит по существу из или состоит из трех основных вирусных белков: VP1, VP2 и VP3. В некоторых аспектах AAV относится к серотипу AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVPHP.B, AAVrh74 или AAVrh10.

**[50]** Иллюстративные аденоассоциированные вирусы и рекомбинантные аденоассоциированные вирусы включают, но не ограничиваются, все серотипы (например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVPHP.B, AAVrh74 и AAVrh10). Иллюстративные аденоассоциированные вирусы и рекомбинантные аденоассоциированные вирусы включают, но не ограничиваются, самокомплементарные AAV (scAAV) и гибриды AAV, содержащие геном одного серотипа и капсид другого серотипа (например, AAV2/5, AAV-DJ и AAV-DJ8). Иллюстративные аденоассоциированные вирусы и рекомбинантные аденоассоциированные вирусы включают, но не ограничиваются, rAAV-LK03, AAV-KP-1 (подробно описанные в Kerun *et al.* JCI Insight, 2019; 4(22):e131610) и AAV-NP59 (подробно описанные в Paulk *et al.* Molecular Therapy, 2018; 26(1): 289-303).

#### Структура и функции AAV

**[51]** AAV представляет собой парвовирус, дефектный по репликации, одноцепочечный ДНК-геном которого имеет длину около 4,7 т.п.н., включая два инвертированных концевых повтора (ITR) по 145 нуклеотидов. Существует несколько серотипов AAV. Нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV известны. Например, полный геном AAV-1 представлен в GenBank, номер доступа NC\_002077; полный геном AAV-2 представлен в GenBank, номер доступа NC\_001401 и Srivastava *et al.*, J. Virol., 45: 555-564 (1983); полный геном AAV-3 представлен в GenBank, номер доступа NC\_1829; полный геном AAV-4 представлен в GenBank, номер доступа NC\_001829; геном AAV-5 представлен в GenBank, номер доступа AF085716; полный геном AAV-6 представлен в GenBank, номер доступа

NC\_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 представлены в GenBank под номерами доступа AX753246 и AX753249 соответственно; геном AAV-9 представлен в Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 представлен в Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 представлен в Virology, 330(2):375-383 (2004). Последовательность генома AAV rh.74 представлена в патенте США № 9,434,928. В патенте США № 9,434,928 также представлены последовательности капсидных белков и самокомплементарный геном. В одном аспекте геном AAV представляет собой самокомплементарный геном. Цис-действующие последовательности, контролирующие репликацию вирусной ДНК (rep), капсидирование/упаковку и интеграцию в хромосомы клетки-хозяина, содержатся в ITR AAV. Три промотора AAV (названные p5, p19 и p40 в зависимости от их относительного местоположения на генетической карте) контролируют экспрессию двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены Rep и Cap. Два гер-промотора (p5 и p19) в сочетании с дифференциальным сплайсингом одного интрона AAV (по нуклеотидам 2107 и 2227) приводят к образованию четырех гер-белков (гер 78, гер 68, гер 52 и гер 40) из гер-гена. Rep-белки обладают множеством ферментативных свойств, которые в конечном итоге отвечают за репликацию вирусного генома.

**[52]** Cap-ген экспрессируется промотором p40 и кодирует три капсидных белка: VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты начала трансляции ответственны за производство трех родственных капсидных белков. Более конкретно, после транскрипции единственной мРНК, с которой транслируется каждый из белков VP1, VP2 и VP3, ее можно сплайсировать двумя разными способами: можно вырезать более длинный или более короткий интрон, что приводит к образованию двух пулов мРНК: пул мРНК длиной 2,3 и 2,6 т.п.н. Более длинный интрон часто является предпочтительным, и поэтому мРНК длиной 2,3 т.п.н. можно назвать основным вариантом сплайсинга. В этой форме отсутствует первый кодон AUG, с которого начинается синтез белка VP1, что приводит к снижению общего уровня синтеза белка VP1. Первый кодон AUG, который остается в основном варианте сплайсинга, является иницирующим кодоном белка VP3. Однако в 3'-5' направлении от этого кодона в той же открытой рамке считывания находится последовательность ACG (кодирующая треонин), которая окружена оптимальной последовательностью Козака (инициация трансляции). В некоторых аспектах последовательность Козака представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3. Это способствует низкому уровню синтеза белка VP2, который на самом деле является белком VP3 с дополнительными N-

концевыми остатками, как и VP1, как описано в Becerra SP et al., (December 1985). "Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82 (23): 7919–23, Cassinotti P et al., (November 1988). "Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1". *Virology*. 167 (1): 176–84, Muralidhar S et al., (January 1994). "Site-directed mutagenesis of adeno-associated virus type 2 structural protein initiation codons: effects on regulation of synthesis and biological activity". *Journal of Virology*. 68 (1): 170–6, и Trempe JP, Carter BJ (September 1988). "Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein". *Journal of Virology*. 62 (9): 3356–63, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Единственный консенсусный сайт полиА расположен в положении 95 на генетической карте генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассматриваются в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

**[53]** Каждый белок VP1 содержит часть VP1, часть VP2 и часть VP3. Часть VP1 представляет собой N-концевую часть белка VP1, уникальную для белка VP1. Часть VP2 представляет собой аминокислотную последовательность, присутствующую в белке VP1, которая также находится в N-концевой части белка VP2. Часть VP3 и белок VP3 имеют одинаковую последовательность. Часть VP3 представляет собой C-концевую часть белка VP1, которая является общей с белками VP1 и VP2.

**[54]** Белок VP3 можно дополнительно разделить на дискретные переменные области поверхности I-IX (VR-I-IX). Каждая из переменных областей поверхности (VR) может включать или содержать специфические аминокислотные последовательности, которые либо сами по себе, либо в сочетании со специфическими аминокислотными последовательностями каждой из других VR могут придавать уникальные фенотипы инфекции (например, снижение антигенности, улучшение трансдукции и/или тканеспецифического тропизма по сравнению с другими серотипами AAV) конкретному серотипу, как описано в DiMatta et al., "Structural Insight into the Unique Properties of Adeno-Associated Virus Serotype 9" *J. Virol.*, Vol. 86 (12): 6947-6958, June 2012, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

**[55]** AAV обладает уникальными свойствами, которые делают его привлекательным в качестве вектора для доставки чужеродной ДНК в клетки, например, при генной терапии. AAV-заражение клеток в культуре является нецитопатической, а естественное заражение людей и других животных протекает с



подавленной активностью и бессимптомно. Более того, AAV инфицирует многие клетки млекопитающих, что дает возможность воздействовать на множество различных тканей *in vivo*. Более того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и неделяющиеся клетки и может сохраняться практически на протяжении всей жизни этих клеток в качестве транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомного элемента). Геном провируса AAV встраивается в виде клонированной ДНК в плазмиды, что делает возможным создание рекомбинантных геномов. Более того, поскольку сигналы, управляющие репликацией и капсидированием генома AAV, содержатся в ITR генома AAV, некоторая или вся внутренняя часть генома приблизительно в 4,3 кб (кодирующая репликацию и структурные капсидные белки, гер-сар), может быть заменена чужеродной ДНК для создания векторов AAV. Белки Rep и Cap могут быть представлены в транс-положении. Еще одной важной особенностью AAV является то, что это чрезвычайно стабильный и устойчивый вирус. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (от 56° до 65°С в течение нескольких часов), что уменьшает критичность сохранения AAV. AAV может быть даже лиофилизирован. Наконец, клетки, инфицированные AAV, не устойчивы к суперинфекции.

**[56]** Многочисленные исследования продемонстрировали долгосрочную (> 1,5 лет) экспрессию рекомбинантного AAV-опосредованного белка в мышцах. См., Clark et al., *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14082-14087 (1996); и Xiao et al., *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996). См. также, Chao et al., *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) и Chao et al., *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Более того, поскольку мышцы высоко васкуляризованы, рекомбинантная трансдукция AAV приводит к появлению трансгенных продуктов в большом круге кровообращения после внутримышечной инъекции, как описано в Herzog et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5804-5809 (1997) и Murphy et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13921- 13926 (1997). Более того, в публикации Lewis et al., *J Virol*, 76: 8769-8775 (2002) продемонстрировано, что скелетные миофибриллы обладают необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, сворачивания и секреции антител, что указывает на то, что мышцы способны к стабильной экспрессии секретлируемых белковых терапевтических средств. Геномы рекомбинантного AAV (rAAV) по данному изобретению содержат, состоят по существу из или состоят из молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтический белок (например, PKP2), и одного или более ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. Производство псевдотипированного rAAV описано, например, в WO2001083692. Также предполагаются другие типы

вариантов rAAV, например rAAV с мутациями капсида. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны в данной области техники.

Выделенные полинуклеотиды, содержащие трансгенные последовательности

5 **[57]** В данном изобретении предложены выделенные полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере одну молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты.

**[58]** В некоторых аспектах молекула трансгенной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид РКР2 или по меньшей мере один его фрагмент. Как будет понятно 10 специалисту в данной области техники, РКР2 кодируется геном РКР2 в геноме человека. Таким образом, молекула трансгенной нуклеиновой кислоты может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности РКР2 или любого ее фрагмента. В некоторых аспектах молекула трансгенной нуклеиновой 15 кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую биологический эквивалент полипептида РКР2. В некоторых аспектах полипептид РКР2 может представлять собой любую изоформу РКР2, известную в данной области техники. В некоторых аспектах изоформа РКР2 может представлять собой изоформу РКР2 2a. В некоторых аспектах изоформа РКР2 может представлять собой изоформу РКР2 2b.

20 **[59]** В контексте данного документа и, если не указано иное, ген плакофилина-2 (РКР2), как описано в данном документе, означает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный белок РКР2. Ген или кодируемый белок могут встречаться в природе или быть модифицированными, но сохранять свою терапевтическую активность, как описано 25 в данном документе. Ген или кодируемый белок может иметь нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность выделенного встречающегося в природе гена или белка РКР2 млекопитающего, в том числе человеческого происхождения, например, которые хорошо известны в опубликованной литературе.

30 **[60]** Термин «РКР2» относится к полноразмерному белку плакофилина-2 и его функциональным фрагментам, включая аминокислотные последовательности, содержащие сегмент длиной не менее 75%, более предпочтительно не менее 80%, 90%, 95%, и наиболее предпочтительно 99% полноразмерного домена с идентичностью последовательности 100% и их вариации. Вариации 35 аминокислотных последовательностей рассматриваются как охватываемые данным изобретением, при условии, что вариации в аминокислотной последовательности

сохраняют по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, 90%, 95% и наиболее предпочтительно 99% идентичности последовательности, описанной в данном документе. Включая определенные промежуточные проценты, например, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 5 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентичности последовательностей. В частности, предусмотрены консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены представляют собой замены, которые происходят в семействе аминокислот, родственных по боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты обычно делятся на семейства: (1) кислые аминокислоты – аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты - лизин, аргинин, 10 гистидин; (3) неполярные аминокислоты — аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан и (4) незаряженные полярные аминокислоты — глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, 15 глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, которые относятся к алифатическим гидроксильным аминокислотам; (ii) аспарагин и глутамин, представляющие семейство аминокислот с амидной группой; (iii) аланин, 20 валин, лейцин и изолейцин, которые относятся к алифатическим аминокислотам; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые представляют ароматическое семейство аминокислот. Например, разумно предположить, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или подобная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не окажет 25 существенного влияния на связывание или свойства полученной молекулы, особенно если замена не затрагивает аминокислоту внутри каркасного участка. Приводит ли изменение аминокислоты к функциональному белку РКР2, можно легко определить путем анализа специфической активности производного белка. Фрагменты или аналоги белков РКР2 могут быть легко получены специалистами в 30 данной области техники. Предпочтительные amino- и карбокси-концы фрагментов или аналогов расположены вблизи границ функциональных доменов. Последовательность может быть модифицирована для улучшения терапевтической активности.

**[61]** Термин «ген РКР2» относится к белку плакофилина-2, кодирующему 35 полноразмерную нуклеотидную последовательность ДНК или РНК или их функциональный фрагмент, включая нуклеотидные последовательности,

содержащие сегмент длиной по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, 90%, 95% и наиболее предпочтительно 99% полноразмерной нуклеотидной последовательности со 100% идентичностью последовательности и их вариации. Фрагменты включают последовательности нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, содержащие сегмент длиной по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, 90%, 95% и наиболее предпочтительно 99% полноразмерного гена со 100% идентичностью последовательности и их вариации. Вариации последовательностей генов рассматриваются как охватываемые данным изобретением, при условии, что вариации последовательности нуклеиновой кислоты сохраняют по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 99% идентичности. Включая определенные промежуточные проценты, например, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентичности последовательностей. Последовательность может быть модифицирована для улучшения терапевтической активности и оптимизирована для доставки, например, с помощью аденоассоциированного вируса (AAV) или другой хорошо известной векторной системы доставки генов.

**[62]** В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, или ее варианта; В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной по меньшей мере одной части аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, или ее варианта;

**[63]** В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или ее фрагменту. В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной по

меньшей мере одной части аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или ее фрагменту.

**[64]** В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 5 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, или ее варианта; В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 10 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной по меньшей мере одной части аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, или ее варианта;

**[65]** В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из 15 последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной любой из последовательностей нуклеиновой кислоты, представленных в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14. В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, 20 содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, может 25 называться последовательностью PKP2.

**[66]** В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между 30 ними) идентичной любой из последовательностей нуклеиновой кислоты, представленных в SEQ ID NO: 4. В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или 35 любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 4.

**[67]** В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между 5 ними) идентичной любой из последовательностей нуклеиновой кислоты, представленных в SEQ ID NO: 14. В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или 10 любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 14.

#### Оптимизация Кодонов

**[68]** В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, может представлять собой оптимизированную по 15 кодомам последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид PKP2. Оптимизированная по кодомам последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты, которая не более, чем на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% (или любой процент 20 между ними) идентична последовательности нуклеиновой кислоты человека дикого типа, кодирующей полипептид PKP2.

**[69]** В некоторых аспектах оптимизированная по кодомам последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, может не 25 содержать донорных сайтов сплайсинга. В некоторых аспектах оптимизированная по кодомам последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, может содержать не более чем около одного, или около двух, или около трех, или около четырех, или около пяти, или около шести, или около семи или около 30 восьми, или около девяти, или около десяти донорных сайтов сплайсинга. В некоторых аспектах оптимизированная по кодомам последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит по меньшей мере на 30 один, или по меньшей мере на два, или по меньшей мере на три, или по меньшей мере на четыре, или по меньшей мере на пять, или по меньшей мере на шесть, или по меньшей мере на семь, или по меньшей мере на восемь, или по меньшей мере на девять, или по меньшей мере на десять донорных сайтов сплайсинга меньше по 35 сравнению с последовательностью нуклеиновой кислоты человека дикого типа, кодирующей полипептид PKP2. Не желая ограничиваться какой-либо теорией,

отметим, что удаление донорных сайтов сплайсинга в оптимизированной по кодонам последовательности нуклеиновой кислоты может неожиданно и непредсказуемо увеличить экспрессию полипептида РКР2 *in vivo*, поскольку предотвращается криптический сплайсинг. Более того, криптический сплайсинг может варьироваться у разных субъектов, а это означает, что уровень экспрессии полипептида РКР2, содержащего донорные сайты сплайсинга, может непредсказуемо варьироваться у разных субъектов. Такая непредсказуемость неприемлема в контексте терапии человека.

**[70]** В некоторых аспектах оптимизированная по кодомам последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид РКР2, может иметь содержание GC, которое отличается от содержания GC последовательности нуклеиновой кислоты человека дикого типа, кодирующей полипептид РКР2. В некоторых аспектах содержание GC оптимизированной по кодомам последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид РКР2, более равномерно распределено по всей последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с последовательностью нуклеиновой кислоты человека дикого типа, кодирующей полипептид РКР2. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, за счет более равномерного распределения содержания GC по всей последовательности нуклеиновой кислоты оптимизированная по кодомам последовательности нуклеиновой кислоты демонстрирует более однородную температуру плавления («Tm») по длине транскрипта. Однородность температуры плавления неожиданно приводит к усилению экспрессии оптимизированной по кодомам последовательности нуклеиновой кислоты у человека, поскольку транскрипция и/или трансляция последовательности нуклеиновой кислоты происходит с меньшим замедлением полимеразы и/или рибосомы.

**[71]** В некоторых аспектах оптимизированная по кодомам последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид РКР2, может иметь меньше репрессивных сайтов связывания с мишенью микроРНК по сравнению с последовательностью нуклеиновой кислоты человека дикого типа, кодирующей полипептид РКР2. В некоторых аспектах оптимизированная по кодомам последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид РКР2, может содержать по меньшей мере на один, или по меньшей мере на два, или по меньшей мере на три, или по меньшей мере на четыре, или по меньшей мере на пять, или по меньшей мере на шесть, или по меньшей мере на семь, или по меньшей мере на восемь, или по меньшей мере на девять, или, по меньшей мере на десять, или по меньшей мере на десять меньше репрессивных сайтов связывания с мишенью

микроРНК по сравнению с последовательностью нуклеиновой кислоты человека дикого типа, кодирующей полипептид РКР2. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, отметим, что благодаря меньшему количеству репрессивных сайтов связывания с мишенью микроРНК оптимизированная по кодам

5 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид РКР2, неожиданно демонстрирует повышенную экспрессию у человека.

**[72]** В некоторых аспектах оптимизированная по кодам последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид РКР2, проявляет увеличение экспрессии по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на

10 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% по сравнению с диким типом последовательности нуклеиновой кислоты человека или не оптимизированной по кодам последовательностью, кодирующей

15 полипептид РКР2.

#### Векторы AAV

**[73]** В некоторых аспектах выделенные полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере одну молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, могут представлять собой рекомбинантный вектор AAV (rAAV).

**[74]** В контексте данного документа термин «вектор» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей, по существу состоящей из или состоящей из интактного репликона, так что вектор может реплицироваться при помещении его внутрь клетки, например, посредством процесса трансфекции, инфицирования или трансформации. Специалистам в данной области техники понятно, что, после

25 попадания внутрь клетки вектор может реплицироваться как экстрахромосомный (эпизомальный) элемент или интегрироваться в хромосому клетки-хозяина. Векторы могут включать нуклеиновые кислоты, полученные из ретровирусов, аденовирусов, герпесвирусов, бакуловирусов, модифицированных бакуловирусов, паповавирусов или иным образом модифицированных встречающихся в природе вирусов.

30 Иллюстративные невирусные векторы для доставки нуклеиновой кислоты включают голую ДНК; ДНК в комплексе с катионными липидами, отдельно или в сочетании с катионными полимерами; анионные и катионные липосомы; ДНК-белковые комплексы и частицы, содержащие, состоящие по существу или состоящие из ДНК, конденсированной с катионными полимерами, такими как гетерогенный полилизин,

35 олигопептиды определенной длины и полиэтиленмин, в некоторых случаях



содержащиеся в липосомах; и применение тройных комплексов, содержащих, состоящих по существу или состоящих из вируса и полилизин-ДНК.

**[75]** Что касается общих рекомбинантных способов, в данной области техники хорошо известны векторы, которые содержат как промотор, так и сайт клонирования, с которым может быть функционально связан полинуклеотид. Такие векторы способны транскрибировать РНК *in vitro* или *in vivo* и коммерчески доступны от таких источников, как Agilent Technologies (Санта-Клара, Калифорния) и Promega Biotech (Мэдисон, Висконсин). Чтобы оптимизировать экспрессию и/или транскрипцию *in vitro*, может оказаться необходимым удалить, добавить или изменить 5'- и/или 3'-нетранспируемые части клонированных трансгенов, чтобы исключить дополнительные, потенциально неподходящие альтернативные кодоны инициации трансляции или другие последовательности, которые могут мешать экспрессии или снижать ее как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Альтернативно, консенсусные сайты связывания рибосомы могут быть вставлены непосредственно в 5'-конце от стартового кодона для усиления экспрессии.

**[76]** Используемый в контексте данного документа термин «вектор гAAV» относится к вектору, содержащему, состоящему по существу из или состоящему из одной или более трансгенных последовательностей и одной или более последовательности инвертированного концевой повтора (ITR) AAV. Такие векторы AAV можно реплицировать и упаковывать в инфекционные вирусные частицы, если они присутствуют в клетке-хозяине, которая обеспечивает функциональность продуктов генов Rep и Cap; например, путем трансфекции клетки-хозяина. В некоторых аспектах векторы AAV содержат промотор, по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, которая может кодировать по меньшей мере один белок или РНК, и/или энхансер, и/или терминатор внутри фланкирующих ITR, которые упакованы в инфекционную частицу AAV. Инкапсидированная часть нуклеиновой кислоты может называться геномом вектора AAV. Плазмиды, содержащие векторы гAAV, могут также содержать элементы для целей производства, например, гены устойчивости к антибиотикам, точки начала репликации и т.д., но они не инкапсидированы и, таким образом, не образуют часть частицы AAV.

**[77]** В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать по меньшей мере одну молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать по меньшей мере одну промоторную последовательность. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать по меньшей мере одну

энхансерную последовательность. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать по меньшей мере один посттранскрипционный регуляторный элемент. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать по меньшей мере одну последовательность полиА. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать по меньшей мере один репортерный белок. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать первую последовательность ITR AAV, промоторную последовательность, молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, последовательность полиА и вторую последовательность ITR AAV. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать в направлении от 5' к 3' первую последовательность ITR AAV, промоторную последовательность, молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, последовательность полиА и вторую последовательность ITR AAV.

**[78]** В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать первую последовательность ITR AAV, промоторную последовательность, молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, посттранскрипционный регуляторный элемент, последовательность полиА и вторую последовательность ITR AAV. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать в направлении от 5' к 3' первую последовательность ITR AAV, промоторную последовательность, молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, посттранскрипционный регуляторный элемент, последовательность полиА и вторую последовательность ITR AAV.

**[79]** В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать более одной молекулы трансгенной нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать по меньшей мере две молекулы трансгенной нуклеиновой кислоты, так что вектор гAAV содержит первую молекулу трансгенную нуклеиновой кислоты и по меньшей мере вторую молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах первая и по меньшей мере вторая молекула трансгенной нуклеиновой кислоты могут содержать одну и ту же последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах первая и по меньшей мере вторая молекула трансгенной нуклеиновой кислоты могут содержать разные последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах первая и по меньшей мере вторая трансгенная последовательность нуклеиновой кислоты могут быть расположены рядом друг с другом.

**[80]** В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать более одной промоторной последовательности. В некоторых аспектах вектор гAAV может содержать по меньшей мере две промоторные последовательности, так что вектор гAAV содержит первую промоторную последовательность и по меньшей мере вторую промоторную последовательность. В некоторых аспектах первая и по

меньшей мере вторая промоторная последовательность могут содержать одну и ту же последовательность. В некоторых аспектах первая и по меньшей мере вторая промоторная последовательность могут содержать разные последовательности. В некоторых аспектах первая и по меньшей мере вторая промоторная последовательность нуклеиновой кислоты могут быть расположены рядом друг с другом. В некоторых аспектах, в которых вектор гAAV также содержит первую молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты и по меньшей мере вторую молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, первый промотор может быть расположен выше (5') от первой молекулы трансгенной нуклеиновой кислоты, и по меньшей мере второй промотор может быть расположен между первой молекулой трансгенной нуклеиновой кислоты и по меньшей мере второй молекулой трансгенной нуклеиновой кислоты, так что по меньшей мере второй промотор находится ниже (3') от первой молекулы трансгенной нуклеиновой кислоты и выше (5') от по меньшей мере второй молекулы трансгенной нуклеиновой кислоты.

**[81]** Любой из предшествующих векторов гAAV может дополнительно содержать по меньшей мере один энхансер. По меньшей мере один энхансер может быть расположен в любом месте вектора гAAV. В некоторых аспектах по меньшей мере один энхансер может быть расположен непосредственно выше (5') от промотора. Таким образом, вектор гAAV может содержать в направлении от 5' к 3' первую последовательность ITR AAV, энхансер, промоторную последовательность, молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, последовательность полиА и вторую последовательность ITR AAV. В некоторых аспектах по меньшей мере один энхансер может быть расположен непосредственно ниже (3') промотора. Таким образом, вектор гAAV может содержать в направлении от 5' к 3' первую последовательность ITR AAV, промоторную последовательность, энхансер, молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, последовательность полиА и вторую последовательность ITR AAV. В некоторых аспектах по меньшей мере один энхансер может быть расположен непосредственно после молекулы трансгенной нуклеиновой кислоты. Таким образом, вектор гAAV может содержать в направлении от 5' к 3' первую последовательность ITR AAV, промоторную последовательность, молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, энхансер, последовательность полиА и вторую последовательность ITR AAV.

