

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045951**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.01.22**

**(21)** Номер заявки  
**202091739**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.01.30**

**(51)** Int. Cl. **A61K 35/76** (2015.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61M 1/36** (2006.01)  
**A61M 5/14** (2006.01)

---

**(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ПРОТИВ ТАЗОВО-ПЛЕЧЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ  
ТИПА 2С**

---

**(31)** 62/624,616

**(32)** 2018.01.31

**(33)** US

**(43)** 2021.01.14

**(86)** PCT/US2019/015779

**(87)** WO 2019/152474 2019.08.08

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РИСЁЧ ИНСТИТЬЮТ ЭТ  
НЭЙШЕНВАЙД ЧИЛДРЕН'С  
ХОСПИТАЛ (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Родино-Клапак Луиз Р. (US)**

**(74)** Представитель:  
**Хмара М.В. (RU)**

**(56)** HERSON et al., A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1-gamma-sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C, *Brain*, 2012, Vol. 135, Pt 2, pg 483-392; abstract; pg 485, col 2, para 2

MCNALLY et al.. Mild and Severe Muscular Dystrophy Caused by a Single gamma-Sarcoglycan Mutation, *American Journal of Human Genetics*, November 1996, Vol 59, No 5, pg 1040-1047; abstract; pg 1040, col 2, para 1

US-A1-20100247495

US-B1-6262035

US-B2-9061059

---

**(57)** Изобретение относится к векторам генной терапии, таким как векторы AAV, содержащие полинуклеотид, кодирующий  $\gamma$ -саркогликан (SGCG), и способам использования таких векторов генной терапии для лечения субъектов, страдающих мышечной дистрофией, например тазово-плечевой дистрофией типа 2С (LGMD2С).

---

**B1**

**045951**

**045951**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственную патентную заявку**

Данная заявка заявляет приоритет согласно 35 U.S.C. § 119(e) по первоначальной патентной заявке США № 62/624616, поданной 31 января 2018 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Перечень последовательностей**

В заявке, рассматриваемой в данный момент, содержится перечень последовательностей, который подан в электронной форме в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 25 января 2019 г., имеет название "106887-7141\_SL.txt" и размер 18760 байт.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Изобретение относится к генной терапии. Более конкретно, согласно раскрытию предложены векторы генной терапии, такие как векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV - от англ. adeno-associated virus), для лечения мышечной дистрофии, например тазово-плечевой дистрофии типа 2C (LGMD2C - от англ. limb-girdle muscular dystrophy type 2C).

### **Предшествующий уровень техники**

Мышечные дистрофии (MD (от англ. muscular dystrophy) представляют собой группу генетических заболеваний. Данная группа характеризуется прогрессирующим ослаблением и дегенерацией скелетных мышц, которые контролируют движение. Некоторые формы MD развиваются в младенчестве или детстве, в то время как другие могут не возникать до среднего возраста или позднее. Расстройства отличаются в отношении распространения и степени мышечной слабости - некоторые формы MD также воздействуют на сердечную мышцу, возраста проявления, скорости прогрессирования и картины наследования.

Одна группа MD представляет собой тазово-плечевую группу (LGMD) MD. LGMD являются редкими состояниями, которые проявляются по-разному у разных людей в отношении возраста проявления, областей мышечной слабости, задействования сердца и дыхательной системы, скорости прогрессирования и тяжести. LGMD могут начинаться в детстве, отрочестве, начале зрелого возраста или даже позднее. Оба пола затрагиваются в равной степени. LGMD вызывают ослабление в плечевом поясе и тазовом поясе, причем расположенные рядом мышцы в верхних частях ног и руках иногда также ослабевают со временем. Слабость ног часто возникает перед возникновением слабости рук. Мышцы лица обычно не затронуты. При прогрессировании состояния, у болеющих индивидов могут развиваться проблемы с ходьбой, и со временем может становиться необходимым использование инвалидного кресла. Затрагивание мышц плеча и руки может приводить к сложности в поднятии рук над головой и в подъеме предметов. При некоторых типах LGMD могут быть задействованы мышцы сердца и дыхательные мышцы.

LGMD2C (тазово-плечевая дистрофия типа 2C) вызвана недостатком гамма ( $\gamma$ )-саркогликана (SGCG - от англ. gamma( $\gamma$ )-sarcoglycan). Как и другие саркогликанопатии, она проявляется как прогрессирующая мышечная дистрофия, начинающаяся в поясных мышцах перед распространением на мышцы нижних и, в конечном итоге, верхних конечностей. Проявление обычно происходит в среднем-позднем подростковом возрасте. При попытке лечения LGMD2C ни одна форма лекарственной терапии, даже включая кортикостероиды, не изменила течения заболевания.

Функциональное улучшение у пациентов, страдающих LGMD2C и другими мышечными дистрофиями, требует как восстановления генов, так и уменьшения фиброза. В данной области существует необходимость в композициях и способах лечения LGMD2C и других мышечных дистрофий.

### **Краткое изложение сущности изобретения**

В данном документе описаны векторы генной терапии, например, рекомбинантные векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), кодирующие  $\gamma$ -саркогликан, и способы доставки таких векторов, кодирующих  $\gamma$ -саркогликан, в мышцу для уменьшения или предупреждения фиброза; для поддержания или улучшения мышечной функции; для увеличения мышечной силы; для увеличения выносливости мышц; или для лечения  $\gamma$ -саркогликанопатии у субъекта-млекопитающего, страдающего мышечной дистрофией.