**[82]** В некоторых аспектах вектор гAAV по данному изобретению содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% или

100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 9, или ее фрагменту.

**[83]** В некоторых аспектах вектор gAAV по данному изобретению содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по  
5 меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 18, или ее фрагменту.

**[84]** В некоторых аспектах вектор gAAV по данному изобретению содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по  
10 меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 21, или ее фрагменту.

**[85]** В некоторых аспектах вектор gAAV по данному изобретению содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по  
15 меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 22, или ее фрагменту.

**[86]** В некоторых аспектах вектор gAAV по данному изобретению содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по  
20 меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 23, или ее фрагменту.

**[87]** В некоторых аспектах вектор gAAV по данному изобретению содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по  
25 меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 24, или ее фрагменту.

В некоторых аспектах вектор gAAV по данному изобретению содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей  
30 мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 26, или ее фрагменту.

В некоторых аспектах вектор gAAV по данному изобретению содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей  
35 мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% или 100% (или

любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 29, или ее фрагменту.

В некоторых аспектах вектор rAAV по данному изобретению содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 30, или ее фрагменту. Последовательности ITR AAV

**[88]** В некоторых аспектах последовательность ITR AAV может содержать любую последовательность ITR AAV, известную в данной области техники. В некоторых аспектах последовательность ITR AAV может представлять собой последовательность ITR AAV1, последовательность ITR AAV2, последовательность ITR AAV4, последовательность ITR AAV5, последовательность ITR AAV6, последовательность ITR AAV7, последовательность ITR AAV8, последовательность ITR AAV9, последовательность ITR AAV10, последовательность ITR AAV11, последовательность ITR AAV12, последовательность ITR AAV13, последовательность ITR AAVrh74 или последовательность ITR AAVrh10.

**[89]** Таким образом, в некоторых аспектах последовательность ITR AAV может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности ITR AAV1, последовательности ITR AAV2, последовательности ITR AAV4, последовательности ITR AAV5, последовательности ITR AAV6, последовательности ITR AAV7, последовательности ITR AAV8, последовательности ITR AAV9, последовательности ITR AAV10, последовательности ITR AAV11, последовательности ITR AAV12, последовательности ITR AAV13, последовательности ITR AAVrh74 или последовательности ITR AAVrh10.

**[90]** В некоторых аспектах вектор rAAV по данному изобретению может содержать, по существу состоять или состоять из последовательностей ITR AAV2. В некоторых аспектах вектор rAAV по данному изобретению может содержать, состоять по существу или состоять из последовательностей ITR AAV2 или модифицированной последовательности ITR AAV2.

**[91]** В некоторых аспектах последовательность ITR AAV2 может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 7.

**[92]** В некоторых аспектах последовательность ITR AAV2 может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой

кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 8.

**[93]** В некоторых аспектах последовательность ITR AAV2 может  
5 содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой  
кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,  
99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности  
SEQ ID NO: 15.

**[94]** В некоторых аспектах последовательность ITR AAV2 может  
10 содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой  
кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,  
99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности  
SEQ ID NO: 16.

**[95]** В некоторых аспектах последовательность ITR AAV2 может  
15 содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой  
кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,  
99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности  
SEQ ID NO: 19.

**[96]** В некоторых аспектах последовательность ITR AAV2 может  
20 содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой  
кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,  
99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности  
SEQ ID NO: 20.

**[97]** В некоторых аспектах последовательность ITR AAV2 может  
25 содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой  
кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,  
99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности  
SEQ ID NO: 25.

**[98]** В некоторых аспектах первая последовательность ITR AAV может  
30 содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой  
кислоты, по меньшей мере, на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,  
99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности  
SEQ ID NO: 7, и вторая последовательность ITR AAV может содержать, состоять по  
35 существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей  
мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или  
любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 8.



SEQ ID NO: 16, и вторая последовательность ITR AAV может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 15.

5 **[104]** В некоторых аспектах первая последовательность ITR AAV может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 19, и вторая последовательность ITR AAV может содержать, состоять  
10 по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 20.

**[105]** В некоторых аспектах первая последовательность ITR AAV может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой  
15 кислоты, по меньшей мере, на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 20, и вторая последовательность ITR AAV может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей  
20 мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 19.

**[106]** В некоторых аспектах последовательность ITR по данному изобретению может располагаться в любом порядке, например в прямой ориентации или перевернутой в обратной ориентации. В некоторых аспектах последовательность ITR по данному изобретению может содержать мутацию,  
25 делецию, вставку или перераспределение одного или более нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ITR.

#### Промоторная последовательность и энхансеры

**[107]** В контексте данного документа термин «промотор» и «промоторная последовательность» означает регуляторную последовательность, которая  
30 представляет собой область полинуклеотидной последовательности, в которой контролируются инициация и скорость транскрипции кодирующей последовательности, такой как ген или трансген. Промоторы могут быть, например, конститутивными, индуцибельными, репрессируемыми или тканеспецифичными. Промоторы могут содержать генетические элементы, с которыми могут связываться  
35 регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и факторы транскрипции. Неограничивающие иллюстративные промоторы включают промотор



LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор  $\beta$ -актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK), промотор U6, промотор H1, универсальный гибридный промотор  $\beta$ -актина кур (CBh), промотор малой ядерной РНК (U1a или U1b), промотор MeCP2, промотор MeP418, промотор MeP426, минимальный промотор MeCP2, промотор VMD2, промотор mRho или промотор EF1.

**[108]** Дополнительные неограничивающие иллюстративные промоторы, предложенные в данном документе, включают, но не ограничиваются, EFla, Ubc,  $\beta$ -актин человека, CAG, TRE, Ac5, полиэдрин, CaMKIIa, Gal1, TEF1, GDS, ADH1, Ubi и  $\alpha$ -1-антитрипсин (hAAT). В данной области техники известно, что нуклеотидные последовательности таких промоторов могут быть модифицированы с целью повышения или снижения эффективности транскрипции мРНК. См., например, Gao, et al. (2018) Mol. Ther.: Nucleic Acids 12:135-145 (модификация TATA-бокса промоторов 7SK, U6 и H1 для отмены транскрипции с участием РНК-полимеразы III и стимуляции транскрипции мРНК, зависящей от РНК-полимеразы II). Синтетически полученные промоторы можно использовать для универсальной или тканеспецифичной экспрессии. Кроме того, в способах, описанных в данном документе, могут быть использованы промоторы вирусного происхождения, некоторые из которых описаны выше, например, промоторы CMV, HIV, аденовируса и AAV. В некоторых аспектах промотор используется вместе по меньшей мере с одним энхансером для повышения эффективности транскрипции. Неограничивающие примеры энхансеров включают энхансер интерфоторецепторного ретиноид-связывающего белка (IRBP), энхансер RSV или энхансер CMV.

**[109]** В некоторых аспектах промоторная последовательность может содержать, по существу состоять или состоять из промоторной последовательности LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промоторной последовательности цитомегаловируса (CMV), промоторной последовательности SV40, промоторной последовательности дигидрофолатредуктазы, промоторной последовательности  $\beta$ -актина, промоторной последовательности фосфоглицеринкиназы (PGK), промоторной последовательности U6, промоторной последовательности H1, последовательности универсального гибридного промотора  $\beta$ -актина кур (CBh), промоторной последовательности малой ядерной РНК (U1a или U1b), промоторной последовательности MeCP2, промоторной последовательности MeP418, промоторной последовательности MeP426,

последовательности минимального промотора MeCP2, промоторной последовательности VMD2, промоторной последовательности mRho, промоторной последовательности EFI, промоторной последовательности EFla, промоторной последовательности Ubc, промоторной последовательности  $\beta$ -актина человека, промоторной последовательности CAG, промоторной последовательности TRE, промоторной последовательности Ac5, промоторной последовательности полиэдрина, промоторной последовательности CaMKIIa, промоторной последовательности Gal1, промоторной последовательности TEF1, промоторной последовательности GDS, промоторной последовательности ADH1, промоторной последовательности Ubi или промоторной последовательности  $\alpha$ -1-антитрипсина (hAAT).

**[110]** В других аспектах промоторная последовательность может представлять собой кардиоспецифичный промотор. В некоторых аспектах кардиоспецифичный промотор представляет собой промотор TNNI2. В некоторых аспектах кардиоспецифичный промотор представляет собой промотор NKX2.5. В некоторых аспектах кардиоспецифичный промотор представляет собой промотор кардиотропонина Т (сТпТ). В некоторых аспектах промотор кардиотропонина Т управляет кардиоспецифичной экспрессией. В некоторых аспектах промотор кардиотропонина Т управляет специфичной для кардиомиоцитов экспрессией.

**[111]** Энхансер представляет собой регуляторный элемент, который увеличивает экспрессию целевой последовательности. «Промотор/энхансер» представляет собой полинуклеотид, который содержит последовательности, способные выполнять функции как промотора, так и энхансера. Например, длинные концевые повторы ретровирусов обладают как функцией промотора, так и функцией энхансера. Энхансер/промотор может быть «эндогенным», «экзогенным» или «гетерологичным». «Эндогенный» энхансер/промотор — это тот, который естественным образом связан с данным геном в геноме. «Экзогенный» или «гетерологичный» энхансер/промотор — это тот, который помещается рядом с геном посредством генетических манипуляций (т.е. молекулярно-биологических способов) или синтетических способов, так что транскрипция этого гена регулируется связанным энхансером/промотором. Неограничивающие примеры связанного энхансера/промотора для использования в способах, композициях и конструкциях, предложенных в данном документе, включают промотор PDE плюс энхансер IRBP или энхансер CMV плюс промотор U1a. В данной области техники понятно, что энхансеры могут действовать на расстоянии и независимо от их ориентации относительно местоположения эндогенного или гетерологичного

промотора. Таким образом, дополнительно понятно, что энхансер, действующий на расстоянии от промотора, «функционально связан» с этим промотором независимо от его местоположения в векторе или его ориентации относительно местоположения промотора.

5 **[112]** Используемый в контексте данного изобретения термин «функционально связанный» относится к экспрессии гена (т.е. трансгена), который находится под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может быть расположен в направлении 5' (выше) или 3' (ниже) от гена, находящегося под его регуляцией. Промотор может быть расположен в  
10 направлении 5' (выше) от гена, находящегося под его регуляцией. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, как расстояние между этим промотором и геном, который он контролирует, в гене, из которого получен этот промотор. Изменение расстояния между промотором и геном может быть скорректировано без потери функции промотора.

15 **[113]** В некоторых аспектах последовательность промотора может содержать, по существу состоять или состоять из промоторной последовательности кардиотропонина Т (сТnТ). Промоторная последовательность сТnТ может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,  
20 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 2.

**[114]** В некоторых аспектах бактериальные плазмиды по данному изобретению могут содержать прокариотический промотор.

#### Молекулы трансгенной нуклеиновой кислоты

25 **[115]** В некоторых аспектах молекула трансгенной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PKP2 или по меньшей мере один его фрагмент. В некоторых аспектах молекула трансгенной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую биологический эквивалент полипептида PKP2  
30 или по меньшей мере один его фрагмент.

**[116]** В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной аминокислотной последовательности,  
35 представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, или ее варианта; В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из

аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной по меньшей мере одной части аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13, или ее варианта;

- 5 **[117]** В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или ее фрагменту. В некоторых аспектах
- 10 полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной по меньшей мере одной части аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или ее фрагменту.
- 15 **[118]** В некоторых аспектах полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, или ее варианта; В некоторых аспектах
- 20 полипептид PKP2 содержит, состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной по меньшей мере одной части аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, или ее варианта;
- 25 **[119]** В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной любой из последовательностей нуклеиновой кислоты, представленных в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14. В некоторых аспектах
- 30 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности
- 35 нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, может называться последовательностью PKP2.

**[120]** В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной любой из последовательностей нуклеиновой кислоты, представленных в SEQ ID NO: 4. В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 4.

**[121]** В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной любой из последовательностей нуклеиновой кислоты, представленных в SEQ ID NO: 14. В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 14.

**[122]** В некоторых аспектах молекула трансгенной нуклеиновой кислоты может содержать, состоять по существу из или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей репортерный белок. В контексте данного документа репортерный белок представляет собой обнаруживаемый белок, который функционально связан с промотором для анализа экспрессии (например, тканеспецифичности и/или силы) промотора. В некоторых аспектах репортерный белок может быть функционально связан с полипептидом. В некоторых аспектах репортерные белки могут использоваться для мониторинга способов доставки ДНК, функциональной идентификации и характеристики промоторных и энхансерных элементов, регуляции трансляции и транскрипции, процессинга мРНК и взаимодействий белок:белок. Неограничивающими примерами репортерного белка являются  $\beta$ -галактозидаза; флуоресцентный белок, такой как зеленый

флуоресцентный белок (GFP) или красный флуоресцентный белок (RFP); люцифераза; глутатион S-трансфераза; и мальтозосвязывающий белок.

**[123]** В некоторых аспектах молекула трансгенной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный пептид.

**[124]** В некоторых аспектах молекула трансгенной нуклеиновой кислоты, присутствующая в векторе gAAV, может находиться под транскрипционным контролем промоторной последовательности, также присутствующей в том же векторе gAAV.

#### 10 Посттранскрипционные регуляторные элементы

**[125]** В вирусных векторах можно использовать различные посттранскрипционные регуляторные элементы, например, для повышения уровня экспрессии интересующего белка в клетке-хозяине. В некоторых вариантах реализации данного изобретения посттранскрипционный регуляторный элемент может представлять собой вирусный посттранскрипционный регуляторный элемент. Неограничивающие примеры вирусного посттранскрипционного регуляторного элемента включают посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE), посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HBVPRE), транспортный элемент РНК (RTE) и любые их варианты. В некоторых аспектах посттранскрипционные регуляторные элементы могут представлять собой оптимизированные посттранскрипционные регуляторные элементы (oPRE). oPRE может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит, состоит по существу или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

#### Последовательности полиА

**[126]** В некоторых аспектах последовательность полиаденилирования (полиА) может содержать любую последовательность полиА, известную в данной области техники. Неограничивающие примеры последовательностей полиА включают, но не ограничиваются, последовательность полиА MeCP2, последовательность полиА ретинолдегидрогеназы 1 (RDH1), последовательность полиА бычьего гормона роста (BGH), последовательность полиА SV40, последовательность полиА SPA49, последовательность полиА sNRP-TK65,

последовательность полиА sNRP, последовательность полиА бета-глобина кролика или последовательность полиА ТК65.

**[127]** Таким образом, последовательность полиА может содержать, по существу состоять или состоять из последовательности полиА MeCP2, последовательности полиА ретинолдегидрогеназы 1 (RDH1), последовательности полиА бычьего гормона роста (BGH), последовательности полиА SV40, последовательности полиА SPA49, последовательности полиА sNRP-ТК65, последовательности полиА sNRP или последовательности полиА ТК65.

**[128]** В некоторых аспектах последовательность полиА может содержать, по существу состоять или состоять из последовательности полиА бета-глобина кролика. В некоторых аспектах последовательность полиА бета-глобина кролика может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 6.

**[129]** В некоторых аспектах последовательность полиА может содержать, по существу состоять или состоять из последовательности полиА BGH. В некоторых аспектах последовательность полиА BGH может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 17.

#### Бактериальные плазмиды

**[130]** В некоторых аспектах векторы гAAV по данному изобретению могут содержаться внутри бактериальной плазмиды, что позволяет размножить вектор гAAV in vitro. Таким образом, в данном изобретении предложены бактериальные плазмиды, содержащие любой из векторов гAAV, описанных в данном документе. Бактериальная плазмида может дополнительно содержать последовательность точки начала репликации. Бактериальная плазмида может дополнительно содержать ген устойчивости к антибиотику. Бактериальная плазмида может дополнительно содержать прокариотический промотор.

**[131]** В неограничивающем примере вектор гAAV в бактериальной плазмиде содержит в направлении от 5' к 3': 5'-ITR, промоторную последовательность сTnT, молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PKP2, последовательность oPRE, последовательность полиА BGH и 3'-ITR.

**[132]** В некоторых аспектах бактериальная плаزمида по данному изобретению может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 10.

Последовательность точки начала репликации

5 **[133]** В некоторых аспектах последовательность точки начала репликации может содержать, по существу состоять или состоять из любой последовательности точки начала репликации, известной в данной области техники. Последовательность точки начала репликации может представлять собой бактериальную точку начала репликации, что позволяет продуцировать, размножать  
10 и поддерживать вектор gAAV, содержащий указанную бактериальную последовательность точки начала репликации, в бактериях, используя способы, стандартные в данной области техники.

**[134]** В некоторых аспектах последовательность точки начала репликации может содержать, по существу состоять или состоять из последовательности точки  
15 начала репликации рUC. Последовательность точки начала репликации рUC19 может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 11.

20 Гены устойчивости к антибиотикам

**[135]** В некоторых аспектах векторы gAAV и/или вирусные векторы gAAV по данному изобретению могут содержать ген устойчивости к антибиотику.

**[136]** В некоторых аспектах ген устойчивости к антибиотику может  
25 содержать, по существу состоять или состоять из любых генов устойчивости к антибиотикам, известных в данной области техники. Примеры генов устойчивости к антибиотикам, известных в данной области техники, включают, но не ограничиваются, гены устойчивости к канамицину, гены устойчивости к спектиномицину, гены устойчивости к стрептомицину, гены устойчивости к ампициллину, гены устойчивости к карбенициллину, гены устойчивости к  
30 блеомицину, гены устойчивости к эритромицину, гены устойчивости к полимиксину В, гены устойчивости к тетрациклину и гены устойчивости к хлорамфениколу.

**[137]** В некоторых аспектах ген устойчивости к антибиотику может  
35 содержать, состоять по существу или состоять из гена устойчивости к антибиотику ампициллину. Ген устойчивости к антибиотику ампициллину может содержать, состоять по существу или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или



100% (или любой процент между ними) идентичной последовательности SEQ ID NO: 12.

#### Вирусные векторы AAV

**[138]** «Вирусный вектор» определяется как полученный рекомбинантным путем вирус или вирусная частица, которая содержит полинуклеотид, подлежащий доставке в клетку-хозяина, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо *in vitro*. Примеры вирусных векторов включают ретровирусные векторы, векторы AAV, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, альфавирусные векторы и т.п. Альфавирусные векторы, такие как векторы на основе вируса леса Семлики и векторы на основе вируса Синдбис, также были разработаны для использования в генной терапии и иммунотерапии. См., например, Schlesinger and Dubensky (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:434-439 и Ying, et al. (1999) *Nat. Med.* 5(7):823-827.

**[139]** «Вирион AAV», или «вирусная частица AAV», или «вирусный вектор AAV», или «вирусный вектор гAAV», или «векторная частица AAV», или «частица AAV» относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного вектора гAAV. Таким образом, получение вирусного вектора гAAV обязательно включает получение вектора гAAV, поскольку такой вектор содержится в векторе гAAV.

**[140]** Используемый в контексте данного документа термин «вирусный капсид» или «капсид» относится к белковоподобной оболочке или слою вирусной частицы. Капсиды выполняют функцию капсидирования, защиты, транспортировки и высвобождения в клетку-хозяина вирусного генома. Капсиды обычно состоят из олигомерных структурных субъединиц белка («капсидных белков»). Используемый в контексте данного документа термин «инкапсидированный» означает заключенный в вирусный капсид. Вирусный капсид AAV состоит из смеси трех белков вирусного капсида: VP1, VP2 и VP3. Смесь VP1, VP2 и VP3 содержит 60 мономеров, расположенных в икосаэдрической симметрии  $T = 1$  в соотношении 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) или 1:1:20 (VP1:VP2:VP3), как описано в Sonntag F et al., (June 2010). "A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107 (22): 10220–5, и Rabinowitz JE, Samulski RJ (December 2000). "Building a better vector: the manipulation of AAV virions". *Virology.* 278 (2): 301–8, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

**[141]** В данном изобретении предложен вирусный вектор гAAV, содержащий: а) любой из векторов гAAV, описанных в данном документе; и б) капсидный белок AAV.

**[142]** Капсидный белок AAV может представлять собой любой капсидный белок AAV, известный в данной области техники. Капсидный белок AAV может представлять собой капсидный белок AAV1, капсидный белок AAV2, капсидный белок AAV4, капсидный белок AAV5, капсидный белок AAV6, капсидный белок AAV7, капсидный белок AAV8, капсидный белок AAV9, капсидный белок AAV10, капсидный белок AAV11, капсидный белок AAV12, капсидный белок AAV13, капсидный белок AAVPHP.B, капсидный белок AAVrh74 или капсидный белок AAVrh10. В некоторых аспектах капсидный белок может представлять собой капсидный белок AAV9. В некоторых аспектах капсидный белок может представлять собой капсидный белок AAVrh10.

#### Композиции и фармацевтические композиции

**[143]** В данном изобретении предложены композиции, содержащие любые из выделенных полинуклеотидов, векторов gAAV и/или вирусных векторов gAAV, описанных в данном документе. В некоторых аспектах композиции могут представлять собой фармацевтические композиции. Соответственно, в данном изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие любые из выделенных полинуклеотидов, векторов gAAV и/или вирусных векторов gAAV, описанных в данном документе.

**[144]** Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может быть составлена любыми способами, известными или разработанными в области фармакологии, которые включают, но не ограничиваясь, взаимодействие активных ингредиентов (например, вирусных частиц или рекомбинантных векторов) с эксципиентом и/или добавкой и/или другим вспомогательным ингредиентом, дозирование или упаковка продукта в единицы дозирования. Вирусные частицы по данному изобретению могут быть составлены с желаемыми характеристиками, например, повышенной стабильностью, повышенной трансфекцией клеток, пролонгированным или замедленным высвобождением, биораспределением или тропизмом, модулированной или усиленной трансляцией кодируемого белка *in vivo* и профилем высвобождения кодируемого белка *in vivo*.

**[145]** В частности, фармацевтическая композиция может дополнительно содержать физиологический раствор, липидоиды, липосомы, липидные наночастицы, полимеры, липоплексы, наночастицы типа ядро-оболочка, пептиды, белки, клетки, трансфицированные вирусными векторами (например, для трансплантации субъекту), имитаторы наночастиц или их комбинации. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция составлена в виде наночастиц. В

некоторых аспектах наночастица представляет собой самоорганизующуюся наночастицу нуклеиновой кислоты.

**[146]** Фармацевтическая композиция по данному изобретению может быть приготовлена, упакована и/или продана в больших количествах в виде разовой 5 единичной дозы и/или в виде множества разовых единичных доз. Количество активного ингредиента, как правило, соответствует дозировке активного ингредиента, которая будет введена субъекту и/или удобной доле такой дозы, например, половине или трети такой дозы. Составы по данному изобретению могут включать один или более эксципиентов и/или добавок, каждый в количестве, 10 которое совместно увеличивает стабильность вирусного вектора, увеличивает трансфекцию или трансдукцию клеток с помощью вирусного вектора, увеличивает экспрессию кодируемого вирусным вектором белка и/или изменяет профиль высвобождения белков, закодированных вирусным вектором. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит эксципиент и/или добавку. 15 Неограничивающие примеры эксципиентов и/или добавок включают растворители, дисперсионные среды, разбавители или другие жидкие носители, средства для диспергирования или суспендирования, поверхностно-активные вещества, изотонические агенты, загустители или эмульгаторы, консерванты или их комбинации.

**[147]** В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит криопротектор. Термин «криопротектор» относится к агенту, способному уменьшить или устранить повреждение вещества при замораживании. Неограничивающие 20 примеры криопротекторов включают сахарозу, трегалозу, лактозу, глицерин, декстрозу, раффинозу и/или маннит.

**[148]** Используемый в контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или внесенный в список в Фармакопее США или других общепризнанных фармакопей в дополнение к другим 25 препаратам, которые безопасны для применения на животных и, в частности, на людях и/или млекопитающих, отличных от человека.

**[149]** Используемый в контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» охватывает любой из стандартных фармацевтических носителей, такой как фосфатно-солевой буферный раствор, вода и эмульсии, такие как эмульсия масло/вода или вода/масло, и различные типы 35 смачивающих агентов. Композиции также могут содержать стабилизаторы и

консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см. в Martin (1975) Remington's Pharm. Sci., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton).

**[150]** В некоторых аспектах фармацевтическая композиция по данному изобретению может содержать трис(гидроксиметил)аминометан (трис), хлорид магния, хлорид натрия, полоксамер, сахарозу или любую их комбинацию.

**[151]** В некоторых аспектах фармацевтическая композиция может содержать хлорид натрия, причем хлорид натрия присутствует в концентрации от около 100 мМ до около 500 мМ, или от около 200 мМ до около 400 мМ, или от около 300 мМ до около 400 мМ. В некоторых аспектах хлорид натрия может присутствовать в концентрации около 200 мМ.

**[152]** В некоторых аспектах фармацевтическая композиция может содержать трис, причем трис присутствует в концентрации от около 10 мМ до около 100 мМ, или от около 10 мМ до около 50 мМ, или от около 15 мМ до около 25 мМ. В некоторых аспектах трис может присутствовать в концентрации около 20 мМ.

**[153]** В некоторых аспектах фармацевтическая композиция может содержать хлорид магния, причем хлорид магния присутствует в концентрации от около 0,1 мМ до около 50 мМ, или от около 0,1 мМ до около 5 мМ, или от около 0,5 мМ до около 2,5 мМ. В некоторых аспектах хлорид магния может присутствовать в концентрации около 1 мМ.

**[154]** В некоторых аспектах фармацевтическая композиция может содержать полоксамер 188, причем полоксамер 188 присутствует в концентрации от около 0,001% до около 0,1% или от около 0,005% до около 0,05%. В некоторых аспектах полоксамер 188 может присутствовать в концентрации около 0,01%.

**[155]** В некоторых аспектах фармацевтическая композиция может содержать сахарозу, причем сахароза присутствует в концентрации от около 0,1% до около 10% или от около 0,5% до около 5%. В некоторых аспектах сахароза может присутствовать в концентрации около 1%.

**[156]** В некоторых аспектах фармацевтическая композиция может иметь уровень pH от около 6,5 до около 8,5, или от около 7,0 до около 8,0, или от около 7,4 до около 7,8. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция может иметь уровень pH около 7,6.

#### Способы использования композиций по данному изобретению

**[157]** В данном изобретении предложено применение описанной композиции или фармацевтической композиции для лечения заболевания или расстройства на уровне клетки, ткани, органа, организма животного или субъекта, как известно в данной области техники или как описано в данном документе, с

использованием описанных композиций и фармацевтических композиций, *например*, путем введения в или взаимодействия клетки, ткани, органа, животного или субъекта с терапевтически эффективным количеством композиции или фармацевтической композиции. В одном аспекте субъект представляет собой

5 млекопитающее. Предпочтительно субъект представляет собой человека. Термины «субъект» и «пациент» в контексте данного документа используются взаимозаменяемо. Например, термины «субъект» и «пациент» могут относиться к млекопитающему, включая приматов (например, человека), коров, овец, коз, лошадей, собак, кошек, кроликов, крыс, мышей и т.п.

10 **[158]** В данном изобретении предложены способы предотвращения или лечения расстройства, включающие, состоящие по существу или состоящие из введения субъекту терапевтически эффективного количества любого из векторов gAAV, вирусных векторов gAAV, композиций и/или фармацевтических композиций, описанных в данном документе.

15 **[159]** В некоторых аспектах в данном изобретении предложены способы предотвращения или лечения сердечной аритмии. В вариантах реализации данного изобретения предложен способ предотвращения или лечения аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (АКПЖ). В некоторых аспектах заболевание может представлять собой генетическое заболевание, связанное с геном RCP2. Как

20 будет понятно специалисту в данной области техники, АКПЖ или генетические нарушения, связанные с RCP2, могут вызывать у субъекта один или более симптомов, включая, но не ограничиваясь, сердечные аритмии, обмороки, учащенное сердцебиение, головокружение, одышку, боль в груди, утомляемость, постоянный кашель, преждевременные сокращения желудочков, желудочковую

25 тахикардию (ЖТ), сердечная недостаточность, сердечный фиброз и/или остановку сердца. В некоторых аспектах АКПЖ или генетическое заболевание, связанное с RCP2, связано с дисфункцией левого желудочка и/или фиброзно-жировой заменой миокарда, что приводит к желудочковым аритмиям и внезапной сердечной смерти.

**[160]** В некоторых аспектах АКПЖ характеризуется нарушениями сердечной

30 десмосомы. Используемый в контексте данного документа термин «десмосома» относится к специализированным клеточным структурам, предназначенным для межклеточной адгезии. Десмосомы представляют собой разновидность контактного комплекса, представляющего собой локализованные точечные слипания, хаотично расположенные на латеральных сторонах плазматических мембран. Десмосомы,

35 обнаруженные в сердечной ткани, называются сердечными десмосомами.

**[161]** В некоторых аспектах заболевание может представлять собой заболевание, которое характеризуется потерей функции по меньшей мере одной копии гена PKP2 в геноме субъекта. В некоторых аспектах заболевание может представлять собой заболевание, которое характеризуется снижением функции по меньшей мере одной копии гена PKP2 в геноме субъекта. В некоторых аспектах заболевание может представлять собой заболевание, которое характеризуется по меньшей мере одной мутацией в по меньшей мере одной копии гена PKP2 в геноме субъекта.

**[162]** Мутация гена PKP2 может представлять собой мутацию любого типа, известного в данной области техники. Неограничивающие примеры мутаций включают соматические мутации, однонуклеотидные варианты (SNV), нонсенс-мутации, вставки, делеции, дупликации, мутации сдвига рамки считывания, экспансии повторов, короткие вставки и делеции (INDEL), длинные INDEL, альтернативный сплайсинг, продукты альтернативного сплайсинга, измененную инициацию трансляции, продукты измененной инициации трансляции, протеомное расщепление, продукты протеомного расщепления.

**[163]** В некоторых аспектах заболевание может представлять собой заболевание, которое характеризуется снижением экспрессии гена PKP2 у субъекта по сравнению с контрольным субъектом, у которого нет заболевания. В некоторых аспектах снижение экспрессии может составлять по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 99%, или по меньшей мере около 100%.

**[164]** В некоторых аспектах заболевание может представлять собой заболевание, которое характеризуется снижением количества PKP2 у субъекта по сравнению с контрольным субъектом, у которого нет заболевания. В некоторых аспектах снижение количества PKP2 может составлять по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 99%, или по меньшей мере около 100%.

**[165]** В некоторых аспектах заболевание может представлять собой заболевание, которое характеризуется снижением активности PKP2 у субъекта по

сравнению с контрольным субъектом, у которого нет заболевания. В некоторых аспектах снижение активности РКР2 может составлять по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%,  
5 или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 99%, или по меньшей мере около 100%.

**[166]** В некоторых аспектах вектор гAAV или вирусный вектор гAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую РКР2, может  
10 стабилизировать сердечную десмосому у субъекта. В некоторых аспектах вектор гAAV или вирусный вектор гAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую РКР2, может предотвратить потерю белков межклеточных контактов кардиомиоцитов у субъекта. В некоторых аспектах вектор гAAV или вирусный вектор гAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты,  
15 кодирующую РКР2, может восстанавливать белки межклеточных контактов кардиомиоцитов у субъекта. В некоторых аспектах десмосомальные белки включают РКР2, десмоплакин (DSP), десмоглеин-2 (DSG2), плакоглобин (JUP). В некоторых аспектах белки межклеточных контактов включают коннексин 43 (CX43).

**[167]** В некоторых аспектах вектор гAAV или вирусный вектор гAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую РКР2, может  
20 улучшить электрическую и структурную целостность сердца у субъекта, страдающего АКПЖ. В некоторых аспектах вектор гAAV или вирусный вектор гAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую РКР2, может сохранять электрическую и структурную целостность сердца для предотвращения  
25 АКПЖ у субъекта.

**[168]** Субъект, подлежащий лечению с использованием способов, композиций, фармацевтических композиций, векторов гAAV или вирусных векторов гAAV по данному изобретению, может страдать любым из заболеваний и/или симптомов, описанных в данном документе.

**[169]** В некоторых аспектах возраст субъекта может составлять менее 0,5 лет, или менее 1 года, или менее 1,5 лет, или менее 2 лет, или менее 2,5 лет, или менее 3 лет, или менее 3,5 лет, или менее 4 лет, или менее 4,5 лет, или менее 5 лет, или менее 5,5 лет, или менее 6 лет, или менее 6,5 лет, или менее 7 лет, или менее 7,5 лет, или менее 8 лет, или менее 8,5 лет, или менее 9 лет, или менее 9,5  
35 лет, или менее 10 лет. В некоторых аспектах возраст субъекта может составлять менее 11 лет, менее 12 лет, менее 13 лет, менее 14 лет, менее 15 лет, менее 20

лет, менее 30 лет, менее 40 лет, менее 50 лет, менее 60 лет, менее 70 лет, менее 80 лет, менее 90 лет, менее 100 лет, менее 110 лет или менее 120 лет. В некоторых аспектах возраст субъекта может составлять менее 0,5 лет. В некоторых аспектах возраст субъекта может составлять менее 4 лет. В некоторых аспектах возраст субъекта может составлять менее 10 лет. В некоторых аспектах возраст субъекта может составлять менее 18 лет.

**[170]** Описанные в данном документе способы лечения и предотвращения заболевания можно комбинировать с соответствующими диагностическими способами для выявления и отбора пациентов для терапии или профилактики.

10 **[171]** В данном изобретении предложены способы повышения уровня белка в клетке-хозяине, включающие взаимодействие клетки-хозяина с любым из вирусных векторов гAAV, описанных в данном документе, причем вирусные векторы гAAV содержат любой из векторов гAAV, описанных в данном документе, содержащих молекулу трангенной нуклеиновой кислоты, кодирующую белок. В  
15 некоторых аспектах белок представляет собой терапевтический белок. В некоторых аспектах клетка-хозяин может быть *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. В некоторых аспектах клетка-хозяин получена от субъекта. В некоторых аспектах субъект страдает расстройством, которое приводит к снижению уровня и/или функциональности белка по сравнению с уровнем и/или функциональностью белка у нормального субъекта.

20 **[172]** В некоторых аспектах уровень белка PKP2 повышается до уровня, равного или превышающего уровень эндогенной экспрессии PKP2. В некоторых аспектах уровень белка PKP2 повышается по меньшей мере на около 1%, по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по  
25 меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на  
30 около 100%, по меньшей мере на около 105%, по меньшей мере на около 110%, по меньшей мере на около 120%, по меньшей мере на около 130%, по меньшей мере на около 140%, по меньшей мере на около 150%, по меньшей мере на около 200%, по меньшей мере на около 300%, по меньшей мере на около 400% или по меньшей мере на около 500% относительно уровня экспрессии PKP2 до начала лечения.

35 **[173]** В данном изобретении предложены способы введения интересующего гена в клетку у субъекта, включающие взаимодействие клетки с эффективным



количеством любого из вирусных векторов гAAV, описанных в данном документе, причем вирусные векторы гAAV содержат любой из векторов гAAV, описанных в данном документе, содержащих представляющий интерес ген.

**[174]** В некоторых аспектах в способах по данному изобретению субъекту также может быть назначена профилактическая схема лечения иммунодепрессантами в дополнение к введению вектора гAAV или вирусного вектора гAAV по данному изобретению. В некоторых аспектах схема лечения иммунодепрессантами может включать введение по меньшей мере одного иммунодепрессивного терапевтического средства. Неограничивающие примеры иммунодепрессантной терапии включают, но не ограничиваются, сиролимус (рапамицин), ацетаминофен, дифенгидрамин, в/в метилпреднизолон, преднизолон или любую их комбинацию. Иммунодепрессантное терапевтическое средство можно вводить до дня введения вектора гAAV и/или вирусного вектора гAAV, в тот же день, что и введение вектора гAAV и/или вирусного вектора гAAV, или в любой день после введения вектора гAAV и/или вирусного вектора гAAV.

**[175]** «Субъект» при диагностике или лечении представляет собой клетку или животное, такое как млекопитающее или человек. Субъект не ограничивается конкретным видом и включает животных, отличных от человека, подлежащих диагностированию или лечению, а также субъектов, подвергшихся инфекциям или применяемых в качестве животных моделей, включая, но не ограничиваясь, виды обезьян, мышей, крыс, собак или зайцеобразных, а также другие виды сельскохозяйственных, спортивных или домашних животных. В некоторых аспектах субъект представляет собой человека.

**[176]** В контексте данного документа «лечение» или «терапия» заболевания у субъекта относится к (1) предотвращению появления симптомов заболевания у субъекта, который к нему предрасположен, но у которого еще не проявляются симптомы заболевания; (2) ингибированию заболевания или прекращению его развития; или (3) уменьшению интенсивности или регрессии заболевания или симптомов заболевания. Как известно в данной области техники, термин «лечение» представляет собой подход для получения благоприятных или необходимых результатов, включая клинические результаты. В целях данной технологии благоприятные или необходимые результаты могут включать, но не ограничиваются, одно или более из облегчения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов, уменьшения степени патологического состояния (включая заболевание), стабилизации (т. е. отсутствие ухудшения) патологического состояния (включая заболевание), задержки или замедления патологического

состояния (включая заболевание), прогрессирования, уменьшения степени или облегчения патологического состояния (включая заболевание), состояние ремиссии (частичной или полной), выявляемые или невыявляемые.

**[177]** В контексте данного документа, если не указано иное, термины «предотвращать», «предотвращение» и «профилактика» относятся к предотвращению возникновения, рецидива или распространения заболевания или расстройства, или одного или более их симптомов. В некоторых вариантах реализации данного изобретения термины относятся к лечению или введению соединения или лекарственной формы, предложенных в данном документе, с одним или более другими активными агентами или без них до появления симптомов, особенно у субъектов с риском возникновения заболевания или расстройства, представленного в данном документе. Эти термины охватывают подавление или уменьшение симптомов конкретного заболевания. В некоторых вариантах реализации данного изобретения субъекты с семейным анамнезом заболевания являются потенциальными кандидатами для профилактических схем лечения. В некоторых вариантах реализации данного изобретения субъекты, у которых в анамнезе наблюдались повторяющиеся симптомы, также являются потенциальными кандидатами для профилактического лечения. В этом отношении термин «профилактика» может использоваться взаимозаменяемо с термином «профилактическое лечение».

**[178]** В контексте данного документа и, если не указано иное, «профилактически эффективное количество» соединения представляет собой количество, достаточное для предотвращения заболевания или расстройства или предотвращения его рецидива. Профилактически эффективное количество соединения означает количество терапевтического агента, отдельно или в комбинации с одним или более другими агентами, которое обеспечивает профилактический эффект в предотвращении заболевания. Термин «профилактически эффективное количество» может охватывать количество, которое увеличивает общую профилактическую эффективность или улучшает действие другого профилактического агента.

**[179]** Используемый в контексте данного документа термин «эффективное количество» означает количество, достаточное для достижения желаемого эффекта. В контексте терапевтического или профилактического применения эффективное количество будет зависеть от типа и тяжести рассматриваемого состояния и характеристик отдельного субъекта, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, масса тела и переносимость фармацевтических

композиций. В контексте генной терапии эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для восстановления части или полной функции гена, недостаточного у субъекта. В некоторых аспектах эффективное количество вирусного вектора gAAV представляет собой количество, достаточное для того, чтобы привести к экспрессии гена и продукции РКР2 у субъекта. В некоторых аспектах эффективное количество представляет собой количество, необходимое для увеличения метаболизма галактозы у субъекта, нуждающегося в этом. Специалист в данной области техники сможет определить подходящие количества в зависимости от этих и других факторов.

10 **[180]** В некоторых аспектах эффективное количество будет зависеть от объема и характера рассматриваемого способа применения. Оно также будет зависеть от характера и чувствительности объекта исследования и используемых способов. Специалист в данной области техники сможет определить эффективное количество на основании этих и других обстоятельств. Эффективное количество может включать, состоять по существу или состоять из одного или более введенных композиции в зависимости от варианта реализации данного изобретения.

**[181]** Используемый в контексте данного документа термин «вводить» или «введение» означает доставку вещества субъекту, такому как животное или человек. Введение можно осуществлять в виде одной дозы, непрерывно или периодически на протяжении всего курса лечения. Способы определения наиболее эффективного способа и дозы введения известны специалистам в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от композиции, используемой для терапии, цели терапии, а также возраста, состояния здоровья или пола субъекта, проходящего лечение. Однократное или многократное введение может быть реализовано с уровнем дозы и способом введения, выбранными лечащим врачом или, в случае домашних и других животных, лечащим ветеринаром.

**[182]** Способы определения наиболее эффективного способа и дозы введения известны специалистам в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от композиции, используемой для терапии, цели терапии и субъекта, проходящего лечение. Однократное или многократное введение может быть реализовано с уровнем дозы и способом введения, выбранными лечащим врачом. Следует отметить, что дозировка может зависеть от способа введения. Подходящие лекарственные составы и способы введения агентов известны в данной области техники. Неограничивающие примеры таких подходящих доз могут представлять собой дозы, составляющие от  $10^9$  векторных геномов до  $10^{17}$  векторных геномов на одно введение.

**[183]** В некоторых аспектах способов, описанных в данном документе, количество вирусных частиц (например, вирусных векторов гAAV), вводимых субъекту, варьируется от около  $10^9$  до около  $10^{17}$ . В некоторых аспектах субъекту вводят от около  $10^{10}$  до около  $10^{12}$ , от около  $10^{11}$  до около  $10^{13}$ , от около  $10^{11}$  до около  $10^{12}$ , от около  $10^{11}$  до около  $10^{14}$ , от около  $10^{12}$  до около  $10^{16}$ , от около  $10^{13}$  до около  $10^{16}$ , от около  $10^{14}$  до около  $10^{15}$ , от около  $5 \times 10^{11}$  до около  $5 \times 10^{12}$  или от около  $10^{12}$  до около  $10^{13}$  вирусных частиц.

**[184]** В некоторых аспектах способов, описанных в данном документе, количество вирусных частиц (например, вирусных векторов гAAV), вводимых субъекту, составляет по меньшей мере около  $10^{10}$ , или по меньшей мере около  $10^{11}$ , или по меньшей мере около  $10^{12}$ , или по меньшей мере около  $10^{13}$ , или по меньшей мере около  $10^{14}$ , или по меньшей мере около  $10^{15}$ , или по меньшей мере около  $10^{16}$ , или по меньшей мере около  $10^{17}$  вирусных частиц.

**[185]** В некоторых аспектах векторы гAAV, вирусные векторы гAAV, композиции и/или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, вводят субъекту в дозе в диапазоне от около  $1,0 \times 10^{11}$  векторных геномов (вг)/кг до около  $1,0 \times 10^{15}$  вг/кг. В некоторых аспектах вводимая доза составляет от около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $1,0 \times 10^{14}$  вг/кг. В некоторых аспектах вводимая доза составляет от около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $1,0 \times 10^{13}$  вг/кг. В некоторых аспектах доза составляет около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $1,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $2,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $2,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $3,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $4,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $4,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $5,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $5,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $6,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $6,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $7,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $7,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $8,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $8,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $9,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $9,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $1,0 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $1,5 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $2,0 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $2,5 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $3,0 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $4,0 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $4,5 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $5,0 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $5,5 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $6,0 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $6,5 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $7,0 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $7,5 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $8,0 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $8,5 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $9,0 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $9,5 \times 10^{13}$  вг/кг, около  $8,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $8,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $9,0 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $9,5 \times 10^{12}$  вг/кг, около  $1,0 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $1,5 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $2,0 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $2,5 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $3,0 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $4,0 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $4,5 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $5,0 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $5,5 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $6,0 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $6,5 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $7,0 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $7,5 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $8,0 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $8,5 \times 10^{14}$  вг/кг, около  $9,0 \times 10^{14}$  вг/кг или около  $9,5 \times 10^{14}$  вг/кг.

**[186]** В некоторых аспектах количества вирусных частиц в композиции, фармацевтической композиции или количество вирусных частиц, введенных

пациенту, можно рассчитать на основе процентного содержания вирусных частиц, которые, как ожидается, содержат вирусные геномы.

**[187]** В некоторых аспектах вирусные векторы гAAV по данному изобретению вводят субъекту путем внутривенного, интратекального, интрацеребрального, внутрижелудочкового, интраназального, интратрахеального, внутриушного, внутриглазного или окологлазного, перорального, ректального, чресслизистого, ингаляционного, чрескожного, парентерального, подкожного, внутрикожного, внутримышечного, интрацистернального, интраневрального, внутриплеврального, местного, внутрилимфатического, интрацистернального введения; такое введение также может быть внутриартериальным, внутрисердечным, субвентрикулярным, эпидуральным, внутримозговым, интрацеребровентрикулярным, субретинальным, интравитреальным, внутрисуставным, внутрибрюшинным, внутриматочным, внутринервным или любой их комбинацией. В некоторых аспектах вирусные частицы доставляются в желаемую ткань-мишень, например, но не ограничиваясь, в ткани сердца. В некоторых аспектах доставка вирусных частиц является системной. Интрацистернальный путь введения предполагает введение препарата непосредственно в спинномозговую жидкость желудочков головного мозга. Это может быть выполнено путем прямой инъекции в мостомозжечковую цистерну или путем использования пожизненно установленной трубки. В некоторых аспектах вирусные векторы гAAV по данному изобретению вводятся парентерально. В некоторых аспектах вирусные векторы гAAV по данному изобретению вводятся внутрибрюшинно. В некоторых аспектах вирусные векторы гAAV по данному изобретению вводятся внутривенно.

**[188]** В некоторых аспектах вирусные векторы гAAV по данному изобретению восстанавливают дефицит гена у субъекта. В некоторых аспектах соотношение восстановленного целевого полинуклеотида или полипептида к невозстановленному целевому полинуклеотиду или полипептиду у успешно подвергшихся лечению клетке, ткани, органе или субъекте составляет по меньшей мере около 1,5:1, около 2:1, около 3:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1, около 10:1, около 20:1, около 50:1, около 100:1, около 1000:1, около 10000:1, около 100000:1 или около 1000000:1. Количество или соотношение восстановленного целевого полинуклеотида или полипептида можно определить любым способом, известным в данной области техники, включая, но не ограничиваясь, вестерн-блоттинг, нозерн-блоттинг, Саузерн-блоттинг, ПЦР, секвенирование, масс-спектрометрию, проточную цитометрию,

иммуногистохимический анализ, иммунофлуоресцентный анализ, флуоресцентную гибридизацию in situ, секвенирование нового поколения, иммуноблоттинг и ИФА.

**[189]** Введение векторов gAAV, вирусных векторов gAAV, композиций или фармацевтических композиций по данному изобретению можно осуществлять в виде одной дозы, непрерывно или периодически на протяжении всего курса лечения. В некоторых аспектах векторы gAAV, вирусные векторы gAAV, композиции или фармацевтические композиции по данному изобретению вводятся парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации. В некоторых аспектах векторы gAAV, вирусные векторы gAAV, композиции или фармацевтические композиции по данному изобретению вводятся многократно. В некоторых аспектах векторы gAAV, вирусные векторы gAAV, композиции или фармацевтические композиции по данному изобретению вводятся в виде однократной дозы.

**[190]** В некоторых аспектах вирусные векторы gAAV по данному изобретению демонстрируют повышенный тропизм к ткани сердца.

**[191]** Способы производства

**[192]** Для получения вирусных векторов gAAV по данному изобретению можно использовать различные подходы. В некоторых аспектах упаковка достигается за счет использования вируса-помощника или плазмиды-помощника и клеточной линии. Вирус-помощник или плазида-помощник содержит элементы и последовательности, которые облегчают продукцию вирусного вектора. В другом аспекте плазида-помощник стабильно встроена в геном пакующей клеточной линии, так что пакующая клеточная линия не требует дополнительной трансфекции плазмидой-помощником.

**[193]** В некоторых аспектах вирусные векторы gAAV по данному изобретению могут быть получены путем бакуловирусной инфекции клеток насекомых.

**[194]** В некоторых аспектах клетка представляет собой линию пакующих клеток или клеток-помощников. В некоторых аспектах линия клеток-помощников представляет собой эукариотическую клетку; например, клетку НЕК 293 или клетку 293Т. В некоторых аспектах клетка-помощник представляет собой дрожжевую клетку или клетку насекомого.