Кроме того, согласно раскрытию предложены терапии и подходы с использованием векторов генной терапии для доставки  $\gamma$ -саркогликана с адресацией дефекта гена, наблюдаемого при LGMD2C (тазово-плечевой дистрофии типа 2C). В одном аспекте в данном документе предложен способ одного или более из следующего: лечение  $\gamma$ -саркогликанопатии; увеличение мышечной силы, выносливости мышц и/или мышечной массы; уменьшение фиброза; уменьшение вызванного сокращениями повреждения; уменьшение жировой инфильтрации; и/или уменьшение центральной нуклеации у субъекта, нуждающегося в этом, и/или лечение мышечной дистрофии, уменьшая дегенерацию волокон или некротические волокна; уменьшение воспаления; повышение уровней креатинкиназы; лечение атрофии и гипертрофии мышечного волокна, и/или уменьшение дистрофического обызвествления у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, причем данные способы включают или по существу состоят из или еще дополнительно состоят из введения субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), где вектор gAAV содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из экспрессионной кассеты гена, которая содержит или по существу со-

стоит из или еще дополнительно состоит из полинуклеотидной последовательности, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан под транскрипционным контролем промотора, причем указанная кассета фланкирована одним или более инвертированными концевыми повторами AAV.

В одном аспекте в данном документе описан рекомбинантный вектор AAV (rAAV), содержащий или по существу состоящий из или еще дополнительно состоящий из полинуклеотидной последовательности, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан под транскрипционным контролем промотора. В некоторых воплощениях полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из последовательности, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, и кодирует белок, который сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана. В некоторых воплощениях полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, или последовательности, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, и кодирует белок, который сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана, который в одном аспекте сохраняет нуклеотидные замены SEQ ID NO: 1, по сравнению с соответствующими нуклеотидами в человеческом полинуклеотиде дикого типа, кодирующем  $\gamma$ -саркогликан.

В другом аспекте вектор rAAV, описанный в данном документе, содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из полинуклеотидной последовательности, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан, которая обладает по меньшей мере 65%-ной, по меньшей мере 70%-ной, по меньшей мере 75%-ной, по меньшей мере 80%-ной, 81%-ной, 82%-ной, 83%-ной, 84%-ной, 85%-ной, 86%-ной, 87%-ной, 88%-ной или 89%-ной, более типично по меньшей мере 90%-ной, 91%-ной, 92%-ной, 93%-ной или 94%-ной и даже более типично по меньшей мере 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и белок сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана.

Активность  $\gamma$ -саркогликана имеет решающее значение для функции мышц.  $\gamma$ -Саркогликан является одним из нескольких сарколеммальных трансмембранных гликопротеинов, которые взаимодействуют с дистрофином и образуют комплекс дистрофин-гликопротеин, который охватывает сарколемму и состоит из дистрофина, синтрофина,  $\alpha$ -дистрогликанов и  $\beta$ -дистрогликанов и саркогликанов, включая  $\gamma$ -саркогликан. Комплекс дистрофин-гликопротеин обеспечивает структурную связь между субсарколеммальным цитоскелетом и внеклеточным матриксом мышечных клеток. Неограничивающие примеры мышечных клеток включают мышечные клетки сердца, диафрагмы, ноги, тазового пояса, плеча и руки. Кроме того, неограничивающие примеры активности  $\gamma$ -саркогликана и последствия  $\gamma$ -саркогликанопатии описаны в Blake et al. (2002) *Physiol Rev.*; 82(2):291-329 и Tarakci et al. (2016) *Front Biosci (Landmark Ed)*; 21:744-56.

В другом аспекте векторы rAAV, описанные в данном документе, могут быть функционально связаны с промотором и/или регуляторным элементом, специфичным в отношении мышцы, для ограничения экспрессии мышц. Например, регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы, представляет собой элемент гена актина скелета человека (номер доступа в GenBank NG\_006672.1), элемент гена сердечного актина (номер доступа в GenBank NG\_007553.1), миоцит-специфичный энхансер связывающий фактор MEF (номер доступа в GenBank NG\_016443.2), креатинкиназу мышц (MCK - от англ. muscle creatine kinase) (номер доступа в GenBank. AF188002.1), tMCK (усеченная MCK), тяжелую цепь миозина (MHC - от англ. myosin heavy chain), MHC7 (гибридная версия MHC и MCK), C5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышечной креатинкиназы, элемент гена тропонина C быстро сокращающейся скелетной мышцы, элемент гена тропонина C медленно сокращающейся сердечной мышцы, элемент гена тропонина I медленно сокращающейся мышцы, ядерные факторы, индуцируемые гипоксией, стероид-индуцибельный элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE - от англ. glucocorticoid response element).