**[195]** В некоторых аспектах клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-активатор устойчивости к тетрациклину; и промотор, который регулирует экспрессию белка-активатора устойчивости к тетрациклину. В некоторых аспектах промотор, который регулирует экспрессию белка-активатора устойчивости к тетрациклину, является конститутивным промотором. В некоторых аспектах

промотор представляет собой промотор фосфоглицераткиназы (PGK) или промотор CMV.

**[196]** Плаزمид-помощник может содержать, например, по меньшей мере одну вирусную ДНК-последовательность-помощник, полученную из вирусного генома с дефектом по репликации, кодирующую в транс-трансформации все белки вириона, необходимые для упаковки AAV с дефектом по репликации, и для продукции вирионных белков, способных упаковывать AAV с дефектом по репликации в высоком титре без образования AAV, способного реплицироваться.

**[197]** Плазмиды-помощники для упаковки AAV известны в данной области техники, см., например, публ. патента США № 2004/0235174 A1, включенную в данный документ посредством ссылки. Как указано в данном документе, плазмид-помощник AAV может содержать в качестве последовательностей ДНК вируса-помощника, например, но не ограничиваясь, гены Ad5 E2A, E4 и VA, контролируемые их соответствующими исходными промоторами или гетерологичными промоторами. Плазмиды-помощники AAV могут дополнительно содержать кассету экспрессии для экспрессии маркерного белка, такого как флуоресцентный белок, чтобы обеспечить простое обнаружение трансфекции желаемой клетки-мишени.

**[198]** В данном изобретении предложены способы получения вирусных векторов gAAV, включающие трансфекцию линии пакующих клеток с использованием любой из плазмид-помощников AAV, описанных в данном документе; и любого из векторов gAAV, описанных в данном документе. В некоторых аспектах плазмид-помощник AAV и вектор gAAV совместно трансфецированы в линию пакующих клеток. В некоторых аспектах клеточная линия представляет собой клеточную линию млекопитающих, например, клеточную линию эмбриональной почки человека (HEK) 293. В данном изобретении предложены клетки, содержащие любой из векторов gAAV и/или вирусных векторов gAAV, описанных в данном документе.

**[199]** Используемый в контексте данного документа термин «помощник» по отношению к вирусу или плазмиде относится к вирусу или плазмиде, используемым для обеспечения дополнительных компонентов, необходимых для репликации и упаковки любого из векторов gAAV, описанных в данном документе. Компоненты, кодируемые вирусом-помощником, могут включать любые гены, необходимые для сборки, капсидирования, репликации и/или упаковки вириона. Например, вирус- или плазмид-помощник могут кодировать необходимые ферменты для репликации вирусного генома. Неограничивающие примеры вирусов- и плазмид-помощников,

подходящих для использования с конструкциями AAV, включают rHELP (плазмиду), аденовирус (вирус) или герпесвирус (вирус). В некоторых аспектах плазида rHELP может представлять собой плазмиду rHELPK, в которой кассета экспрессии гена устойчивости к ампициллину заменена кассетой экспрессии гена устойчивости к канамицину.

**[200]** В контексте данного документа «пакующая клетка» (или «клетка-помощник») представляет собой клетку, используемую для получения вирусных векторов. Для получения рекомбинантных вирусных векторов AAV требуются белки Rep и Cap, представленные в *транс-положении*, а также последовательности генов аденовируса, которые помогают AAV реплицироваться. В некоторых аспектах пакующие клетки/клетки-помощники содержат плазмиду, стабильно встроенную в геном клетки. В других аспектах пакующая клетка может быть временно трансфицирована. Обычно пакующая клетка представляет собой эукариотическую клетку, такую как клетка млекопитающего или клетка насекомого.

#### 15 Наборы

**[201]** Выделенные полинуклеотиды, векторы gAAV, вирусные векторы gAAV, композиции и/или фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть собраны в виде фармацевтических, диагностических или исследовательских наборов для облегчения их использования в терапевтических, диагностических или исследовательских целях. В некоторых аспектах наборы по данному изобретению содержат любой из выделенных полинуклеотидов, векторов gAAV, вирусных векторов gAAV, композиций, фармацевтических композиций, клеток-хозяев, выделенных тканей, как описано в данном документе.

**[202]** В некоторых аспектах набор дополнительно содержит инструкции по применению. В частности, такие наборы могут содержать один или более агентов, описанных в данном документе, вместе с инструкциями, в которых описано предполагаемое применение и правильное использование этих агентов. В некоторых аспектах набор может содержать инструкции по смешиванию одного или более компонентов набора и/или по выделению и смешиванию образца и применению в отношении субъекта. В некоторых аспектах агенты в наборе находятся в фармацевтическом составе и в дозировке, подходящих для конкретного применения и для способа введения агентов. Наборы для исследовательских целей могут содержать компоненты в соответствующих концентрациях или количествах для проведения различных экспериментов.

**[203]** Набор может быть разработан для облегчения применения описанных в данном документе способов и может иметь разные формы. Каждая из композиций



набора, в зависимости от ситуации, может быть предоставлена в жидкой форме (например, в растворе) или в твердой форме (например, в виде сухого порошка). В определенных случаях некоторые из композиций могут требовать составления или иной обработки (например, до активной формы), например, путем добавления  
5 подходящего растворителя или других веществ (например, воды или среды для клеточного культивирования), которые могут быть либо предоставлены в наборе либо нет. В некоторых аспектах композиции могут быть предоставлены в консервирующем растворе (например, растворе для криоконсервации). Неограничивающие примеры решений для консервации включают ДМСО,  
10 параформальдегид и CryoStor® (Stem Cell Technologies, Ванкувер, Канада). В некоторых аспектах консервирующий раствор содержит некоторое количество ингибиторов металлопротеаз.

**[204]** В некоторых аспектах набор содержит любой один или более компонентов, описанных в данном документе, в одной или более емкости. Таким образом, в некоторых аспектах набор может содержать контейнер с описанными в  
15 данном документе агентами. Агенты могут находиться в форме жидкости, геля или твердого вещества (порошка). Агенты могут быть приготовлены в стерильных условиях, упакованы в шприцы и транспортированы в охлажденном виде. В альтернативном варианте они могут находиться во флаконе или другой ёмкости для хранения. Во второй емкости могут содержаться стерильно приготовленные другие агенты. В альтернативном варианте набор может содержать активные агенты, предварительно смешанные и транспортируемые в шприце, флаконе, тубике или другой емкости. Набор может содержать один или более, или все компоненты, необходимые для введения агентов субъекту, такие как шприц, устройства для  
20 местного применения или игла и пакет для в/в вливания.

#### Дополнительные определения

**[205]** Если из контекста не следует иное, явным образом подразумевается, что различные признаки изобретения, описанные в данном документе, можно использовать в любой комбинации. Кроме того, в изобретении также  
30 предусмотрено, что в некоторых аспектах любые признак или комбинация признаков, приведенные в данном документе, могут быть исключены или опущены. В качестве иллюстрации, если в тексте указано, что комплекс содержит компоненты А, В и С, явным образом подразумевается, что любой из А, В или С или их комбинация могут быть опущены и исключены по отдельности или в любой  
35 комбинации.

**[206]** Если явным образом не указано иное, подразумевается, что все конкретные аспекты, признаки и термины включают как указанные аспект, признак или термин, так и их биологические эквиваленты.

**[207]** При практической реализации представленной технологии будут  
5 применять, если не указано иное, традиционные способы органической химии, фармакологии, иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и рекомбинантных ДНК, которые находятся в рамках данной области техники. Смотрите, например, Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition (1989); *Current Protocols In Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.):  
10 *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, a Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (Rl. Freshney, ed. (1987)).

**[208]** Используемый в контексте данного документа термин «содержащий»  
15 означает, что композиции и способы включают перечисленные элементы, но не исключают другие. Используемую в контексте данного документа переходную фразу «состоящий по существу из» (и грамматические варианты) следует интерпретировать как охватывающую перечисленные материалы или этапы, а также те, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики  
20 изложенного варианта реализации данного изобретения. Таким образом, термин «состоящий по существу из», используемый в контексте данного документа, не следует интерпретировать как эквивалент слова «содержащий». Термин «состоящий из» означает исключение более чем следовых элементов других ингредиентов и существенных стадий способа введения композиций по данному  
25 изобретению. Аспекты, определяемые каждым из этих переходных терминов, входят в объем данного изобретения. В каждом случае в данном документе любой из терминов «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из» может быть заменен любым из двух других терминов, сохраняя при этом их обычные значения.

**[209]** При представлении элементов данного изобретения или его  
30 предпочтительных вариантов реализации, существительные в единственном и множественном числе предназначены для обозначения существования одного или более элементов. Термины «содержащий», «включающий» и «имеющий» предназначены для включения и означают, что могут быть дополнительные  
35 элементы, отличные от перечисленных.

**[210]** Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено исключительно для удобства и краткости, и не должно быть истолковано как жесткое ограничение объема данного изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретным образом раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в данном диапазоне. Например, описание диапазона, такое как «от 1 до 6», должно рассматриваться как содержащее конкретным образом раскрытые поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в данном диапазоне, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применимо независимо от широты диапазона. Значения или диапазоны также могут быть выражены как «около», от «около» одного конкретного значения и/или до «около» другого конкретного значения. Если выражаются такие значения или диапазоны, другие описанные варианты реализации данного изобретения включают указанное конкретное значение, от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогично, когда значения выражаются как приближения с использованием предшествующего «приблизительно», следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант реализации данного изобретения. Также следует понимать, что существует ряд значений, описанных в данном документе, и что каждое значение также раскрывается в данном документе как «около» этого конкретного значения в дополнение к самому значению. В вариантах реализации данного изобретения «около» может использоваться для обозначения, например, в пределах 10% заявленного значения, в пределах 5% заявленного значения или в пределах 2% заявленного значения.

**[211]** Все численные обозначения, например, уровня pH, температуры, времени, концентрации и молекулярной массы, включая диапазоны, являются приблизительными и варьируются в пределах (+) или (-) 1,0 или 0,1, или, альтернативно, путем вариации +/- 15%, 10%, 5%, 2%. Следует понимать, что, хотя это не всегда указано в явном виде, всем числовым обозначениям предшествует термин «около». Также следует понимать, даже если это не всегда указано в явном виде, что реагенты, описанные в данном документе, являются иллюстративными, и что их эквиваленты известны в данной области техники. Подразумевается, что термин «около», используемый в контексте данного документа в отношении измеримой величины, такой как количество или концентрация и т.п., охватывает колебания в 20%, 10%, 5%, 1%, 0,5% или даже 0,1% от указанной величины.

**[212]** Термины «приемлемый», «эффективный» или «подходящий», когда они используются для описания выбора любых компонентов, диапазонов,

дозированных форм и т.д., описанных в данном документе, означают, что указанный компонент, диапазон, дозированная форма и т.д. подходят для описанной цели данного изобретения.

**[213]** Также в контексте данного документа термин «и/или» относится к и включает каждую и все возможные комбинации одного или более связанных перечисляемых элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в качестве альтернативного варианта («или»).

**[214]** Термин «комбинация» относится либо к фиксированной комбинации в одной стандартной лекарственной форме, либо к набору частей для комбинированного введения, в котором одно или более активных соединений и партнер по комбинации (например, другое лекарственное средство, как описано ниже, также называемое «терапевтический агент» или «соагент») можно вводить независимо одновременно или отдельно в течение определенных интервалов времени. В некоторых обстоятельствах партнеры по комбинации демонстрируют кооперативный, например синергетический эффект. Термины «совместное введение» или «комбинированное введение» и т.п., используемые в контексте данного документа, означают введение выбранного партнера по комбинации одному субъекту, нуждающемуся в этом (например, пациенту), и предназначены для включения в схему лечения в при этом агенты не обязательно вводятся одним и тем же путем введения или в одно и то же время.

**[215]** Используемый в контексте данного документа термин «фармацевтическая комбинация» означает продукт, который получается в результате смешивания или комбинирования более чем одного активного ингредиента и включает как фиксированные, так и нефиксированные комбинации активных ингредиентов. Термин «фиксированная комбинация» означает, что активные ингредиенты, например, соединение и партнер по комбинации, вводятся пациенту одновременно в форме единого препарата или дозы. Термин «нефиксированная комбинация» означает, что активные ингредиенты, например, соединение и партнер по комбинации, как отдельные препараты одновременно, параллельно или последовательно, без каких-либо конкретных ограничений по времени, при этом такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также применимо к коктейльной терапии, например, введению трех или более активных ингредиентов.

**[216]** Если не указано иное, термин «клетка-хозяин» включает эукариотическую клетку-хозяина, включая, например, клетки грибов, дрожжевые клетки, клетки высших растений, клетки насекомых и клетки млекопитающих.

Неограничивающие примеры эукариотических клеток-хозяев включают клетки обезьян, крупного рогатого скота, свиней, мышей, крыс, птиц, рептилий и человека, например, клетки НЕК293 и клетки 293Т.

**[217]** Используемый в контексте данного изобретения термин «выделенный» относится к молекулам или биологическим веществам или компонентам клеток, которые по существу не содержат других веществ.

**[218]** «Последовательность» нуклеиновой кислоты относится к порядку и идентификации нуклеотидов в нуклеиновой кислоте. Последовательность обычно читается в направлении от 5'- к 3'-концу. Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновой кислоты или полипептида относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, например, при измерении с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательностей, доступных специалистам, или путем визуального осмотра. Иллюстративными алгоритмами, подходящими для определения процента идентичности и сходства последовательностей, являются программы BLAST, которые описаны, например, в Altschul et al. (1990) "Basic local alignment search tool" J. Mol. Biol. 215:403-410, Gish et al. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" Nature Genet. 3:266-272, Madden et al. (1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 266:131-141, Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 и Zhang et al. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation" Genome Res. 7:649-656, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Многие другие алгоритмы оптимального выравнивания также известны в данной области техники и необязательно используются для определения процента идентичности последовательностей.

**[219]** В контексте данного документа термины «последовательность нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо для обозначения полимерной формы нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает, но не ограничивается, одноцепочечную, двухцепочечную или многоцепочечную ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий, состоящий по существу или состоящий из пуриновых и пиримидиновых оснований или других

встречающихся в природе, химически или биохимически модифицированных, не встречающихся в природе или дериватизированных нуклеотидных оснований.

**[220]** «Нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты»

относится к мультимерному соединению, содержащему два или более ковалентно связанных нуклеозидов или аналогов нуклеозидов, имеющих азотистые гетероциклические основания, или аналогов оснований, при этом нуклеозиды связаны друг с другом фосфодиэфирными связями или другими связями с образованием полинуклеотида. Нуклеиновые кислоты включают РНК, ДНК или химерные ДНК-РНК-полимеры или олигонуклеотиды и их аналоги. «Остов» нуклеиновой кислоты может состоять из множества связей, включая одну или более связей сахар-фосфодиэфир, связи пептид-нуклеиновая кислота, фосфоротиоатные связи, метилфосфонатные связи или их комбинации. Сахарные фрагменты нуклеиновой кислоты могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или аналогичные соединения, имеющие известные замены (например, замены 2'-метокси и замены 2'-галогенида). Азотистые основания могут представлять собой обычные основания (А, G, C, T, U) или их аналоги (например, инозин, 5-метилизоцитозин, изогуанин). Нуклеиновая кислота может содержать только обычные сахара, основания и связи, обнаруженные в РНК и ДНК, или может включать обычные компоненты и замены (например, обычные основания, связанные 2'-метокси-остовом, или нуклеиновую кислоту, включающую смесь обычных оснований и один или более аналогов оснований). Нуклеиновые кислоты могут включать «заблокированные нуклеиновые кислоты» (ЗНК), в которых один или более нуклеотидных мономеров имеют бициклическую фуранозную единицу, заблокированную в конформации сахара, имитирующей РНК, что увеличивает аффинность гибридизации к комплементарным последовательностям в одноцепочечной РНК (оцРНК), одноцепочечной ДНК (оцДНК) или двухцепочечной ДНК (дцДНК). Нуклеиновые кислоты могут содержать модифицированные основания для изменения функции или поведения нуклеиновой кислоты (например, добавление 3'-концевого дидезоксинуклеотида для блокирования добавления дополнительных нуклеотидов к нуклеиновой кислоте). Синтетические способы получения нуклеиновых кислот *in vitro* хорошо известны в данной области техники, хотя нуклеиновые кислоты можно очищать из природных источников с использованием обычных способов. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными и двухцепочечными.

**[221]** «Ген» относится к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере одну открытую рамку считывания (ORF), которая способна кодировать конкретный

полипептид или белок. «Генный продукт» или, альтернативно, «продукт экспрессии гена» относится к аминокислотной последовательности (например, пептиду или полипептиду), образующейся при транскрипции и трансляции гена.

**[222]** Нуклеиновая кислота обычно является одноцепочечной или  
 5 двухцепочечной и обычно содержит фосфодиэфирные связи, хотя в некоторых  
 случаях в контексте данного документа, включены аналоги нуклеиновой кислоты,  
 которые могут иметь альтернативные остовы, включая, например, но не  
 ограничиваясь, фосфорамид (Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925,  
 включая использованные в публикации ссылки на литературные источники;  
 10 Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579;  
 Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805;  
 Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; и Pauwels et al. (1986) *Chemica*  
*Scripta* 26: 1419, каждая из которых включена в данный документ посредством  
 ссылки), фосфоротиоат (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; и пат. США №  
 15 5,644,048, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки),  
 фосфородитиоат (Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321, которая включена в  
 данный документ посредством ссылки), О-метилфосфорамидитные связи (см.  
 Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press  
 (1992), которая включена в данный документ посредством ссылки), а также остовы и  
 20 связи пептидных нуклеиновых кислот (см. Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895;  
 Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008; Nielsen (1993) *Nature* 365:566; и  
 Carlsson et al. (1996) *Nature* 380:207, каждая из которых включена в данный  
 документ посредством ссылки). Другие аналоги нуклеиновых кислот включают  
 кислоты с положительно заряженным остовом (Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad.*  
 25 *Sci. USA* 92:6097, которая включена в данный документ посредством ссылки),  
 неонные остовы (пат. США. № 5,386,023, № 5,637,684, № 5,602,240, № 5,216,141 и  
 № 4,469,863; *Angew (1991) Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger et al. (1988) *J.*  
*Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597;  
 Chapters 2 and 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense*  
 30 *Research"*, Ed. Y. S. Sanghvi and P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994) *Bioorganic &*  
*Medicinal Chem: Lett.* 4: 395; Jeffs et al. (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; и  
*Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996), каждая из которых включена в данный документ  
 посредством ссылки) и нерибозные остовы, включая те, которые описаны в пат.  
 США № № 5,235,033 и № 5,034,506, а также Главах 6 и 7, *ASC Symposium Series*  
 35 *580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y. S. Sanghvi and P. Dan  
 Cook, которые включены в данный документ посредством ссылки. Нуклеиновые

кислоты, содержащие один или более карбоциклических сахаров, также включены в определение нуклеиновых кислот (см. Jenkins et al. (1995) Chem. Soc. Rev. pp 169-176, которая включена в данный документ посредством ссылки. Несколько аналогов нуклеиновых кислот также описаны, например, в Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 p. 35, которая включена в данный документ посредством ссылки. Эти модификации рибозо-фосфатного остова могут быть выполнены для облегчения добавления дополнительных фрагментов, таких как метки, или для изменения стабильности и периода полураспада таких молекул в физиологических средах.

**[223]** В дополнение к встречающимся в природе гетероциклическим основаниям, которые обычно встречаются в нуклеиновых кислотах (например, аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил), аналоги нуклеиновых кислот также включают те, которые имеют не встречающиеся в природе гетероциклические или модифицированные основания, многие из которых описаны или иным образом упомянуты в данном документе. В частности, многие не встречающиеся в природе основания описаны дополнительно, например, в Seela et al. (1991) *Helv. Chim. Acta* 74:1790, Grein et al. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:971-976, и Seela et al. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Для дополнительной иллюстрации: некоторые основания, используемые в нуклеотидах и действующие как модификаторы температуры плавления (T<sub>0</sub>), могут быть включены по выбору. Например, некоторые из них включают 7-дезапурины (например, 7-дезагуанин, 7-дезааденин и т.д.), пиразоло[3,4-d]пиримидины, пропинил-dN (например, пропинил-dU, пропинил-dC и т.д.), и тому подобное. См., например, пат. США № 5,990,303, озаглавленный «SYNTHESIS OF 7-DEAZA-2'-DEOXYGUANOSINE NUCLEOTIDES» («СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДОВ 7-ДЕАЗА-2'-ДЕОКСИГУАНОЗИНА»), выданный 23 ноября 1999 г. Seela, который включен в данный документ посредством ссылки. Другие типичные гетероциклические основания включают, например, гипоксантин, инозин, ксантин; 8-азапроизводные 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина, 2-амино-6-хлорпурина, гипоксантина, инозина и ксантина; 7-деаза-8-аза производные аденина, гуанина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина, 2-амино-6-хлорпурина, гипоксантина, инозина и ксантина; 6-азацитозин; 5-фторцитозин; 5-хлорцитозин; 5-йодцитозин; 5-бромцитозин; 5-метилцитозин; 5-пропинилцитозин; 5-бромвинилурацил; 5-фторурацил; 5-хлорурацил; 5-йодурацил; 5-бромуррацил; 5-трифторметилурацил; 5-метоксиметилурацил; 5-этинилуррацил; 5-пропинилурацил и т.п.



**[224]** Примеры модифицированных оснований и нуклеотидов также описаны, например, в пат. США № 5,484,908, озаглавленный «OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING 5-PROPYNYL

**[225]** PYRIMIDINES» («ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ 5-ПРОПИНИЛПИРИМИДИНЫ»), выданный 16 января 1996 г. Froehler et al., пат. США № 5,645,985, озаглавленный «ENHANCED TRIPLE-HELIX AND DOUBLE-HELIX FORMATION OF OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINS» («УЛУЧШЕННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ТРОЙНОЙ И ДВОЙНОЙ СПИРАЛЕЙ С ОЛИГОМЕРАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПИРИМИДИНЫ»), выданный 8 июля 1997 г. Froehler et al., пат. США № 5,830,653, озаглавленный «METHODS OF USING OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINES» («СПОСОБЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОЛИГОМЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПИРИМИДИНЫ»), выданный 3 ноября 1998 г. Froehler et al., пат. США № 6,639,059, озаглавленный «SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES» («СИНТЕЗ [2.2.1]БИЦИКЛОНУКЛЕОЗИДОВ»), выданный 28 октября 2003 г. Kochkine et al., пат. США № 6,303,315, озаглавленный «ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES» («ОДНОСТАДИЙНАЯ ПОДГОТОВКА ПРОБ И ОБНАРУЖЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В СЛОЖНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ»), выданный 16 октября 2001 г. Skouf, и публикации заявки на пат. США № 2003/0092905, озаглавленной «SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES» («СИНТЕЗ [2.2.1]БИЦИКЛОНУКЛЕОЗИДОВ»), Kochkine et al., опубликованная 15 мая 2003 г., каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

**[226]** Используемый в контексте данного документа термин «экспрессия» относится к двухэтапному процессу, посредством которого полинуклеотиды транскрибируются в мРНК, и/или относится к процессу, посредством которого транскрибируемая мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

**[227]** «Находящийся под транскрипционным контролем» представляет собой термин, хорошо понятный в данной области техники и указывающий, что транскрипция полинуклеотидной последовательности, обычно последовательности ДНК, зависит от ее функциональной связи с элементом, который способствует инициации или стимулирует транскрипцию. «Функционально связанный» означает, что полинуклеотиды расположены таким образом, который позволяет им функционировать в клетке. В одном аспекте промоторы могут быть оперативно

связаны с последовательностями, расположенными далее от них в 5' – 3' направлении.

**[228]** Термин «кодировать», применительно к полинуклеотидам и/или последовательностям нуклеиновой кислоты, относится к полинуклеотиду и/или последовательности нуклеиновой кислоты, о которых говорят, что они «кодируют» полипептид, если в своем нативном состоянии или после манипуляций путем использования способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, они могут быть транскрибированы для образования мРНК для полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь является комплементарной такой нуклеиновой кислоте, и из нее можно вывести кодирующую последовательность.

**[229]** Термины «белок», «пептид» и «полипептид» используются взаимозаменяемо и в самом широком смысле для обозначения соединения из двух или более субъединиц аминокислот, аналогов аминокислот или пептидомиметиков. Субъединицы могут быть связаны пептидными связями. В другом аспекте субъединица может быть связана другими связями, например, сложноэфирными, эфирными и т.д. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не имеет никаких ограничений на максимальное количество аминокислот, которые могут входить в состав последовательности протеина или пептида, составлять её по существу или полностью. Используемый в контексте данного документа термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и/или не встречающимся в природе или синтетическим аминокислотам, включая глицин и оптические D- и L-изомеры, аналоги аминокислот и пептидомиметики.