В некоторых воплощениях промотор, специфичный в отношении мышцы, представляет собой MHC7 (SEQ ID NO: 4) или его эквивалент. Иллюстративный вектор rAAV, описанный в данном документе, представляет собой rAAV.MHC7.hSCGC, который содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 или ее эквивалента; где промотор MHC7 охватывает нуклеотиды 136-927, интрон CMV охватывает нуклеотиды 937-1084, последовательность  $\gamma$ -саркогликана охватывает нуклеотиды 1094-1968 и polyA охватывает нуклеотиды 1976-2028. В некоторых случаях rAAV.MHC7.hSCGC упакован в капсид AAV rh74.

AAV может представлять собой любой серотип, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 или AAV rh74. В некоторых воплоще-

ниях вектор гAAV содержит последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV2.

Продукция псевдотипированного гAAV раскрыта, например, в WO 01/83692. Другие типы вариантов гAAV, например гAAV с мутациями капсида, также рассматриваются. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014).

Композиции, содержащие или по существу состоящие из любого из векторов гAAV, описанных в данном документе, также рассматриваются.

Также предложены способы получения частицы рекомбинантного вектора AAV, включающие культивирование клетки, которая была трансфицирована любым рекомбинантным вектором AAV, описанным в данном документе, и выделение частиц рекомбинантного AAV из супернатанта трансфицированных клеток. Вирусные частицы, содержащие или по существу состоящие из любого из рекомбинантных векторов AAV, описанных в данном документе, также рассматриваются.

Также предложены способы уменьшения фиброза у нуждающегося в этом субъекта, являющегося млекопитающим. В этой связи, способ включает или по существу состоит из или еще дополнительно состоящий из введения субъекту, являющемуся млекопитающим, терапевтически эффективного количества вектора AAV, описанного в данном документе (или композиции, содержащей или по существу состоящей из вектора AAV, описанного в данном документе). В некоторых воплощениях субъект, являющийся млекопитающим, страдает мышечной дистрофией. В некоторых воплощениях введение вектора AAV, описанного в данном документе (или композиции, содержащей или по существу состоящей из вектора AAV, описанного в данном документе), уменьшает фиброз в скелетной мышце или в сердечной мышце субъекта.

В другом аспекте в данном документе описан способ увеличения мышечной силы или мышечной массы или выносливости мышцы у субъекта, являющегося млекопитающим, включающий или по существу состоящий из или еще дополнительно состоящий из введения субъекту, являющемуся млекопитающим, терапевтически эффективного количества вектора AAV, описанного в данном документе (или композиции, содержащей или по существу состоящей из вектора AAV, описанного в данном документе).

В любом из способов по раскрытию субъект может страдать мышечной дистрофией, такой как тазово-плечевая мышечная дистрофия или любая другая мышечная дистрофия, ассоциированная с дистрофином.

Также предложен способ лечения мышечной дистрофии у субъекта, являющегося млекопитающим, включающий или по существу состоящий из или еще дополнительно состоящий из введения терапевтически эффективного количества вектора AAV, описанного в данном документе (или композиции, содержащей или по существу состоящей из вектора AAV, описанного в данном документе) субъекту, являющемуся млекопитающим. В некоторых воплощениях мышечная дистрофия представляет собой тазово-плечевую мышечную дистрофию.

В любом из способов по раскрытию гAAV вводят любым соответствующим способом введения, например, посредством внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом способе по раскрытию гAAV вводят системно, как например, парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации.

Композиции по раскрытию приготовлены для внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, композиции по раскрытию приготовлены для системного введения, такого как, парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации.

Кроме того, любая из композиций, приготовленных для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией (такой как тазово-плечевая мышечная дистрофия или любая другая мышечная дистрофия, ассоциированная с дистрофином). Также в данном документе описаны комбинированные терапии, включающие или по существу состоящие из одной или более композиций, раскрытых в данном документе, и кортикостероида. В данном документе предложены клетки-хозяева, содержащие вектор гAAV по данному раскрытию. Кроме того, в данном документе предложены наборы, содержащие любое одно или более воплощений, раскрытых в данном документе, и инструкции для применения. Наборы могут содержать или по существу состоять из одной или более композиций, раскрытых в данном документе, и кортикостероида или одной или более комбинированных терапий, предложенных в данном документе. В любом из применений по раскрытию лекарственное средство приготовлено для введения, например, внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. Кроме того, в любом из применений по раскрытию лекарственное средство приготовлено для системного введения, такого как парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации. Кроме того, любое из лекарственных средств может быть получено для введения субъекту, страдающему мышечной дистрофией (такой как тазово-плечевая мышечная дистрофия или любая другая мышечная дистрофия, ассоциированная с дистрофином).

Вышеприведенные абзацы не предназначены для определения каждого аспекта изобретения, и дополнительные аспекты описаны в других разделах, таких как Подробное Описание. Весь документ предназначен для того, чтобы быть связанным как единое раскрытие, и следует понимать, что рассматриваются все комбинации признаков, описанных в данном документе, даже если комбинация признаков не обнаружена вместе в одном и том же предложении или абзаце или разделе данного документа. изобре-

тение включает, как дополнительный аспект, все воплощения изобретения, более узкие в объеме каким-либо образом, чем изменения, определенные конкретными абзацами выше. Например, в случае, когда определенные аспекты изобретения описаны как род, следует понимать, что каждый член рода, по отдельности, представляет собой аспект изобретения.