**[230]** Используемый в контексте данного документа термин «сигнальный пептид» или «сигнальный полипептид» означает аминокислотную последовательность, обычно присутствующую на N-конце вновь синтезированных секреторных или мембранных полипептидов или белков. Он действует, направляя полипептид в определенное место в клетке, например, через клеточную мембрану, в клеточную мембрану или в ядро. В некоторых аспектах сигнальный пептид удаляется после транспортировки. Примеры сигнальных пептидов хорошо известны в данной области техники. Неограничивающими примерами являются те, которые описаны в патентах США № 8,853,381, № 5,958,736 и № 8,795,965. В некоторых аспектах сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид IDUA.

**[231]** Термины «эквивалент» или «биологический эквивалент» используются взаимозаменяемо, когда речь идет о конкретной молекуле, биологическом материале или клеточном компоненте, и подразумевают те, которые имеют минимальную гомологию, сохраняя при этом желаемую структуру или

функциональность. Неограничивающие примеры эквивалентных полипептидов включают полипептид, имеющий по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% идентичности или по меньшей мере около 99% идентичности референтному полипептиду (например, полипептиду дикого типа); или полипептид, который кодируется полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% идентичности, по меньшей мере около 97% идентичности последовательности или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности относительно референтного полинуклеотида (например, полинуклеотида дикого типа).

**[232]** «Гомология», или «идентичность», или «сходство» относится к сходству последовательностей между двумя пептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Процент идентичности можно определить путем сравнения положения в каждой последовательности, которая может быть выровнена в целях сравнения. Когда положение в сравниваемых последовательностях занято одним и тем же основанием или аминокислотой, то молекулы в этом положении идентичны. Степень идентичности между последовательностями является функцией количества совпадающих положений, общих для последовательностей. «Неродственные» или «негомологичные» последовательности имеют менее 40% идентичности, менее 25% идентичности с одной из последовательностей по данному изобретению. Выравнивание и процент идентичности последовательностей можно определить для последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислот, предложенных в данном документе, путем импорта указанных последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислот в программу ClustalW (доступную по адресу <https://genome.jp/tools-bin/clustalw/>). Например, параметры ClustalW, используемые для выполнения выравнивания последовательностей белков, представленных в данном документе, были созданы с использованием весовой матрицы Gonnet (для белка). В некоторых аспектах параметры ClustalW, используемые для выполнения выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот с использованием последовательностей нуклеиновых кислот, предложенных в данном документе, генерируются с использованием весовой матрицы ClustalW (для ДНК).

**[233]** Модификации аминокислот, используемые в контексте данного документа, могут представлять собой замены аминокислот, делеции аминокислот

или вставки аминокислот. Аминокислотные замены могут представлять собой консервативные аминокислотные замены или неконсервативные аминокислотные замены. Консервативная замена (также называемая консервативной мутацией, консервативной заменой или консервативной вариацией) представляет собой  
5 замена аминокислоты в белке, которая заменяет данную аминокислоту на другую аминокислоту со схожими биохимическими свойствами (например, зарядом, гидрофобностью или размером). Используемый в контексте данного документа термин «консервативные вариации» относится к замене аминокислотного остатка другим, биологически сходным остатком. Примеры консервативных вариаций  
10 включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой; или замену одного заряженного или полярного остатка на другой, например, замену аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту, глутамин на аспарагин и т.п. Другие иллюстративные примеры консервативных замен включают замены: аланина на серин; аспарагина на  
15 глутамин или гистидин; аспартата на глутамат; цистеина на серин; глицина на пролин; гистидина на аспарагин или глутамин; лизина на аргинин, глутамин или глутамат; фенилаланина на тирозин, серина на треонин; треонина на серин; триптофана на тирозин; тирозина на триптофан или фенилаланин; и тому подобное.

**[234]** Полинуклеотид, описанный в данном документе, можно доставить в  
20 клетку или ткань с использованием средства доставки гена. «Доставка гена», «перенос гена», «трандукция» и т.п., используемые в контексте данного документа, являются терминами, относящимися к введению экзогенного полинуклеотида (иногда называемого «трансгеном») в клетку-хозяина, независимо от способа внесения. Такие способы включают множество хорошо известных подходов, таких  
25 как векторный перенос генов (например, посредством вирусной инфекции/трансфекции или различных других комплексов доставки генов на основе белков или липидов), а также способы, облегчающие доставку «голых» полинуклеотидов (такие как электропорация, доставка «генной пушкой» и различные другие способы, используемые для внесения полинуклеотидов). Внесенный  
30 полинуклеотид может стабильно или временно сохраняться в клетке-хозяине. Стабильное поддержание обычно требует, чтобы внесенный полинуклеотид либо содержала точку начала репликации, совместимую с клеткой-хозяином, либо интегрировался в репликон клетки-хозяина, такой как внехромосомный репликон (например, плазмиду), ядерную или митохондриальную хромосому. Известно, что  
35 ряд векторов способны опосредовать перенос генов в клетки млекопитающих, как известно в данной области техники и описано в данном документе.

**[235]** «Плаزمида» представляет собой молекулу ДНК, которая обычно отделена от хромосомной ДНК и способна реплицироваться независимо от нее. Во многих случаях она является кольцевой и двухцепочечной. Плазмиды обеспечивают механизм горизонтального переноса генов внутри популяции микроорганизмов и обычно обеспечивают селективное преимущество в данном состоянии окружающей среды. Плазмиды могут нести гены, обеспечивающие устойчивость к природным антибиотикам в конкурентной экологической нише, или, альтернативно, продуцируемые белки могут действовать как токсины при аналогичных обстоятельствах. В данной области техники известно, что, хотя плазмидные векторы часто существуют в виде внехромосомных кольцевых молекул ДНК, плазмидные векторы также могут быть сконструированы так, чтобы стабильно интегрироваться в хромосому хозяина либо случайным, либо целенаправленным образом, и такая интеграция может быть осуществлена с использованием либо кольцевой плазмиды или плазмиды, которая была линеаризована перед введением в клетку-хозяина.

**[236]** «Плазмиды», используемые в генной инженерии, называются «плазмидными векторами». Многие плазмиды коммерчески доступны для таких целей. Ген, который должен реплицироваться, вставляется в копии плазмиды, содержащей гены, которые делают клетки устойчивыми к определенным антибиотикам, и сайт множественного клонирования (MCS или полилинкер), который представляет собой короткую область, содержащую несколько обычно используемых сайтов рестрикции, позволяющих легко вставлять фрагменты ДНК в этом месте. Еще одним важным применением плазмид является производство большого количества белков. В этом случае исследователи выращивают бактерии или эукариотические клетки, содержащие плазмиду, содержащую интересующий ген, которую можно заставить продуцировать большое количество белков из вставленного гена.

**[237]** В аспектах, в которых перенос гена опосредован ДНК-вирусным вектором, таким как аденовирус (Ad) или аденоассоциированный вирус (AAV), векторная конструкция относится к полинуклеотиду, содержащему, состоящему по существу или состоящему из вирусного генома или его части, и трансгена.

**[238]** Используемый в контексте данного документа термин «ткань» используется для обозначения ткани живого или умершего организма или любой ткани, полученной из живого или умершего организма или предназначенной для имитации живого или умершего организма. Ткань может быть здоровой, больной и/или иметь генетические мутации. Биологическая ткань может включать любую

отдельную ткань (например, совокупность клеток, которые могут быть связаны между собой) или группу тканей, составляющих орган, часть или область тела организма. Ткань может включать, состоять по существу или состоять из гомогенного клеточного материала, или она может представлять собой сложную структуру, такую как структура, обнаруженная в областях тела, включая грудную клетку, которая, например, может включать легочную ткань, скелетную ткань и/или мышечную ткань. Иллюстративные ткани включают, но не ограничиваются, ткани, полученные из печени, легких, щитовидной железы, кожи, поджелудочной железы, кровеносных сосудов, мочевого пузыря, почек, головного мозга, желчных протоков, двенадцатиперстной кишки, брюшной аорты, подвздошной вены, сердца и кишечника, включая любую их комбинацию.

### Примеры

#### *Пример 1*

**[239]** Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКПВ) представляет собой преимущественно генетическое заболевание сердца, характеризующееся дисфункцией правого, а в последнее время и левого желудочка, фиброзно-жировым замещением миокарда, приводящим к желудочковым аритмиям и внезапной сердечной смерти у молодых людей и спортсменов (1). АКПВ является причиной 10% внезапных сердечных смертей у людей в возрасте до 65 лет и 24% у людей в возрасте до 30 лет (2, 3). Считается, что АКПВ встречается у 1 из 1000–5000 человек, хотя распространенность может быть выше, поскольку у некоторых пациентов диагноз не диагностируется или ставится неправильно из-за плохих диагностических маркеров (4, 5). Все больше данных также свидетельствует о более раннем начале заболевания, поскольку педиатрические группы населения, начиная от младенцев и заканчивая детьми подросткового возраста, также особенно уязвимы к АКПВ (6–10), что подчеркивает острую необходимость выявления и лечения пациентов на более ранней стадии заболевания.

**[240]** За последнее десятилетие АКПВ была признана заболеванием сердечной десмосомы (специализированного межклеточного контакта), поскольку 40-50% случаев связаны с мутациями/дефицитом нескольких генов, связанных с десмосомами (десмоглеина-2, десмоколлина-2, плакоглобина, плакофилина-2, десмоплакина), таким образом, данное заболевание НЕ считается заболеванием, вызванным одним геном (11). Критическим для заболевания является то, что мутации/дефициты одного компонента десмосомального комплекса оказывают разрушительное каскадное воздействие на других членов десмосомального комплекса, а также на другие части межклеточного контакта кардиомиоцитов

(фасциальные адгезионные контакты, связанные с сократительным аппаратом, и щелевые контакты, связанные с электрической связью), что приводит к структурному и электрическому дефициту сердца, лежащему в основе АКПВ. Иерархическое распадение десмосомального комплекса наряду с функционально важными компонентами соседних межклеточных контактов подчеркивает необходимость стратегий, направленных на восстановление всего комплекса межклеточных контактов кардиомиоцитов, а не только десмосомы. В данном изобретении представлены исследования, демонстрирующие стратегию, на основе использования одного гена (плакофилина-2), для восстановления межклеточного контакта кардиомиоцитов и предотвращения развития заболевания АКПЖ.

**[241]** Данное изобретение предоставляет направленную генную терапию, которая доставляет кДНК PKP2 и в конечном итоге повышает уровень белка PKP2 в сердце (Фиг. 1A-C). В этой генной терапии используется кардиотропный серотип 9 AAV (AAV9) или AAVrh10, а также кардиоспецифичный промотор кардиотропонина T для управления специфической для кардиомиоцитов экспрессией (Фиг. 1B-C; Фиг. 8A). Экспрессия PKP2 может эффективно восстанавливать сердечную десмосому (Фиг. 2; Фиг. 3A-B; Фиг. 6F; Фиг. 7B; Фиг. 8A, 8E), которая служит молекулярным каркасом для обхода нарушений межклеточных контактов кардиомиоцитов, лежащих в основе АКПЖ. PKP2 стабилизирует десмосому, а также другие комплексы межклеточных контактов (щелевые контакты и фасциальные адгезионные контакты), которые представляют собой последующие каскадные нарушения, лежащие в основе прогрессирования заболевания (Фиг. 2; Фиг. 3A-B; Фиг. 6F; Фиг. 7B; Фиг. 8A, 8E). Генная терапия AAV9 PKP2 может служить профилактикой, если ее вводить на ранних стадиях до развития заболевания, а также может остановить прогрессирование болезни у пациентов с уже существующим заболеванием (Фиг. 3C; Фиг. 4; Фиг. 5; Фиг. 6A-F; Фиг. 7D, 7E; Фиг. 8B-Г).

**[242]** В данном изобретении предложены исследования, которые демонстрируют, что обработка векторами AAV, содержащими PKP2, улучшала уровни белков межклеточных контактов (PKP2, DSP, DSG2, JUP, CX43) в неонатальных кардиомиоцитах с мутацией PKP2 (Фиг. 1A, Фиг. 2). В данном изобретении предложены векторы AAV9 или AAVrh10, содержащие последовательность, кодирующую PKP2, которая может успешно экспрессировать PKP2 под контролем промотора кардиотропонина T в сердце *in vivo* (Фиг. 1B-C; Фиг. 8A). На 2-й день постнатального периода мышам, мутантным по PKP2, проводили однократную внутрибрюшинную инъекцию  $5 \times 10^{11}$  вирусных частиц AAV9 PKP2 (Фиг.

3). Через 4 недели после инъекции лизаты сердца анализировали с помощью вестерн-блоттинга и обнаружили, что введение AAV9 PKP2 может улучшить уровни белков межклеточных контактов (PKP2, DSP, DSG2, JUP, CX43) (Фиг. 3B). Ранняя инъекция PKP2 AAV9 также может предотвратить развитие заболевания АКПЖ в возрасте 4 недель (Фиг. 3B), поскольку сохранялись механическая и электрическая функции сердца, значительно уменьшался фиброз миокарда и увеличивалась выживаемость (Фиг. 4; Фиг. 5; Фиг. 6A). Уровни белков межклеточных контактов, механическая функция сердца и электрическая функция сердца все еще сохранялись через 6 месяцев после инъекции AAV9 PKP2 (Фиг. 6B-6F), что подчеркивает длительное влияние генной терапии PKP2 на развитие заболевания АКПЖ. Мышей, мутантных по PKP2, также лечили с помощью AAV9 PKP2 в тот момент времени, когда присутствовали все признаки заболевания (возраст 4 недели), и у них наблюдалось улучшение уровней белков межклеточных контактов кардиомиоцитов (PKP2, DSP, DSG2, JUP, N-Cad) и механической функции сердца (улучшение фракций выброса ЛЖ/ПЖ на около 15%) через 2 недели после инъекции AAV9 PKP2 у мутантных мышей PKP2 по сравнению с мутантными мышами PKP2, получавшими AAV9 GFP (Фиг. 7).

**[243]** Также были проведены исследования с использованием вектора gAAV PKP2, инкапсидированным в AAVrh10. Эти исследования демонстрируют, что векторы AAV по данному изобретению, включая серотипы векторов AAV9 и AAVrh10, могут стабильно экспрессировать белок PKP2 человека в сердце взрослой мыши и предотвращать исходы заболевания АКПЖ у мышей с Гом PKP2. На Фиг. 8A представлен вестерн-блоттинг, демонстрирующий, что hPKP2 может экспрессироваться уже через 10 дней в сердцах взрослых контрольных мышей дикого типа, при использовании AAV9 в дозе  $5 \times 10^{13}$  вг/кг, по сравнению с неинъецированными контрольными мышами дикого типа (обратите внимание на мигрирующую полосу большего молекулярного размера, соответствующую hPKP2, по сравнению с эндогенной, мигрирующей полосой меньшего молекулярного размера, соответствующей мышиному PKP2). Вестерн-блоттинг дополнительно демонстрирует, что экспрессия hPKP2 становится более устойчивой через 21 день после заражения в сердцах взрослых гетерозиготных (ГЕТ) мутантных мышей PKP2 при использовании AAVrh10 в дозе  $5 \times 10^{13}$  вг/кг. Экспрессию hPKP2 также можно было обнаружить в печени, хотя и на более низких уровнях. Кроме того, AAVrh10-hPKP2 оказывает «направленный» эффект, поскольку стабилизирует уровни десмоплакина (DSP), партнера по прямому связыванию с PKP2 в сердцах взрослых мышей с Гет PKP2. Уровни DSP восстанавливаются до контрольных уровней по сравнению с



контрольными мышами дикого типа, которым не вводились инъекции. ГАФДГ и бета-актин служили контролем нагрузки. Эти данные демонстрируют, что конструкции AAV9 и AAVrh10-PKp2 экспрессируются в сердце взрослой мыши и что AAVrh10-PKp2 функционально устраняет дефициты в сердечной десмосоме в сердце  
5 взрослой мыши с Гет PKP2.

**[244]** На Фиг. 8B представлена кривая выживаемости через четыре недели после раннего введения (постнатальный день 2 (P2)) состава и hPKP2 (при использовании AAV9 и AAVrh10) мышам с Гом PKP2. Обратите внимание, что AAV9-hPKP2 и AAVrh10-hPKP2 достаточно для предотвращения преждевременной смерти  
10 мышей с Гом PKP, которая наблюдается у мышей с Гом PKP2, получавших состав. n=5 AAVrh10 hPKP2, n=5 Гом-AAV9 PKP2, n=5 состав.

**[245]** На Фиг. 8C представлены гистограммы анализа эктопических систол/преждевременных сокращений желудочков (ПСЖ) у мышей с Гом PKP2 после анализа ЭКГ с поверхности тела и раннего введения (P2) состава и hPKP2 (с  
15 использованием AAV9 и AAVrh10). Обратите внимание, что AAV9-hPKP2 (n=2) и AAVrh10-hPKP2 (n=4) достаточны для предотвращения преждевременных сокращений желудочков у мышей с Гом PKP, поскольку в этих группах до 4-недельного возраста не наблюдалось ПСЖ. Напротив, преждевременная смерть наблюдалась у двух из трех мышей с Гом PKP2, получавших состав, в возрасте  
20 четырех недель. n=4 AAVrh10 hPKP2, n=2 Гом-AAV9 PKP2, n=3 состав.

**[246]** На Фиг. 8D представлены типичные снимки изображений сердца по короткой оси, полученные с помощью магнитно-резонансной томографии, во время конечной диастолы для контрольных мышей дикого типа, не получавших лечения, для мышей с Гом PKP2, получивших состав, мышей с Гом PKP2, получивших AAV9-hPKP2 и мышей с Гом PKP2, получивших AAVrh10-hPKP2. Размеры правого  
25 желудочка (ПЖ) и левого желудочка (ЛЖ) выделены в каждой группе во время конечной диастолы. Обратите внимание на значимое уменьшение размеров ПЖ и ЛЖ у мышей с Гом PKP2, получавших AAVrh10-hPKP2, по сравнению с мышами, получавшими состав. Обратите внимание на значимое уменьшение размеров ЛЖ у  
30 мышей с Гом PKP2, получавших AAVrh10-hPKP2, по сравнению с мышами, получавшими состав.

**[247]** На Фиг. 8E представлен вестерн-блоттинг PKP2 и белков межклеточных контактов (десмоплакина (DSP), десмоглеина-2 (DSG2), коннексина43 (Cx43), N-кадгерина (NCAD), плакоглобина (JUP)) для сердец мышей  
35 дикого типа, не получавших лечения, мышей с Гом PKP2, получивших состав, мышей с Гом PKP2, получивших AAV9-hPKP2 и мышей с Гом PKP2, получивших

AAVrh10-hPKP2. Обратите внимание на значительное усиление экспрессии сердечных белков DSP, DSG2, Cx43 (по сравнению с их деградированной формой, обнаруженной у мышей, получавших состав), JUP у мышей с Гом РКР2, получавших AAV9-hPKP2, и у мышей с Гом РКР2, получавших AAVrh10-hPKP2, что подчеркивает предотвращение разрушение межклеточных контактов кардиомиоцитов в сердцах с Гом РКР2, которые подвергались воздействию hPKP2. ГАФДГ используется в качестве контроля нагрузки. Обратите внимание, что умершие мыши, получавшие состав, отмечены звездочкой.

**[248]**           Терапия АКПЖ:

- 10    1)    РКР2 может быть направлен на терапию АКПЖ путем создания вектора на основе аденоассоциированного вируса, содержащего кДНК РКР2, в качестве средства для восстановления уровней РКР2 у пациентов с АКПЖ.
- 2)    РКР2 может быть направлен на терапию АКПЖ путем разработки новых прямых фармакологических активаторов РКР2 в качестве средства для  
15    восстановления функции РКР2 у пациентов с АКПЖ.
- 3)    РКР2 может быть направлен на терапию АКПЖ путем разработки или использования препаратов, воздействующих на пути, возникающие после функционирования РКР2, для восстановления комплекса межклеточных контактов у  
      пациентов с АКПЖ.

20

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.    Idris, A., S.R. Shah, and K. Park, Right ventricular dysplasia: management and treatment in light of current evidence. J Community Hosp Intern Med Perspect, 2018. 8(3): p. 101-106.
- 25    2.    Elias Neto, J., et al., Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia (ARVC/D) - What We Have Learned after 40 Years of the Diagnosis of This Clinical Entity. Arq Bras Cardiol, 2019. 112(1): p. 91-103.
3.    Wang, W., C.A. James, and H. Calkins, Diagnostic and therapeutic strategies for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy patient. Europace,  
30    2019. 21(1): p. 9-21.
4.    Sen-Chowdhry, S., et al., Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. Annu Rev Med, 2010. 61: p. 233-53
5.    Tabib, A., et al., Undetected cardiac lesions cause unexpected sudden cardiac death during occasional sport activity. A report of 80 cases. Eur Heart J, 1999.  
35    20(12): p. 900-3.

6. Tabib, A., et al., Circumstances of death and gross and microscopic observations in a series of 200 cases of sudden death associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and/or dysplasia. *Circulation*, 2003. 108(24): p. 3000-5.
7. Thiene, G., D. Corrado, and C. Basso, Arrhythmogenic right ventricular  
5 cardiomyopathy/dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*, 2007. 2: p. 45.
8. Peters, S., M. Trummel, and W. Meyners, Prevalence of right ventricular dysplasia-cardiomyopathy in a non-referral hospital. *Int J Cardiol*, 2004. 97(3): p. 499-501.
9. Nishikawa, T., et al., Programmed cell death in the myocardium of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in children and adults. *Cardiovasc Pathol*, 1999.  
10 8(4): p. 185-9.
10. Wong, A.R., et al., Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in an 11-year-old girl and typical echocardiographic features. *Pediatr Cardiol*, 2008. 29(2): p. 427-30.
11. Rey, C., et al., Life-saving automated external defibrillation in a teenager: a case  
15 report. *J Med Case Rep*, 2007. 1: p. 76.
12. Daliento, L., et al., Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in young versus adult patients: similarities and differences. *J Am Coll Cardiol*, 1995. 25(3): p. 655-64.
13. Garcia-Gras, E., et al., Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by  
20 nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 2012-21.
14. Marcus, F.I., S. Edson, and J.A. Towbin, Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a practical guide for physicians. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 61(19): p. 1945-8.
- 25 15. Sen-Chowdhry, S., et al., Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Annu Rev Med*, 2010. 61: p. 233-53.
16. Elliott, PM., et al., Definition and treatment of arrhythmogenic cardiomyopathy: an updated expert panel report. *Eur J Heart Fail*, 2019. 8: p. 955-964.
17. Elias Neto, J., et al., Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia  
30 (ARVC/D) - What We Have Learned after 40 Years of the Diagnosis of This Clinical Entity. *Arq Bras Cardiol*, 2019. 112(1): p. 91-103.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (rAAV),  
содержащий, в направлении от 5'- к 3'-концу:
  - а) первую последовательность ITR AAV;
  - б) промоторную последовательность;
  - в) молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, причем молекула трансгенной нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид плакофилина-2 (PKP2);
  - г) посттранскрипционный регуляторный элемент;
  - д) последовательность полиА; и
  - е) вторую последовательность ITR AAV.
  
2. Вектор rAAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30.
  
3. Вектор rAAV по п. 1, отличающийся тем, что полипептид PKP2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 13.
  
4. Вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 14.
  
5. Вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что первая последовательность ITR AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO, 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 25.
  
6. Вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что вторая последовательность ITR AAV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO, 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 25.

7. Вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что промоторная последовательность представляет собой кардиоспецифичную промоторную последовательность.

5 8. Вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что промоторная последовательность содержит промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор бета-актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK), промотор U6, промотор H1, промотор CAG, 10 промотор  $\beta$ -актина кур, промотор MeCP2, промотор EF1, универсальный гибридный промотор  $\beta$ -актина кур (CBh), промотор U1a, промотор U1b, промотор MeCP2, промотор MeP418, промотор MeP426, минимальный промотор MeCP2, промотор VMD2, промотор mRho, промотор EFla, промотор Ubc, промотор  $\beta$ -актина человека, промотор TRE, промотор Ac5, промотор полиэдрина, промотор CaMKIIa, промотор 15 Gal1, промотор TEF1, промотор GDS, промотор ADH1, промотор Ubi или промотор  $\alpha$ -1-антитрипсина (hAAT).