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображен вектор AAV (scAAVrh74.MHCK7.hSGCG), содержащий полноразмерную кДНК человеческого  $\gamma$ -саркогликана (hSCGB) с оптимизированными кодонами (SEQ ID NO: 1). Конструкция фланкирована двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV, размером примерно 100 п.н., включает кДНК человеческого  $\gamma$ -саркогликана (hSGCG) с оптимизированными кодонами, химерный интрон (Интрон), синтетический сигнал полиаденилирования (pA), и управляется промотором MHCK7, специфичным в отношении скелетной и сердечной мышцы.

На фиг. 2 изображено окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) передней большеберцовой (TA - от лат. tibialis anterior) мышцы от мышей BL6 WT в возрасте 8 недель и мышцей, нокаутированной по  $\gamma$ -саркогликану ( $\gamma$ -SG KO), демонстрирующих фенотип дистрофии у больных мышцей.

На фиг. 3A-3C изображена активность вектора *in vivo*. scAAVrh74.MHCK7.hSGCG инъецировали в большеберцовую (TA) мышцу мышцей  $\gamma$ -SG KO в общей дозе  $3 \times 10^{10}$  vg. На фиг. 3A показано иммунофлуоресцентное окрашивание мышцы TA у мышцей  $\gamma$ -SG KO. Почти 100%-ная экспрессия белка  $\gamma$ -саркогликан в саркомере происходила в результате доставки вектора. На фиг. 3B показан вестерн-блоттинг в случае экспрессии  $\gamma$ -саркогликана в инъецированных TA мышцах от обработанных мышцей #794, 795. На фиг. 3C показано иммунофлуоресцентное окрашивание TA мышцей у контрольных мышцей дикого типа ("BL6 WT TA") или неинъецированных контрольных мышцей  $\gamma$ -SG KO ("GSG KO TA"), а также неокрашенный образец ("GSG KO No Primary").

На фиг. 4A-4B изображена активность вектора *in vivo* и токсичность у мышцей BL6 дикого типа (WT). На фиг. 4A показано иммунофлуоресцентное окрашивание, указывающее на сверхэкспрессию  $\gamma$ -саркогликана, посредством окрашивания мембраны и внутриклеточного окрашивания. На фиг. 4B показан вестерн-блоттинг, показывающий сверхэкспрессию  $\gamma$ -саркогликана в инъецированной LTA мышцей.

На фиг. 5 изображена активность вектора *in vivo* и токсичность у мышцей BL6 дикого типа (WT). H&E окрашивание неинъецированных и инъецированных TA мышцей BL6 WT не демонстрирует токсичности при полном отсутствии каких-либо центральных ядер, некротических волокон, воспалительной инфильтрации или фиброзной ткани.

На фиг. 6 изображено иммунофлуоресцентное окрашивание  $\gamma$ -саркогликана на TA, икроножной мышцей (GAS), четырехглавой мышцей (QUAD), ягодичной мышцей (GLUT), поясничной мышцей (PSOAS), трицепсе (TRICEP), диафрагме и сердечной мышцей, демонстрирующее обширную экспрессию  $\gamma$ -саркогликана.

На фиг. 7 изображено иммунофлуоресцентное окрашивание тканей при определении активности вектора при в.в. введении. IF-окрашивание  $\gamma$ -саркогликана в разных скелетных мышцах, диафрагме и сердце демонстрирует сильную экспрессию с редкими негативными волокнами через 6 недель после системной доставки scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG.

На фиг. 8A-8B показана экспрессия SGCG у животных, обработанных в.в. Иммунофлуоресцентная визуализация скелетных мышцей, диафрагмы и сердца от SGCG<sup>-/-</sup> мышцей, которым внутривенно инъецировали общую дозу  $1 \times 10^{13}$  vg scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG, показана на репрезентативных изображениях 20X (фиг. 8A). Вестерн-блоттинг демонстрирует экспрессию hSGCG во всех скелетных мышцах и сердце от мышцей, которым обеспечивали внутривенную доставку scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG (фиг. 8B).

На фиг. 9A-9B показана гистологическая оценка тканей после системной обработки. Окрашивание гематоксилином и эозином скелетных мышцей TRI и DIA у мышцей BL6 WT, необработанных SGCG<sup>-/-</sup> и AAV.MHCK7.hSGCG-обработанных SGCG<sup>-/-</sup> мышцей демонстрирует купирование патологии-дистрофии после обработки (фиг. 9A). Количественная оценка процентного содержания волокон с центральной нуклеацией демонстрирует уменьшение в обработанных мышцах. BL6 WT (n равен 5), необработанные SGCG<sup>-/-</sup> (n равен 6), AAV.MHCK7.hSGCG-обработанные (n равен 5) (фиг. 9B). \*\*\* означает p меньше 0,001, \*\*\*\* означает p меньше 0,0001.

На фиг. 10A-10F показана количественная оценка диаметра волокон. Количественную оценку диаметров волокон проводили в GAS (фиг. 10A), PSOAS (фиг. 10B) и TRI (фиг. 10C) BL6 WT (n равен 5), необработанных SGCG<sup>-/-</sup> (n равен 6) и AAV.MHCK7.hSGCG-обработанных SGCG<sup>-/-</sup> (n=5) мышцей, и нормализацию распределения волокон по диаметру после обработки. Средний диаметр волокон уменьшен в GAS (фиг. 10D), PSOAS (фиг. 10E) и TRI (фиг. 10F) мышцей необработанных SGCG<sup>-/-</sup> мышцей и увеличен до уровней WT в каждой мышцей после обработки AAV.MHCK7.hSGCG у мышцей SGCG<sup>-/-</sup>. \*\*\*\* представляет собой p меньше 0,0001.

На фиг. 11A-11C показана физиология TA и диафрагмы. TA и DIA мышцей BL6 WT (n равен 5), необработанных SGCG<sup>-/-</sup> (n равен 6) и AAV.MHCK7.hSGCG-обработанных (n равен 5) мышцей, подвергавшихся измерению нормированной продукции удельной силы. TA мышцей, подверженная протоколу повреждения, вызванного эксцентрическими сокращениями (фиг. 11A). Наблюдали улучшение в удельной

силе TA на выходе и устойчивость к повреждению, вызванному сокращениями, у обработанных SGCG-/- мышей (фиг. 11B). Удельная сила DIA на выходе восстанавливалась до уровней WT у обработанных SGCG-/- мышей (фиг. 11C). \* означает p меньше 0,05, \*\*\*\* означает p меньше 0,0001.

На фиг. 12 показан лазерный мониторинг активности в камере "открытое поле". Суммарная способность передвигаться в плоскостях x и y уменьшена у SGCG-/- мышей и улучшена у AAV.MHCK7.hSGCG-обработанных мышей. BL6 WT (n равен 6), необработанные SGCG-/- (n равен 6) и AAV.MHCK7.hSGCG-обработанные (n равен 5).

На фиг. 13 показано биораспределение геномов вектора. Распределение геномов вектора среднего количества копий vg на микрограмм геномной ДНК (гДНК) измеряли в разных тканях от двух SGCG-/- мышей через 3 месяца после в.в. доставки общей дозы  $1e13$  vg scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG.

На фиг. 14A-14B показано сравнение АЛТ (аланинаминотрансфераза) и АСТ (аспартатаминотрансфераза) в сыворотке. Сыворотку от мышей BL6 WT (n равен 6), необработанных SGCG-/- мышей (n равен 6) и AAV.MHCK7.hSGCG - обработанных в.в. SGCG-/- мышей (n равен 5) (общая доза  $1e13$  vg) анализировали в отношении уровней биохимических компонентов. Уровни ферментов печени аспартатаминотрансферазы (АЛТ, фиг. 14A) и аспартатаминотрансферазы (АСТ, фиг. 14B) были повышены у больных SGCG-/- мышей и восстанавливались почти до уровней WT после обработки. \* означает p меньше 0,05. Пунктирные линии представляют нижнюю и верхнюю границы нормального интервала.

### Подробное описание

Настоящее раскрытие относится к введению вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), содержащего полинуклеотид, экспрессирующий  $\gamma$ -саркогликан, для уменьшения или полного купирования мышечного фиброза у индивида, страдающего тазово-плечевой мышечной дистрофией. Как продемонстрировано в разделе примеры, введение вектора гAAV, описанного в данном документе, приводило к восстановлению экспрессии  $\gamma$ -саркогликана у нокаутированных мышей. Введение вектора гAAV, описанного в данном документе, будет приводить к устранению признаков дистрофии, включая меньшее количество дегенерирующих волокон, пониженный уровень воспаления и улучшенное восстановление функции, в результате защиты от эксцентрического сокращения с увеличенной генерацией силы. Раскрытие охватывает лечение тазово-плечевой мышечной дистрофии у субъекта (например, субъекта, являющегося человеком) посредством введения вектора гAAV, описанного в данном документе.

В настоящем описании подразумевается, что любой интервал концентраций, интервал величин, выраженных в процентах, интервал долей или интервал целых чисел включает значение любого целого числа в пределах перечисленного интервала, и, в соответствующих случаях, его доли (как например, одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано иное. Следует понимать, что термины в единственном числе, в том виде, в котором они используются в данном документе, относятся к "одному или более" из перечисленных компонентов, если не указано иное. Следует понимать, что применение альтернативы (например, "или") подразумевает один, оба или их любую комбинацию данных альтернативных вариантов. В том виде, в котором они используются в данном документе, термины "включает" и "содержит" используются взаимозаменяемо. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "множество" может относиться к одному или более компонентам (например, одной или более целевым последовательностям мРНК (микроРНК)). В данной заявке применение "или" означает "и/или", если не указано иное.

В том виде, в котором они используются в данной заявке, термины "примерно" и "приблизительно" используются как эквиваленты. Подразумевается, что любые числительные, используемые в данной заявке с или без термина примерно/приблизительно, охватывают любые нормальные отклонения, оцениваемые обычным специалистом в данной области. В некоторых воплощениях термин "приблизительно" или "примерно" относится к интервалу значений, которые попадают в 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или меньше в любом направлении (больше чем или меньше чем) установленного референсного значения, если не указано иное или иное не является очевидным из контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100% от возможного значения).

Термин "снижает" или "уменьшает" относится к снижению или уменьшению конкретного значения по меньшей мере на 5%, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100%, по сравнению с референсным значением. Снижение или уменьшение конкретного значения может быть также представлено как кратное изменение в значении, по сравнению с референсным значением, например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000-кратное или более снижение, по сравнению с референсным значением.