9. Вектор rAAV по п.8, отличающийся тем, что промоторная последовательность содержит промоторную последовательность кардиотропонина 20 T (cTnT).

10. Вектор rAAV по п. 9, отличающийся тем, что промоторная последовательность cTnT содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

25

11. Вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что последовательности полиА содержит последовательность полиА бета-глобина кролика.

30 12. Вектор rAAV по п. 11, отличающийся тем, что последовательность полиА бета-глобина кролика содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

13. Вектор rAAV по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой 35 посттранскрипционный регуляторный элемент oPRE.

14. Вектор gAAV по п. 13, отличающийся тем, что посттранскрипционный регуляторный элемент oPRE содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

5

15. Вектор gAAV по любому из предыдущих пунктов, содержащий в направлении от 5'- к 3'-концу:

а) первую последовательность ITR AAV, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7;

10

б) промоторную последовательность, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 2;

15

в) молекулу трансгенной нуклеиновой кислоты, причем молекула трансгенной нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PKP2, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PKP2, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 4;

20

г) посттранскрипционный регуляторный элемент, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 5;

д) последовательность полиА, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 6; и

е) вторую последовательность ITR AAV, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 8.

25

16. Вирусный вектор gAAV, содержащий

(i) капсидный белок AAV; и

(ii) вектор gAAV по любому из предыдущих пунктов.

30

17. Вирусный вектор gAAV по п. 16, отличающийся тем, что капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV1, капсидный белок AAV2, капсидный белок AAV4, капсидный белок AAV5, капсидный белок AAV6, капсидный белок AAV7, капсидный белок AAV8, капсидный белок AAV9, капсидный белок AAV10, капсидный белок AAV11, капсидный белок AAV12, капсидный белок AAV13, капсидный белок AAVPHP.B, капсидный белок AAVrh74 или капсидный белок AAVrh10.

35

18. Вирусный вектор gAAV по п. 17, отличающийся тем, что капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV9 или AAVrh10.
- 5 19. Фармацевтическая композиция, содержащая:  
а) вирусный вектор gAAV по любому из пп. 16-18; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент и/или добавку.
20. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание и/или расстройство,  
10 связанное с геном *PKP2*, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества вирусного вектора gAAV по любому из пп. 16-18 или фармацевтической композиции по п. 19.
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что заболевание и/или расстройство,  
15 связанное с геном *PKP2*, представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, характеризующееся нарушением межклеточных контактов кардиомиоцитов.
22. Способ по п. 20, отличающийся тем, что заболевание и/или расстройство,  
20 связанное с геном *PKP2*, представляет собой аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (АКПЖ).
23. Способ по п. 20, отличающийся тем, что эффективное количество улучшает электрическую и структурную целостность сердца у субъекта.
- 25 24. Способ по п. 20, отличающийся тем, что эффективное количество спасает и восстанавливает белки межклеточных контактов у субъекта.
25. Способ по п. 20, отличающийся тем, что эффективное количество  
30 улучшает сердечную функцию у субъекта.
26. Способ по п. 20, отличающийся тем, что эффективное количество сохраняет электрическую и структурную целостность, предотвращая АКПЖ у субъекта.

27. Способ по любому из пп. 20-26, отличающийся тем, что вирусный вектор гAAV или фармацевтическую композицию вводят субъекту в дозе в диапазоне от около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $2,5 \times 10^{14}$  вг/кг.

5 28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что вирусный вектор гAAV или фармацевтическую композицию вводят субъекту в дозе в диапазоне от около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $5,0 \times 10^{13}$  вг/кг.

29. Способ по любому из пп. 20-28, отличающийся тем, что вирусный вектор гAAV или фармацевтическую композицию вводят субъекту путем внутривенного, интратекального, интрацеребрального, внутрижелудочкового, интраназального, интратрахеального, внутриушного, внутриглазного или окологлазного, перорального, ректального, чресслизистого, ингаляционного, чрескожного, парентерального, подкожного, внутрикожного, внутримышечного, 10 интрацистернального, интраневрального, внутриплеврального, местного, 15 интритлимфатического, интрацистернального или интритнервного введения.

30. Вирусный вектор гAAV по любому из пп. 16-18 или фармацевтическая композиция по п. 18 для лечения заболевания и/или расстройства, связанного с 20 геном *PKP2*, у субъекта, нуждающегося в этом.

31. Применение по п. 30, отличающееся тем, что заболевание и/или расстройство, связанное с геном *PKP2*, представляет собой АКПЖ.

25 32. Применение по любому из пп. 30-31, отличающееся тем, что вирусный вектор гAAV или фармацевтическую композицию вводят субъекту в дозе в диапазоне от около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $2,5 \times 10^{14}$  вг/кг.

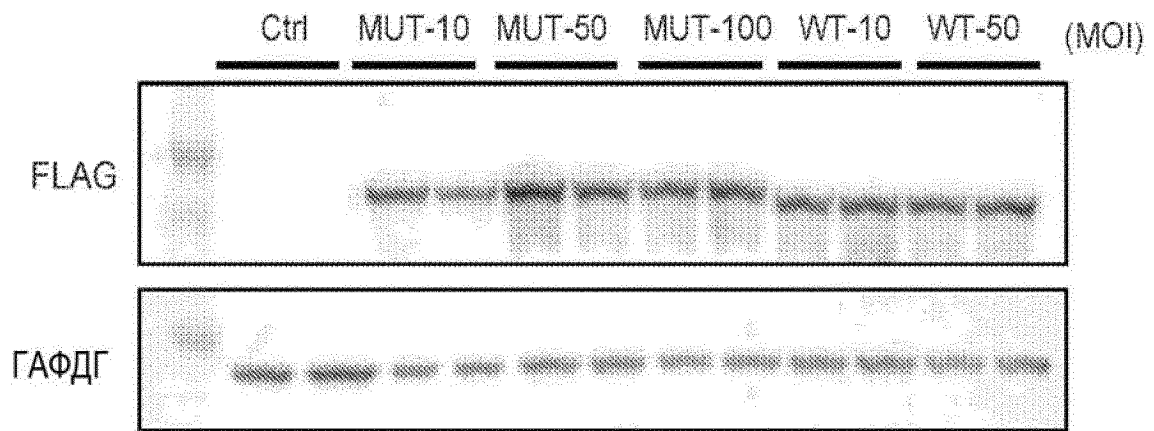
33. Применение по любому из пп. 30-32, отличающееся тем, что вирусный вектор гAAV или фармацевтическую композицию вводят субъекту в дозе в диапазоне от 30 около  $1,0 \times 10^{12}$  вг/кг до около  $5,0 \times 10^{13}$  вг/кг.

34. Применение по любому из пп. 30-33, отличающееся тем, что вирусный вектор гAAV или фармацевтическая композиция предназначены для внутривенного, 35 интратекального, интрацеребрального, внутрижелудочкового, интраназального, интратрахеального, внутриушного, внутриглазного или окологлазного,

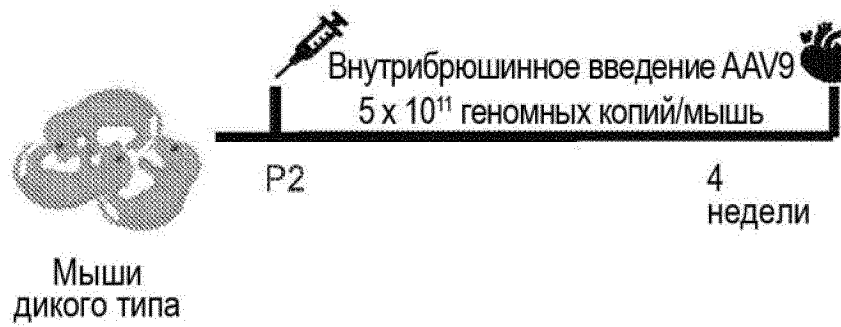


перорального, ректального, чресслизистого, ингаляционного, чрескожного, парентерального, подкожного, внутрикожного, внутримышечного, интрацистернального, интраневрального, внутривисцерального, местного, внутривисцерального, интрацистернального или внутривисцерального введения субъекту.

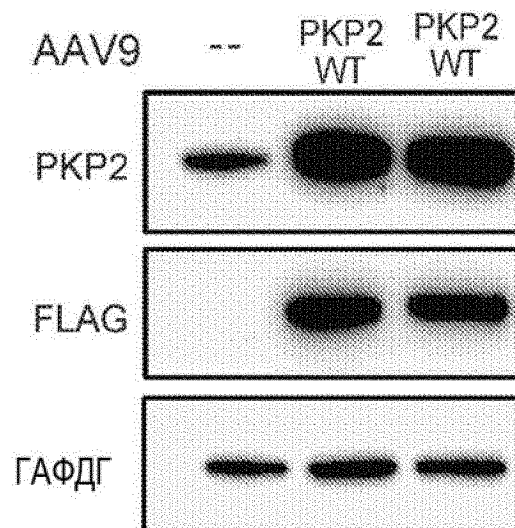
35. Применение по п. 34, отличающееся тем, что вирусный вектор гAAV или фармацевтическая композиция предназначены для внутривенного введения.



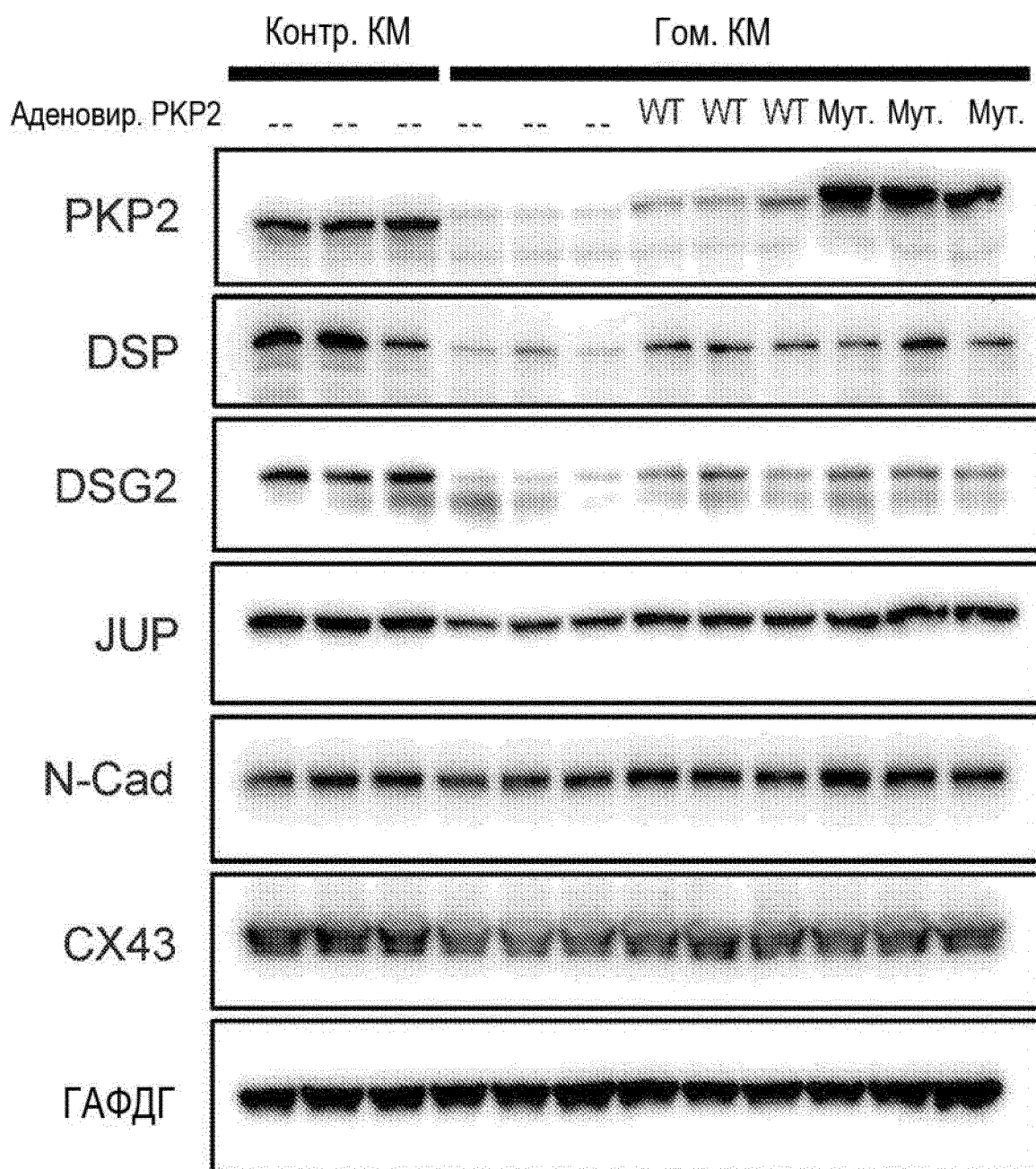
Фиг. 1А



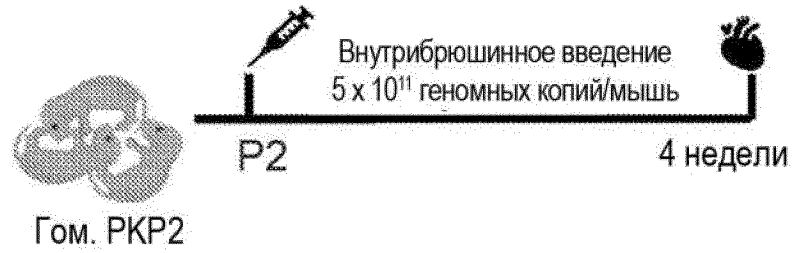
Фиг. 1В



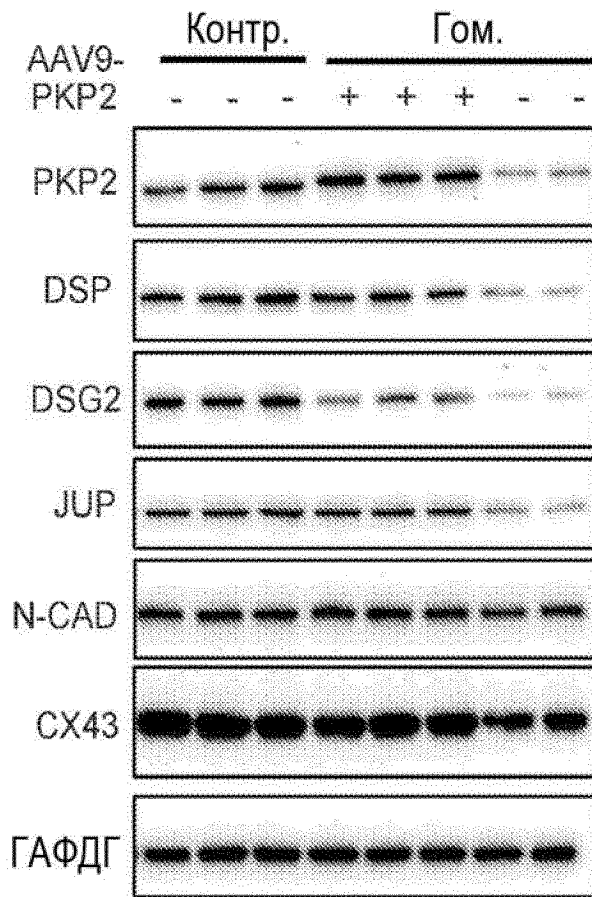
Фиг. 1С



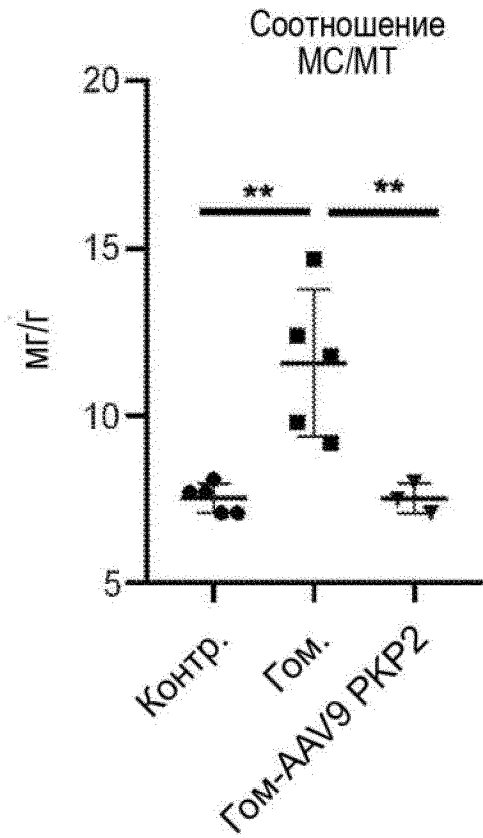
Фиг. 2



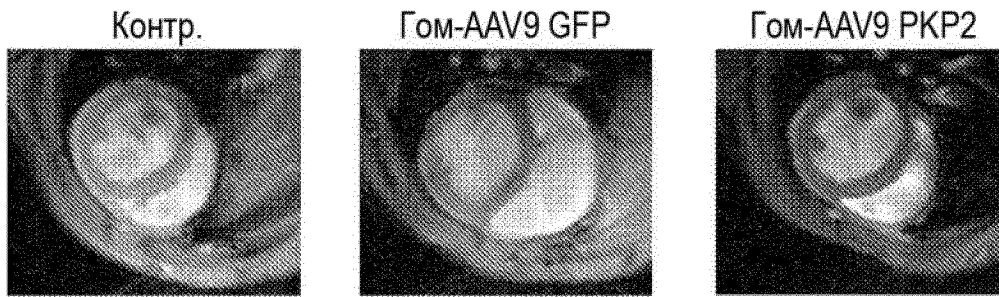
Фиг. 3А



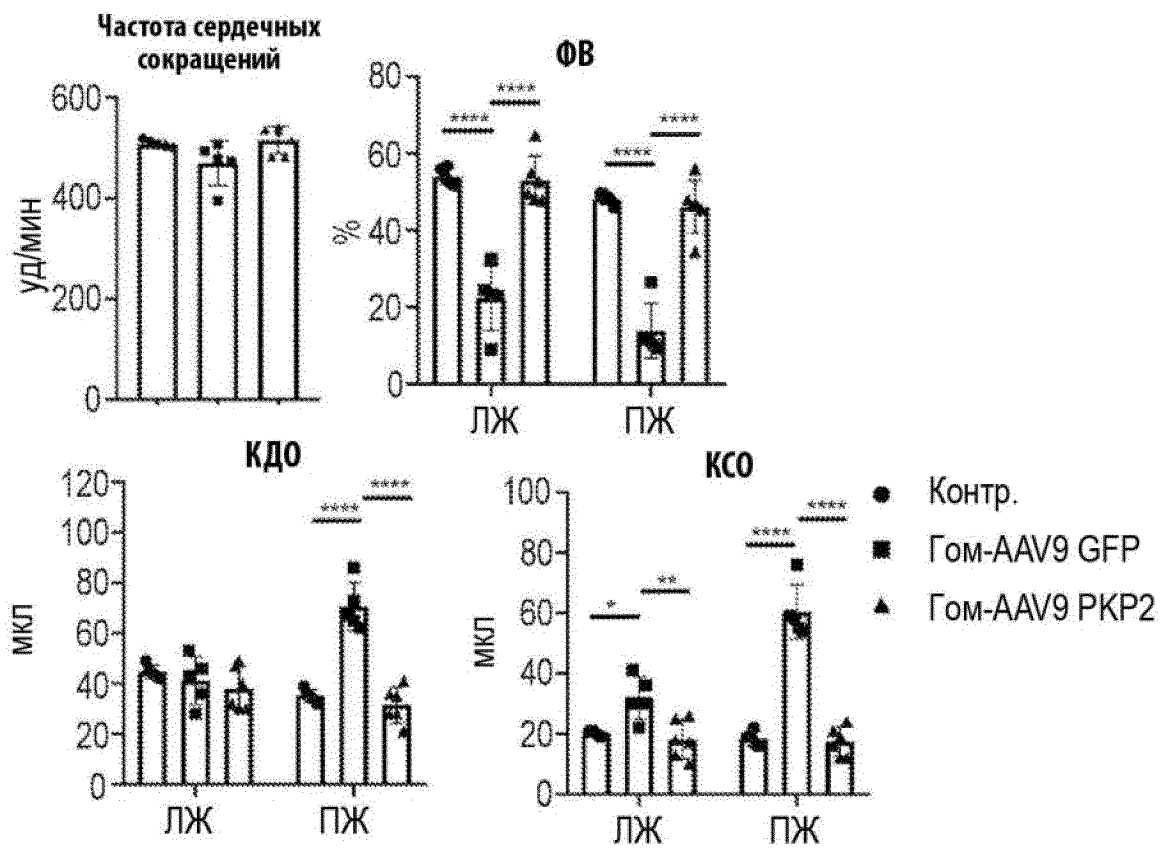
Фиг. 3В



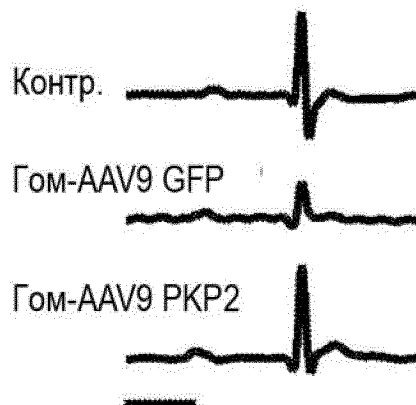
Фиг. 3С



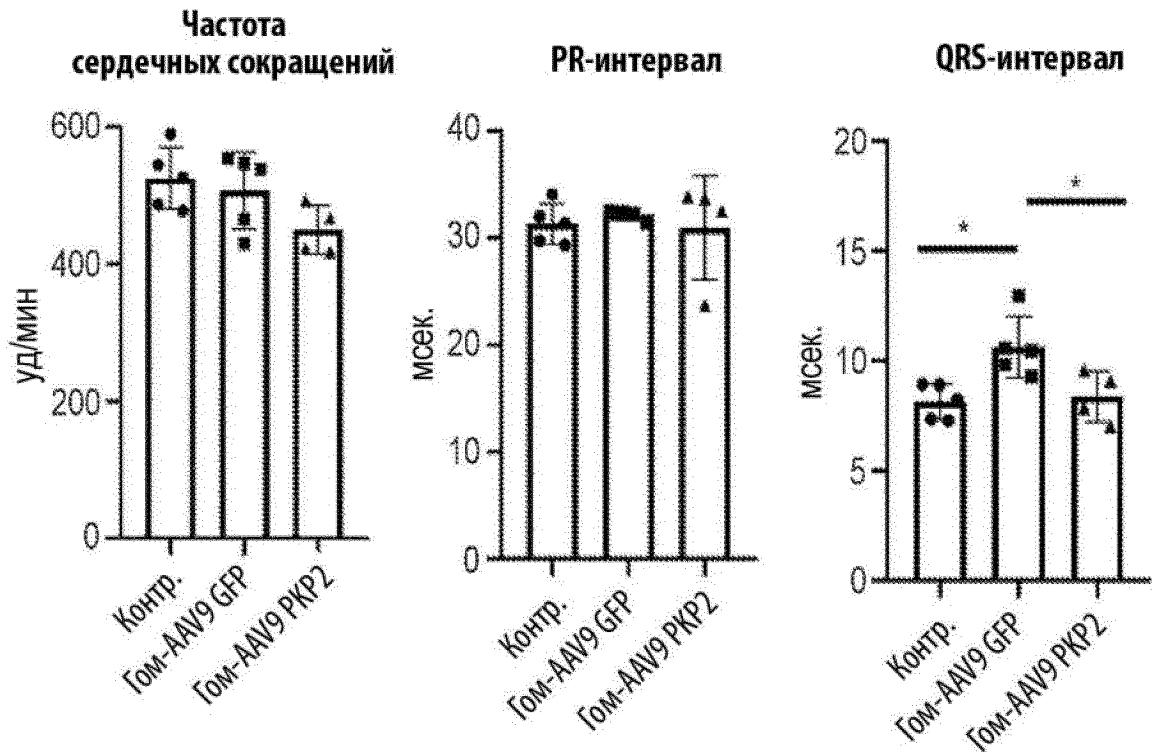
Фиг. 4А



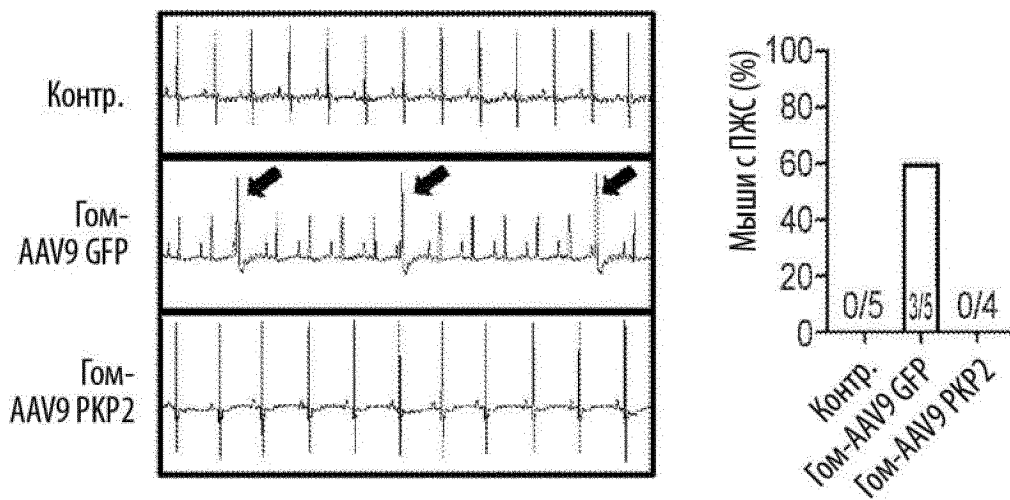
Фиг. 4В



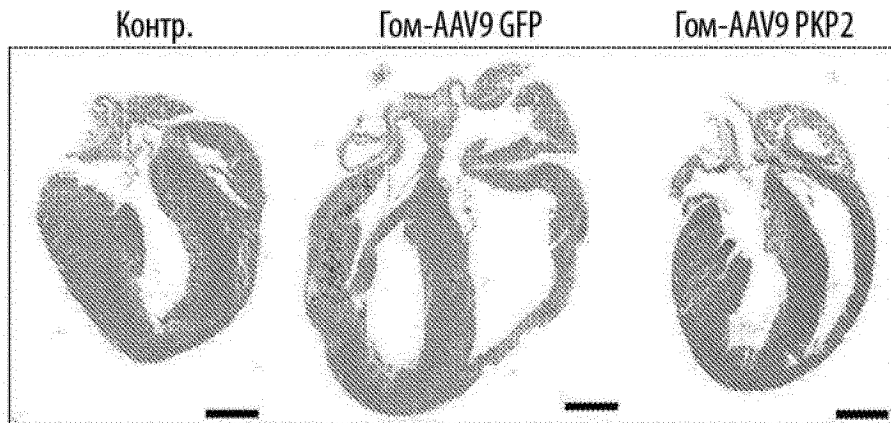
Фиг. 4С



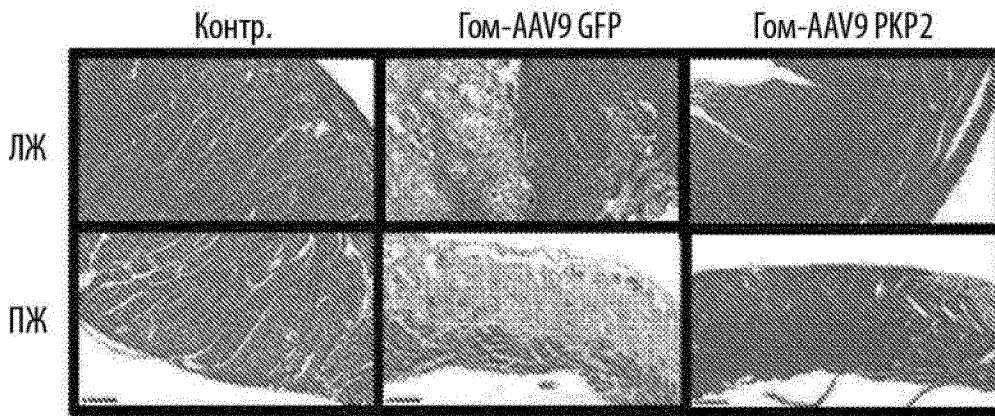
Фиг. 4D



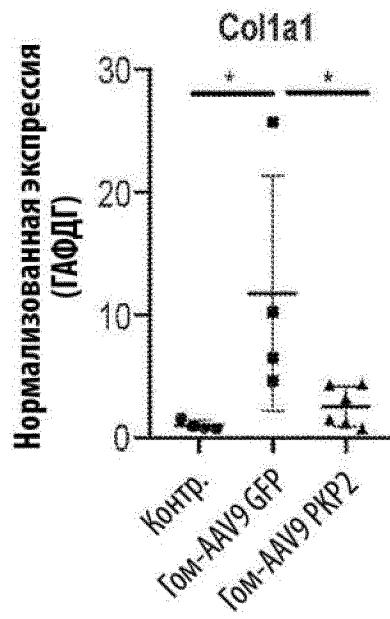
Фиг. 4Е



Фиг. 5А

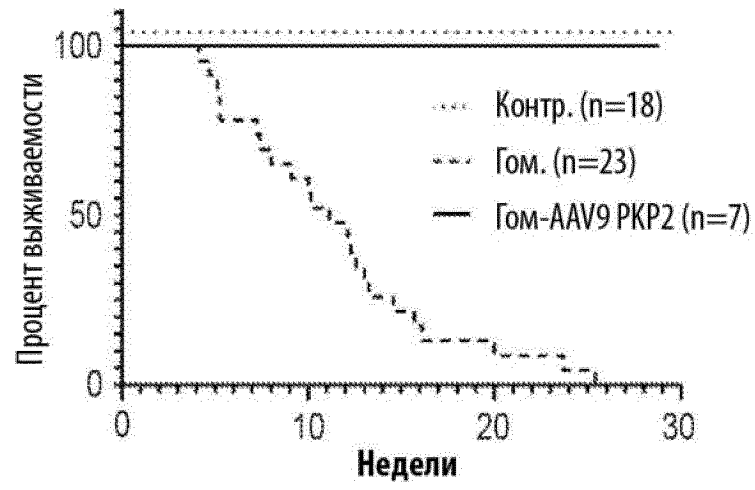


Фиг. 5В



Фиг. 5С

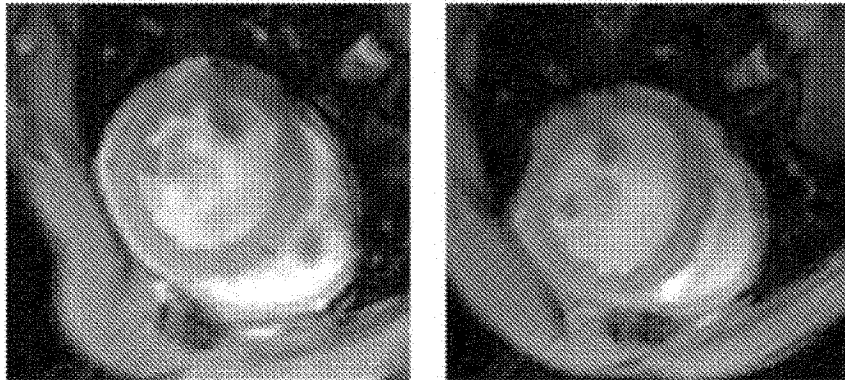
## Кривая Выживаемости



Фиг. 6А

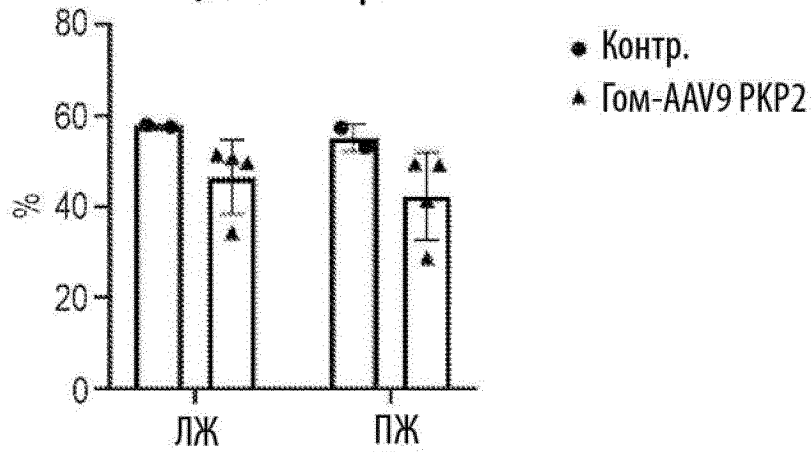
Контр.

Гом-AAV9 PKP2



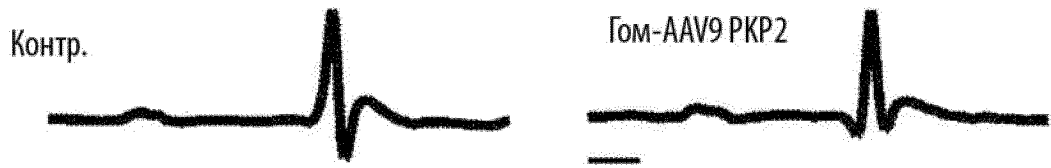
Фиг. 6В

## ФВ-6 Месяцев

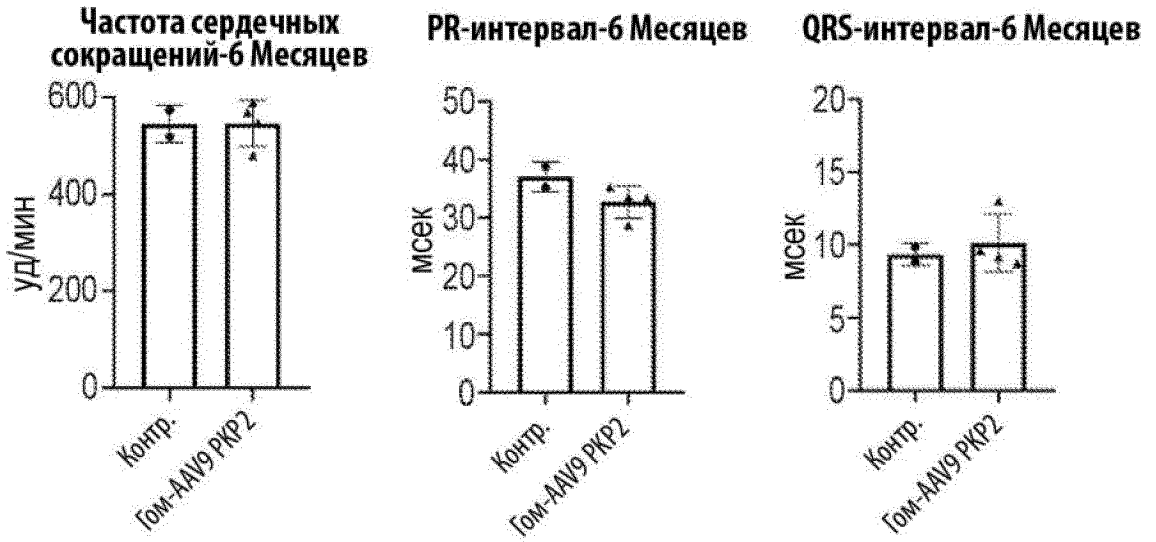


Фиг. 6С

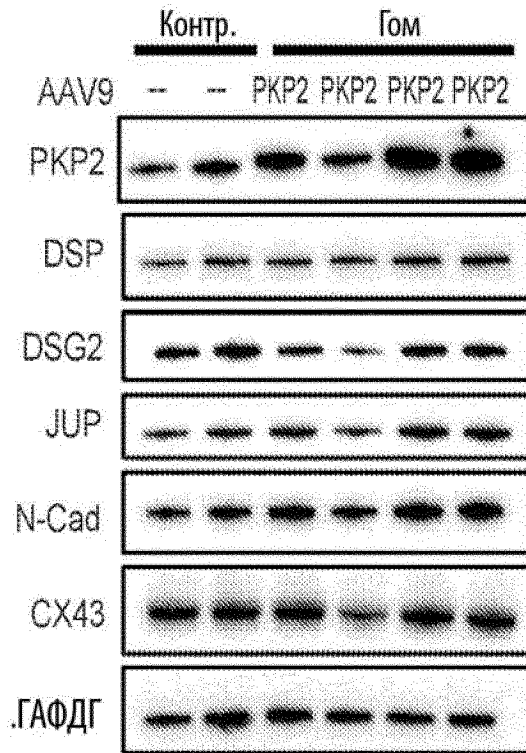




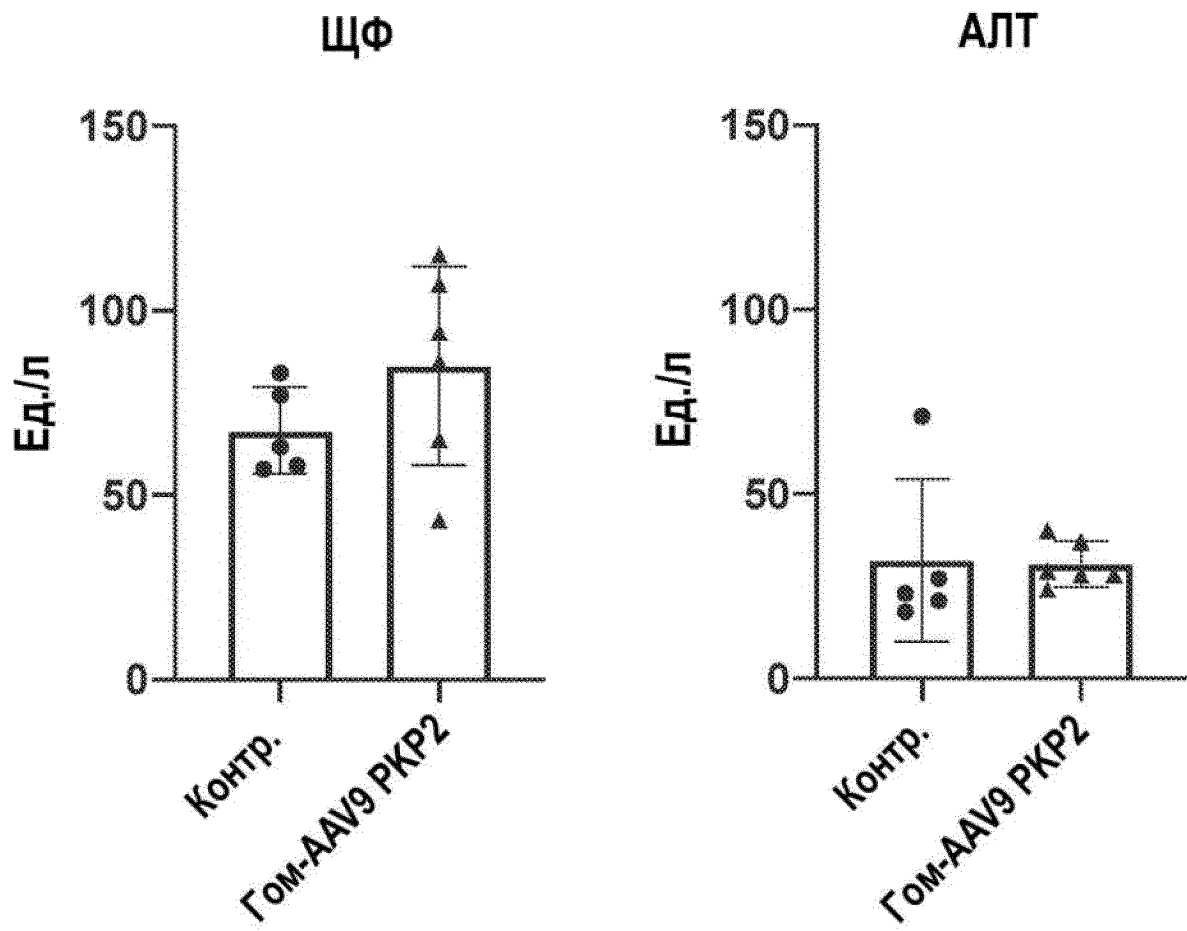
Фиг. 6D



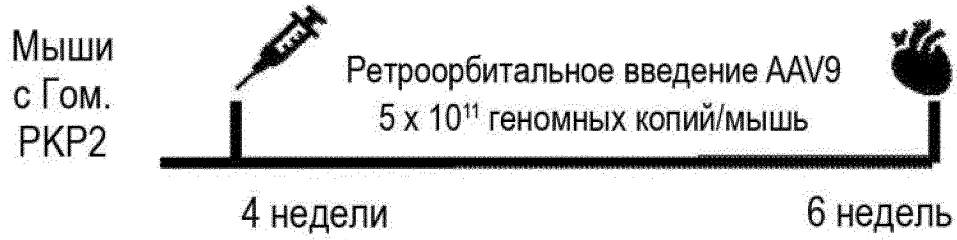
Фиг. 6E



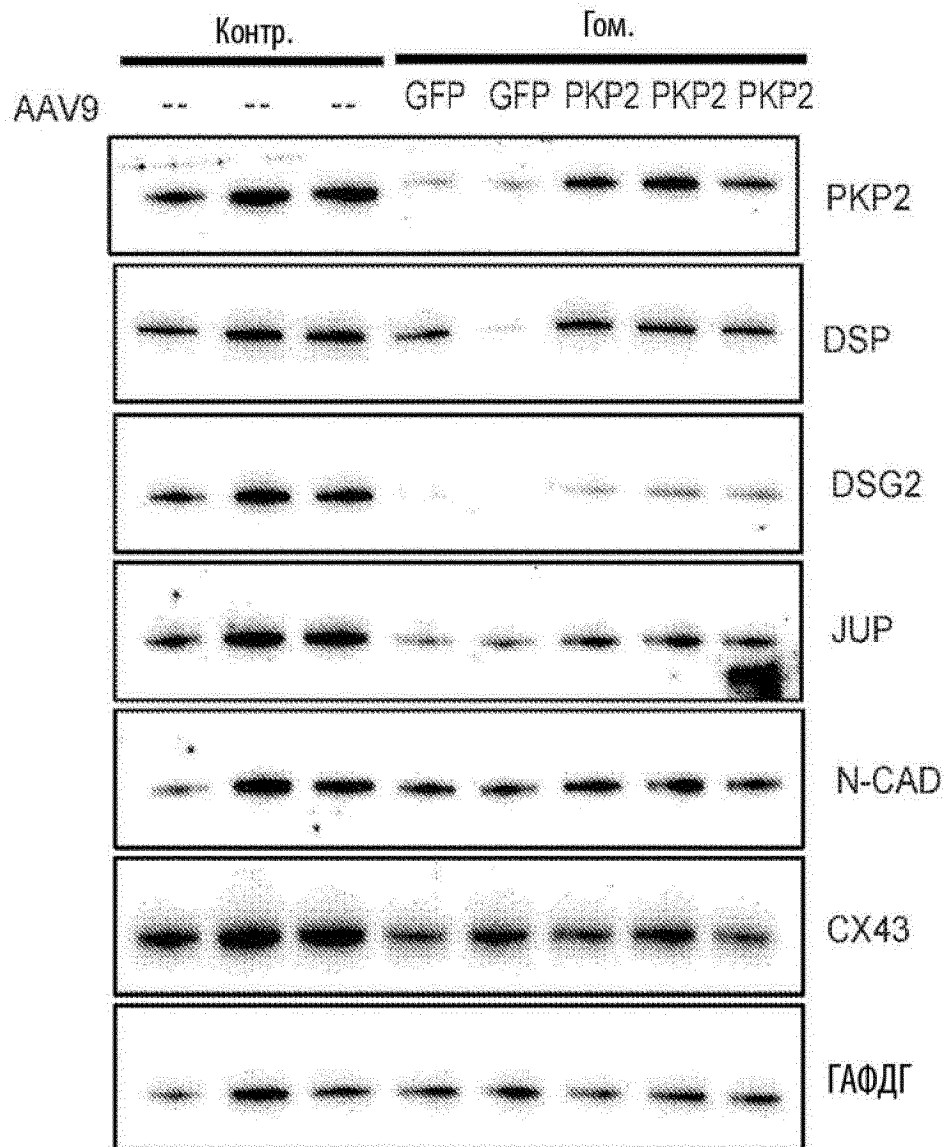
Фиг. 6F



Фиг. 6G

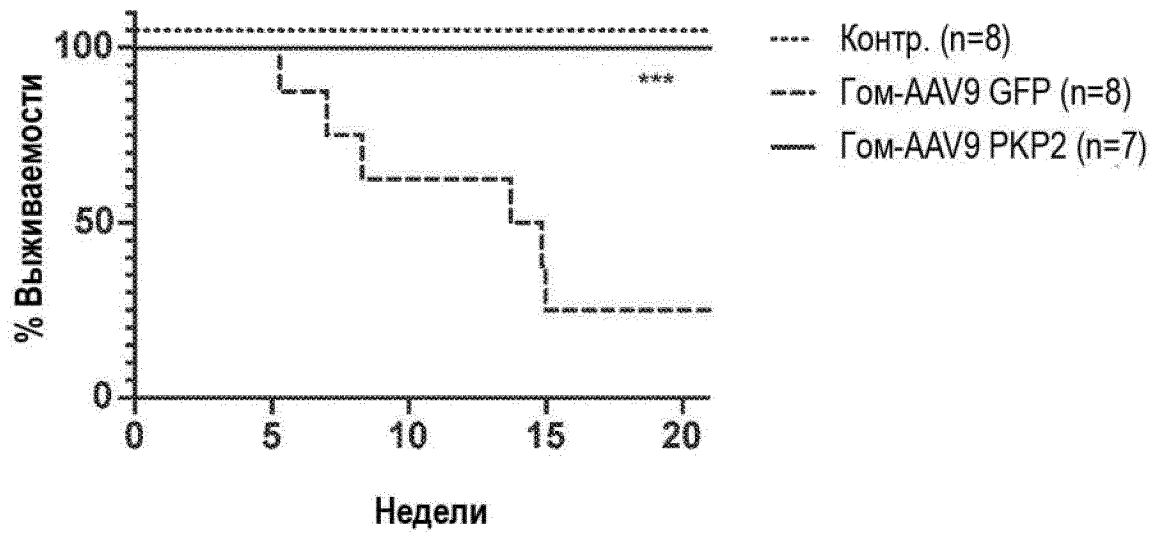


Фиг. 7А

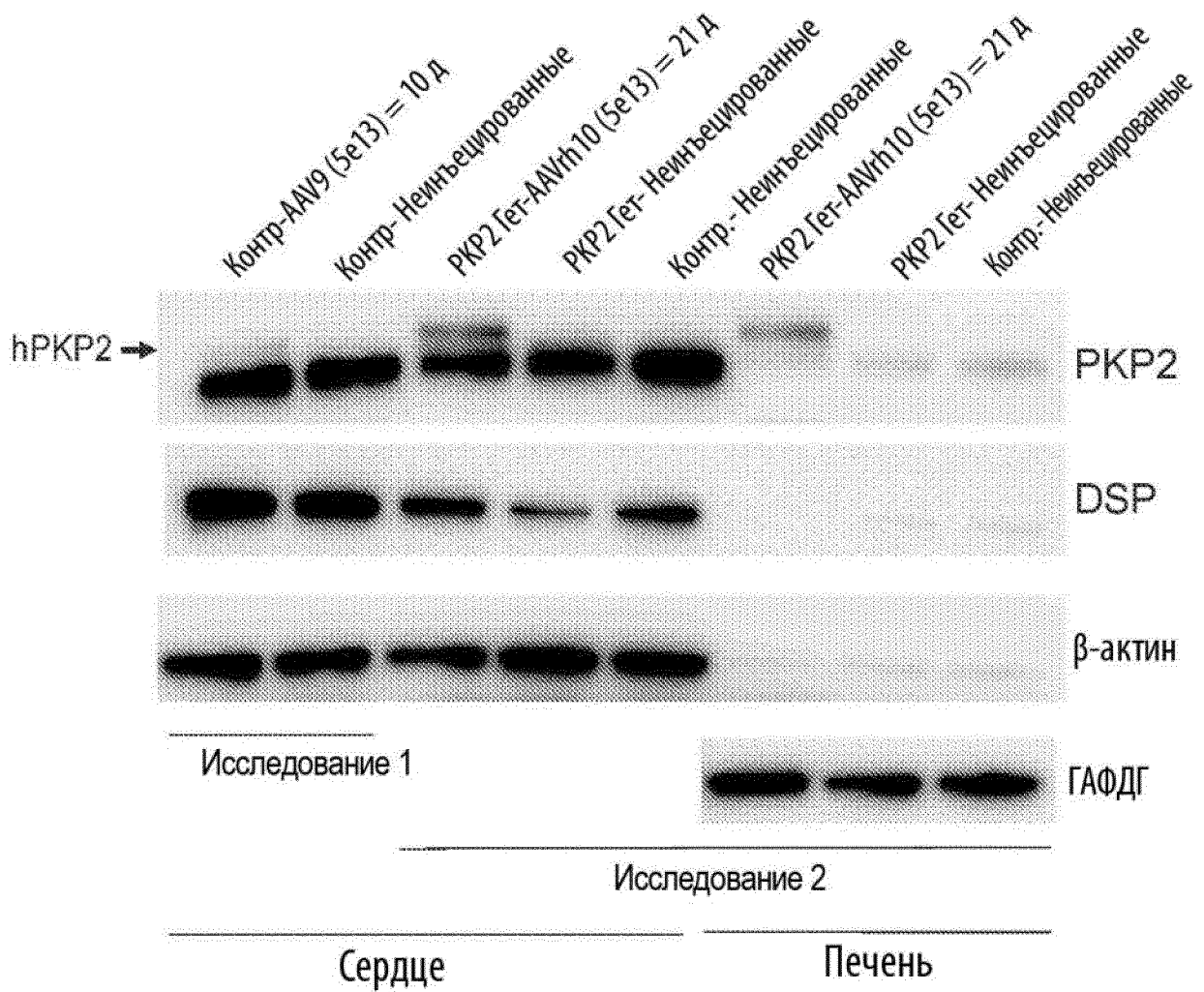
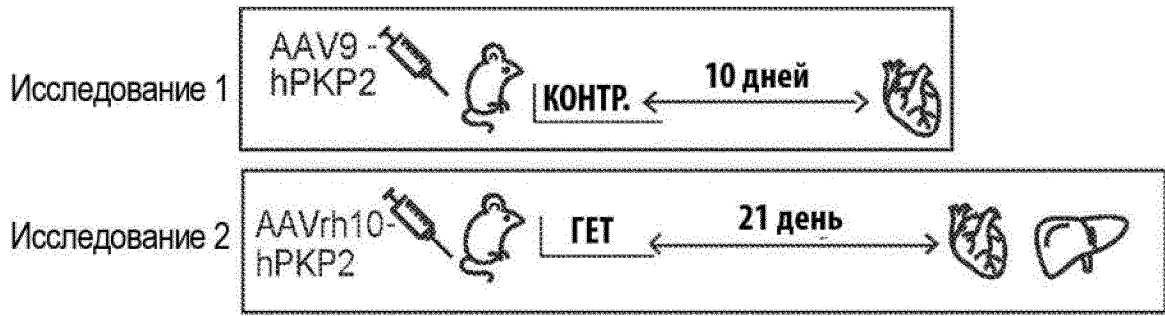