Термин "увеличивает" относится к увеличению конкретного значения по меньшей мере на 5%, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100, 200, 300, 400, 500% или более, по сравнению с референсным значением. Увеличение конкретного значения может быть также представлено как кратное изменение в значении, по сравнению с референсным значением, например, по меньшей мере 1-кратное, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000-кратное или более увеличение, по сравнению с уровнем референсного значения.

"Комплементарность" относится к способности образовывать пару, благодаря стекингу оснований и специфичному образованию водородных связей между двумя последовательностями, содержащими встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе (например, модифицированные, как описано выше) основания (нуклеотиды) или их аналоги. Например, если основание в одном положении нуклеиновой кислоты способно образовывать водородные связи с основанием в соответствующем положении мишени, тогда основания считаются комплементарными друг другу в данном положении. Нуклеиновые кислоты могут содержать универсальные основания или инертные спейсеры с удаленным азотистым основанием, которые не обеспечивают ни позитивного, ни негативного вклада в образование водородных связей. Спаривание оснований может включать как классическое спаривание оснований по Уотсону-Крику, так и спаривание оснований не по Уотсону-Крику (например, неоднозначное спаривание оснований и спаривание оснований по Хугстену). Считается, что для комплементарного спаривания оснований основания типа аденозина (А) комплементарны основаниям типа тимидина (Т) или основаниям типа урацила (U), что основания типа цитозина (С) комплементарны основаниям типа гуанозина (G), и что универсальные основания, такие как 3-нитропиррол или 5-нитроиндол, могут гибридизоваться с и считаются комплементарными любому А, С, U или Т. Nichols et al., *Nature*, 1994;369:492-493 и Loakes et al., *Nucleic Acids Res.*, 1994;22:4039-4043. В данной области также считается, что инозин (I) является универсальным основанием и считается комплементарным любому А, С, U или Т. См. Watkins and Santa-Lucia, *Nucl. Acids Research*, 2005; 33 (19): 6258-6267.

Термин "субъект" включает животных, таких как, например, млекопитающие. В некоторых воплощениях млекопитающее представляет собой примата. В некоторых воплощениях млекопитающее представляет собой человека. В некоторых воплощениях субъекты представляют собой сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы, козы, коровы, свиньи и тому подобное; или одомашненных животных, таких как собаки и кошки. В некоторых воплощениях (например, в частности, в контексте исследований) субъекты представляют собой грызунов (например, мыши, крысы, хомяки), кроликов, приматов или свиней, таких как инбредные свиньи и тому подобное. Термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо в данном документе.

"Введение" в данном документе относится к введению субъекту агента или композиции.

Термин "Лечение", в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к доставке агента или композиции субъекту для воздействия на физиологическое последствие. В некоторых воплощениях лечение относится к лечению заболевания у субъекта, например, у человека, включающему (а) ингибирование заболевания, например, прекращение развития заболевания или предупреждение прогрессирования заболевания; (б) облегчение заболевания, например, вызывая регрессию состояния заболевания; (в) излечение заболевания; и (г) предупреждение начала заболевания, например, прекращение развития заболевания у бессимптомного субъекта, идентифицированного как носитель генетического дефекта. В одном аспекте лечение исключает профилактику или предупреждение.

Когда заболевание представляет собой мышечную дистрофию следующие клинические конечные точки представляют собой неограничивающие примеры лечения: уменьшение удельной силы, увеличение устойчивости к повреждению, увеличение мышечной силы, увеличение выносливости мышц, увеличение мышечной массы, уменьшение повреждения, вызванного сокращениями, уменьшение жировой инфильтрации, уменьшение центральной нуклеации, уменьшение дегенерации волокон или некротических волокон, уменьшение воспаления, повышение уровней креатинкиназы, уменьшение атрофии и гипертрофии мышечного волокна и/или уменьшение дистрофического обызвествления.

Когда заболевание представляет собой фиброз, следующие клинические конечные точки представляют собой неограничивающие примеры лечения: уменьшение фиброзной ткани, уменьшение воспаления, уменьшение фибробластных очаговых поражений, уменьшение активированной пролиферации фибробластов, уменьшение образования миофибробластов, уменьшение скорости снижения форсированной жизненной емкости (FVC - от англ. Forced Vital Capacity), где FVC представляет собой общее количество воздуха, выдыхаемого во время тестирования функции легких, абсолютное и относительное повышения относительно исходного уровня в FVC, абсолютное повышение относительно исходного уровня в FVC (% прогнозируемый), увеличение периода выживаемости без прогрессирования, уменьшение относительно исходного уровня общего балла по респираторному опроснику больницы Святого Георгия (SGRQ - от англ. St George's Respiratory Questionnaire), где SGRQ представляет собой опросник для оценки связанного со здоровьем качества жизни, разделенный на 3 компонента: симптомы, активность и влияние, и общий балл (суммарный вес) может находиться в интервале от 0 до 100, причем более низкий балл означает лучше состояние здоровья, и относительное снижение относительно исходного уровня балла количественной оценки фиброза легких (QLF - от англ. quantitative lung fibrosis) на основе компьютерной томографии высокого разрешения (HRCT - от англ. high resolution computerized tomography), где балл QLF находится в интервале от 0 до 100%, и более высокие значения представляют большее количество фиброза легкого и считаются худшим состоянием здоровья. Неограничивающие примеры клинических конечных точек для лечения фиброза и тестирования, которые могут быть выполнены для оценки указанных клинических конечных точек, описаны в следующих клинических испытаниях: NCT03733444 ([clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03733444](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03733444)) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT00287729 ([clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00287729](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00287729))

als.gov/ct2/show/NCT00287729) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT00287716 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00287716) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT02503657 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02503657) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT00047645 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00047645) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT02802345 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02802345) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT01979952 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01979952) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT00650091 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00650091) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT01335464 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01335464) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT01335477 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01335477) (последний доступ 9 января 2019 года), NCT01366209 (clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01366209) (последний доступ 9 января 2019 года). Дополнительные неограничивающие примеры клинических конечных точек для лечения фиброза и тестирования, которые могут быть проведены для измерения указанных клинических конечных точек, описаны в King et al. (2014) N Engl J Med. May 29; 70(22):2083-92 и Richeldi et al., (2014) N Engl J Med. May 29; 370(22):2071-82.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к минимальному количеству агента или композиции, требующемуся для того, чтобы привести к конкретному физиологическому действию (например, количество, требуемое для повышения, активации или усиления конкретного физиологического действия). Эффективное количество или терапевтически эффективное количество конкретного агента может быть представлено множеством путей в зависимости от природы агента, как например, отношение масса/объем, число клеток/объем, число частиц/объем, (масса агента)/(масса субъекта), число клеток/(масса субъекта) или число частиц/(масса субъекта). Эффективное количество или терапевтически эффективное количество конкретного агента может быть также выражено как полумаксимальная эффективная концентрация ( $EC_{50}$ ), которая относится к концентрации агента, которая приводит к величине конкретного физиологического ответа, которая находится в середине между контрольным уровнем и максимальным уровнем ответа.

"Популяция" клеток относится к любому числу клеток больше чем 1, но предпочтительно составляет по меньшей мере  $1 \times 10^3$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^4$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^7$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^8$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^9$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$  клеток или более клеток. Популяция клеток может относиться к популяции *in vitro* (например, популяция клеток в культуре) или популяции *in vivo* (например, популяция клеток, находящихся в конкретной ткани).

Фраза "фармацевтически приемлемый" используется в данном документе для ссылки на те соединения, вещества, композиции и/или лекарственные формы, которые находятся в пределах объема обоснованного врачебного решения, подходящие для применения в контакте с тканями человека и животных без избыточной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соответствующие разумному соотношению польза/риск.

В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество" без ограничения включает любой адъювант, носитель, вспомогательное вещество, вещество, способствующее скольжению, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/краску, усилитель вкуса и запаха, поверхностно-активное вещество, увлажнитель, диспергирующее средство, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель, поверхностно-активное вещество или эмульгатор, который был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США в качестве приемлемого для применения у человека и/или домашних животных.

В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к переносу или транспортировке молекулы нуклеиновой кислоты в клетку наряду с, в вирусном векторе, одним или более вирусными белками, как например, в случае инкапсулированных вирусов, капсидом вируса. Переносимая нуклеиновая кислота обычно связана с, например, вставлена в молекулу нуклеиновой кислоты вектора. Вектор может включать последовательности, которые направляют автономную репликацию или обратную транскрипцию в клетке или может включать последовательности, достаточные для обеспечения интеграции в ДНК клетки-хозяина. Термин "векторы" включает векторы генной терапии. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "вектор генной терапии" относится к вектору, способному к применению в проведении генной терапии, например, доставке субъекту полинуклеотидной последовательности, кодирующей терапевтический полипептид. Векторы генной терапии могут содержать полинуклеотид ("трансген"), кодирующий белок, например,  $\gamma$ -саркогликан.

В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "экспрессионная кассета" относится к сегменту ДНК, который способен в соответствующем расположении управлять экспрессией полинуклеотида (например, трансгена), кодирующего белок (например,  $\gamma$ -саркогликан), который включен в указанную экспрессионную кассету. При введении в клетку-хозяина экспрессионная кассета *inter alia* способна направлять механизм клетки для транскрипции трансгена в РНК, которая затем обычно допол-

нительно процессируется и в конечном итоге транслируется в терапевтически активный полипептид. Вектор генной терапии может содержать или по существу состоять из экспрессионной кассеты. Термин "экспрессионная кассета" исключает полинуклеотидные последовательности от 5' к 5' ITR и от 3' к 3' ITR. В данном документе предложены клетки-хозяева, содержащие или по существу состоящие из или еще дополнительно состоящие из вектора gAAV по данному раскрытию. Данные клетки могут принадлежать к любому соответствующему виду, например, клеткам млекопитающих.