Фиг. 7В

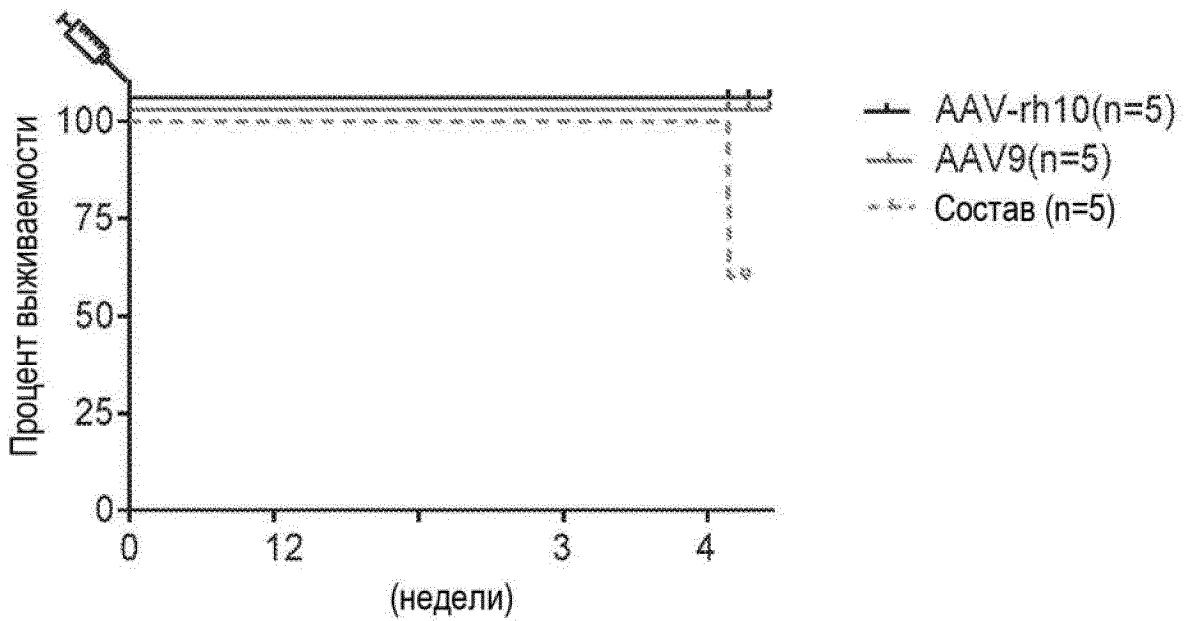
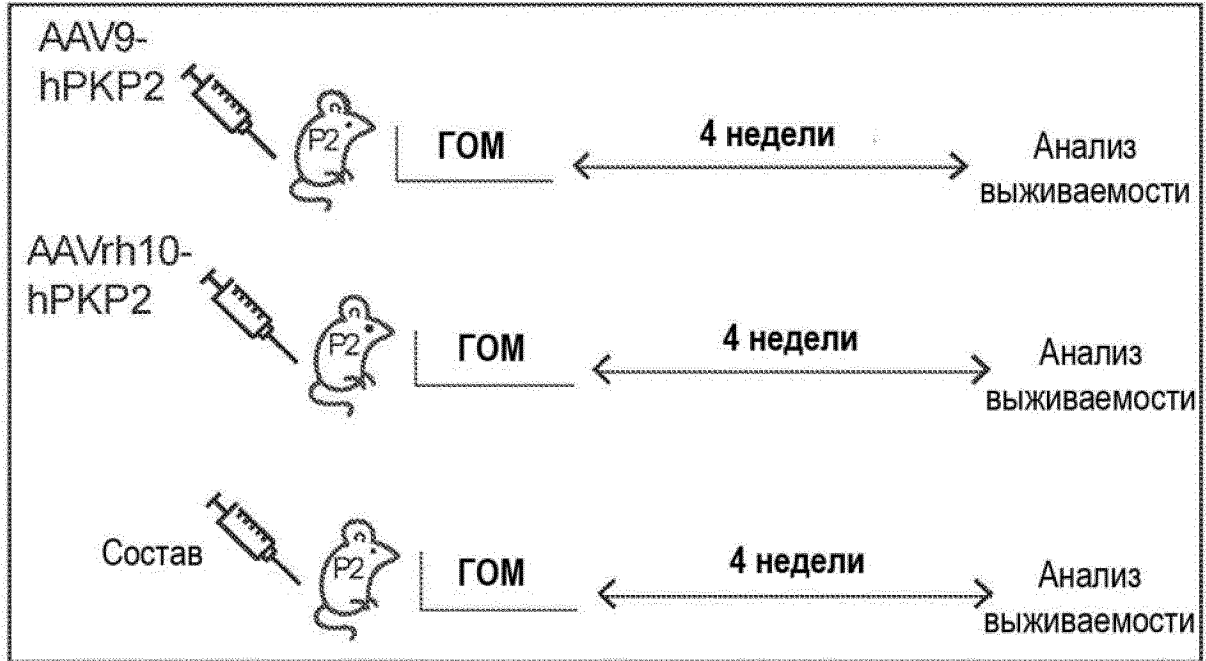




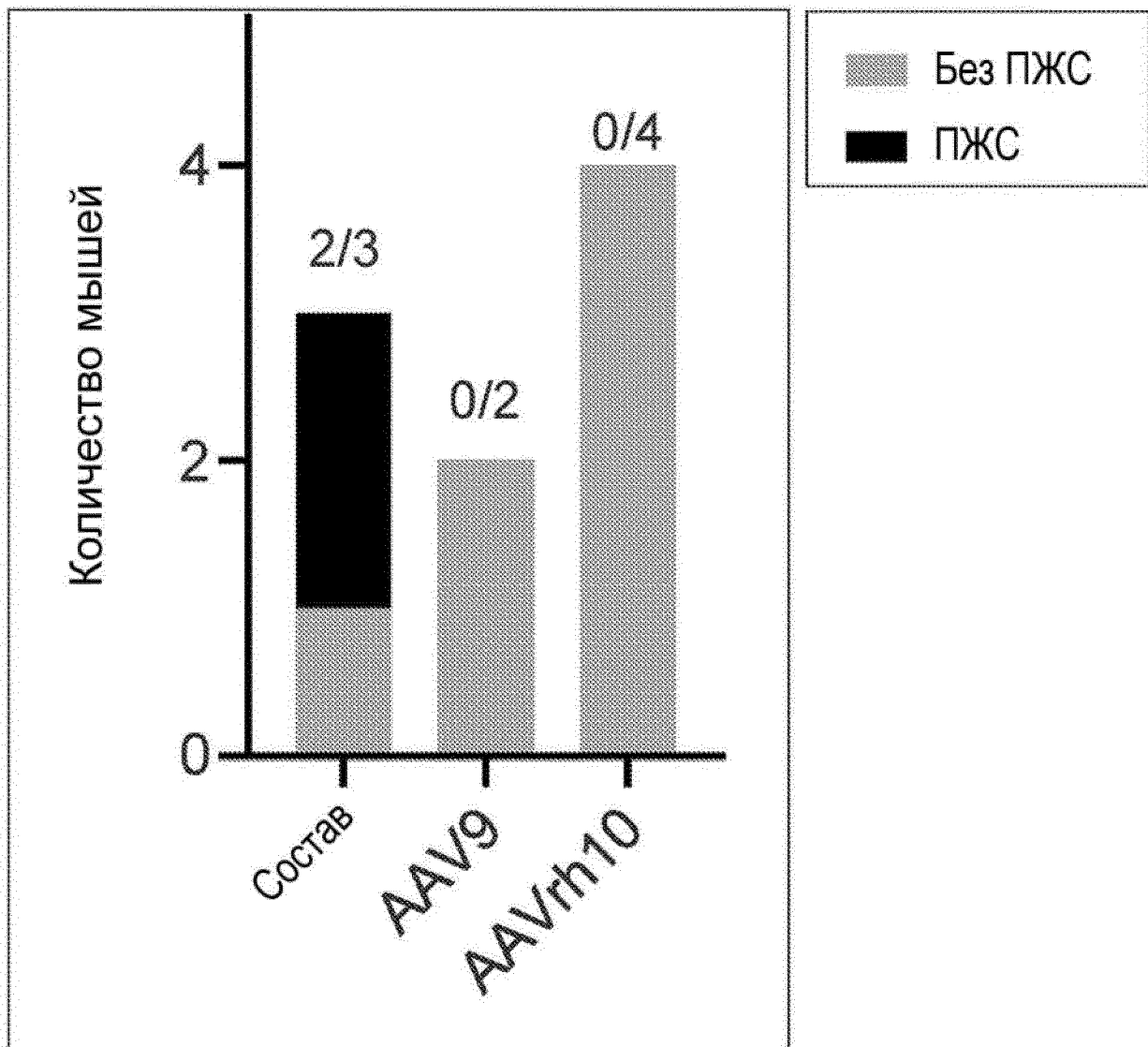
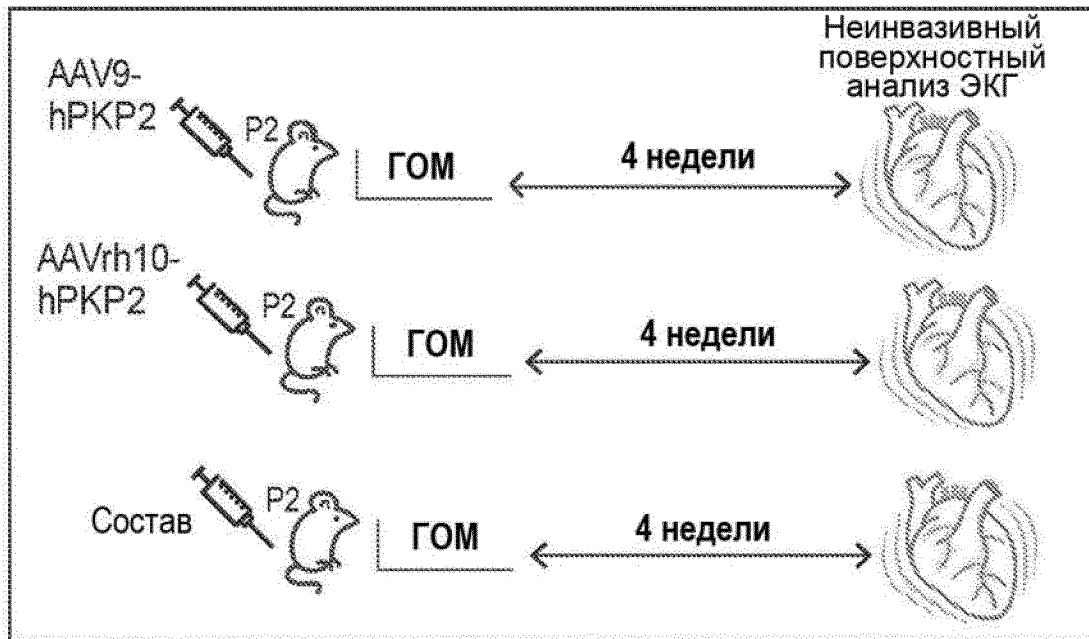
Фиг. 7E



Фиг. 8А

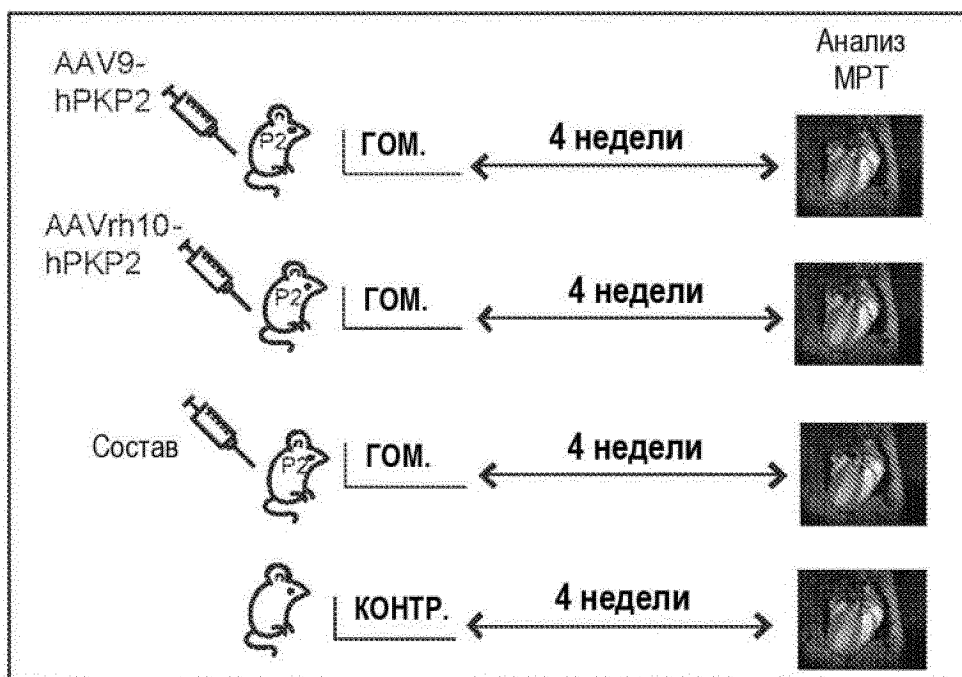


Фиг. 8В

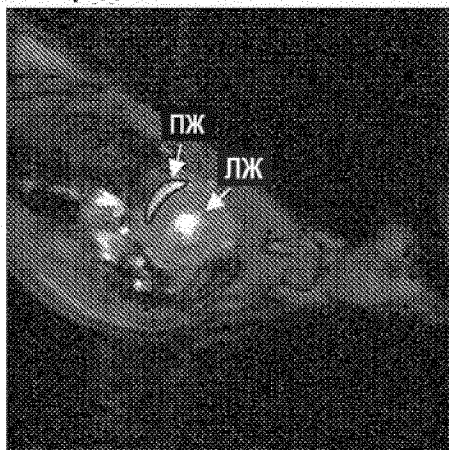


Фиг. 8С



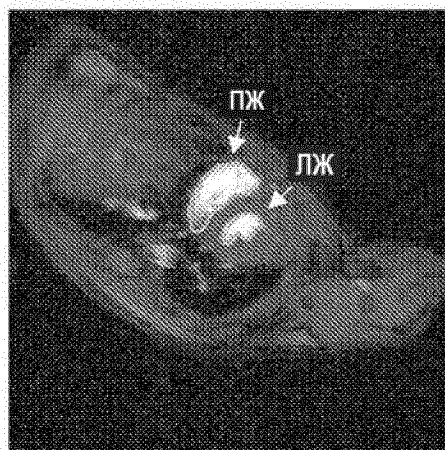


Контр. Дикий тип-Без лечения



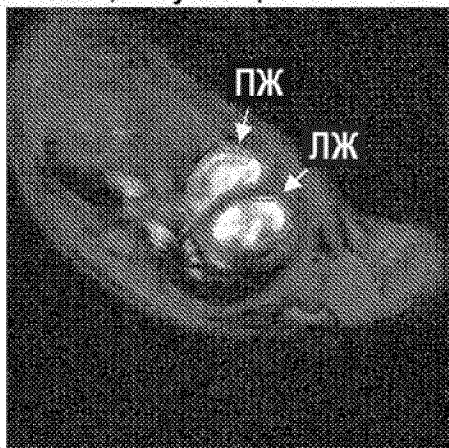
Конечная диастола

Гом. РКР2, получающие AAV9 hPKP2



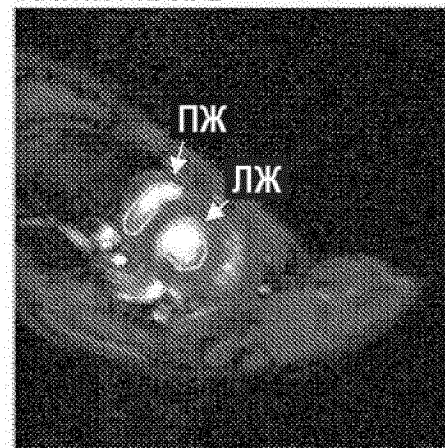
Конечная диастола

Гом. РКР2, получающие состав



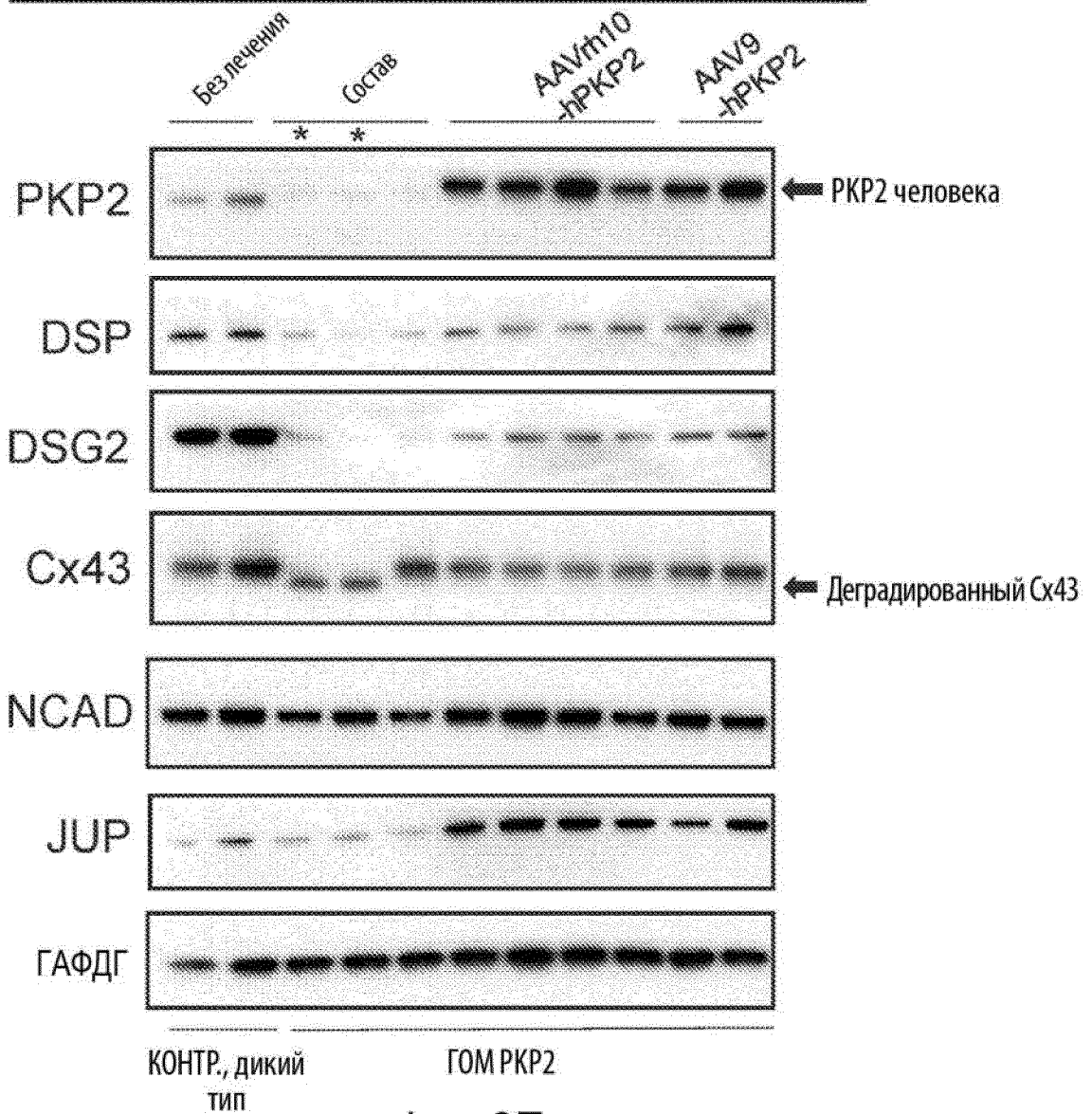
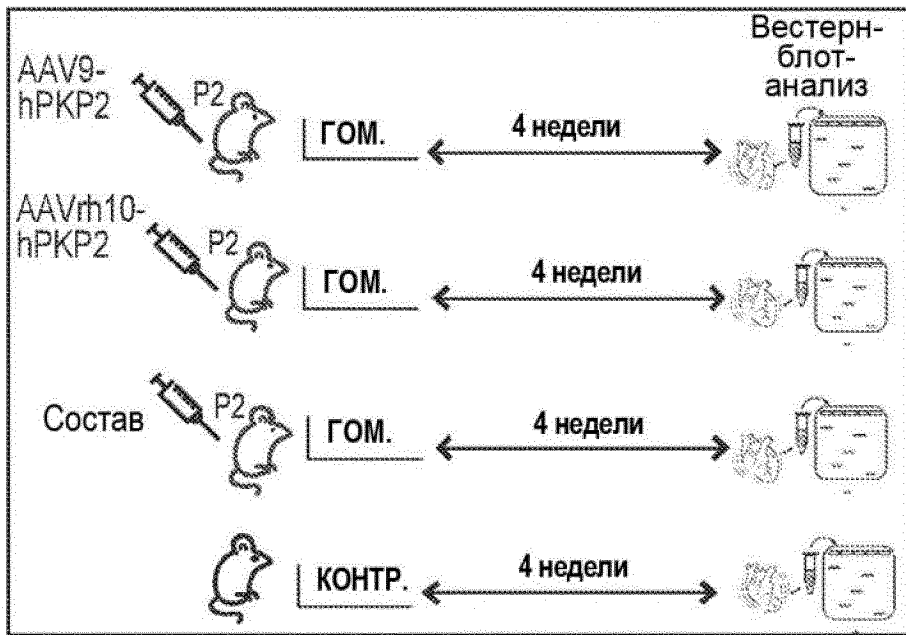
Конечная диастола

Гом. РКР2, получающие AAVrh10-hPKP2



Конечная диастола

Фиг. 8D



Фиг. 8Е