В том виде, в котором они используются в данном документе, фразы "функционально связанный" или "под транскрипционным контролем" в отношении полинуклеотида относятся, взаимозаменяемо, к конфигурации промотора или специфичного в отношении мышцы регуляторного элемента и полинуклеотида, который позволяет транскрибироваться полинуклеотиду посредством полимеразы, способной связываться с промотором. В одном аспекте регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы, должен ограничивать экспрессию мышц. Неограничивающие примеры регуляторных элементов, специфичных в отношении мышцы, представляют собой элемент гена актлина скелета человека (номер доступа в GenBank NG\_006672.1), элемент гена сердечного актлина (номер доступа в GenBank NG\_007553.1), миоцит-специфичный энхансер связывающий фактор MEF (номер доступа в GenBank NG\_016443.2), креатинкиназу мышц (МСК) (номер доступа в GenBank. AF188002.1), tMCK (усеченная МСК), тяжелую цепь миозина (МНС), МНСК7 (гибридная версия МНС и МСК), C5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышшиной креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстросокращающейся скелетной мышцы, элемент гена тропонина С медленно сокращающейся сердечной мышцы, элемент гена тропонина I медленно сокращающейся мышцы, ядерные факторы, индуцируемые гипоксией, стероид-индуцибельный элемент или глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE).

Обычные способы в молекулярной и клеточной биохимии можно обнаружить в таких стандартных руководствах по молекулярному клонированию: *A Laboratory Manual*, 3rd Ed. (Sambrook et al., HarBor Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); *Protein Methods* (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); *Nonviral Vectors for Gene Therapy* (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); *Viral Vectors* (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995); *Immunology Methods Manual* (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); и *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "AAV" представляет собой стандартное сокращение для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой парвовирус на основе одноцепочечной ДНК, который растет только в клетках, в котором определенные функции обеспечены посредством совместного инфицирования с хэлперным вирусом. Общая информация и обзоры AAV можно обнаружить, например, в Carter, 1989, *Handbook of Parvoviruses*, Vol. 1, pp. 169- 228 и Berns, 1990, *Virology*, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York). Можно ни на секунду не сомневаться, что те же принципы, описанные в данных обзорах, будут применимы к дополнительным серотипам AAV, охарактеризованным с дат публикаций обзоров, поскольку хорошо известно, что разные 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.; and Rose, *Comprehensive Virology* 3: 1-61 (1974)). Например, все серотипы AAV очевидно демонстрируют очень похожие свойства репликации, опосредованные гомологичными генами *g<sub>er</sub>*; и все несут три родственных капсидных белка, таких как белки, экспрессируемые в AAV2. О степени родства дополнительно говорит гетеродуплексный анализ, при котором обнаруживается масштабная перекрестная гибридизация среди серотипов по длине генома; и наличие аналогичных сегментов с самоотжигом на концах, которые соответствуют "последовательностям инвертированных концевых повторов" (ITR). Похожие картины инфективности также дают основания предполагать, что функции репликации в каждом серотипе находятся под похожим регуляторным контролем.

Термин "вектор AAV", в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к вектору, содержащему один или более исследуемых полинуклеотидов (или трансгенов), которые фланкированы последовательностями концевых повторов AAV (ITR). Такие векторы AAV могут быть реплицированы и упакованы в инфекционные вирусные частицы, когда присутствуют в клетке-хозяине, которая трансфицирована вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов *g<sub>er</sub>* и *cap*.

Термин "вирион AAV" или "вирусная частица AAV" или "частица с вектором AAV" относится к вирусной частице, состоящей по меньшей мере из одного капсидного белка AAV и заключенного в капсид полинуклеотидного вектора AAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (а именно, полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, как такой как трансген, подлежащий доставке в клетку млекопитающего), она обычно называется "частицей с вектором AAV" или просто "вектором AAV". Таким образом, продукция частицы с вектором AAV обязательно включает продукцию вектора AAV, в связи с этим вектор содержится в частице с вектором AAV.

Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой парвовирус, дефектный по репликации, геном которого, на основе одноцепочечной ДНК, составляет примерно 4,7 т.п.н. в длину, включая два инвертированных концевых повтора (ITR) из 145 нуклеотидов. Существует множество серотипов AAV.

Известны нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV. Например, полный геном AAV-1 предоставлен в GenBank, номер доступа NC\_002077; полный геном AAV-2 предоставлен в GenBank, номер доступа NC\_001401 и Srivastava et al., *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983); полный геном AAV-3 предоставлен в GenBank, номер доступа NC\_1829; полный геном AAV-4 предоставлен в GenBank, номер доступа NC\_001829; геном AAV-5 предоставлен в GenBank, номер доступа AF085716; полный геном AAV-6 предоставлен в GenBank, номер доступа NC\_001862; по меньшей мере части геномов AAV-7 и AAV-8 предоставлены в GenBank, номера доступа AX753246 и AX753249, соответственно; геном AAV-9 предоставлен в Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 предоставлен в *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 предоставлен в *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). Последовательность генома AAV rh.74 предоставлена в патенте США 9434928, включенном в данный документ посредством ссылки. Cis-действующие последовательности, направляющие репликацию вирусной ДНК (гер), заключение в капсид/упаковку и интеграцию хромосом клетки-хозяина, содержатся в пределах ITR AAV. Три промотора AAV (называемые p5, p19 и p40 для их соответствующих положений на карте) регулируют экспрессию двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены гер и сар. Данные два промотора гер (p5 и p19), наряду с дифференциальным сплайсингом единственного интрона AAV (на уровне нуклеотидов 2107 и 2227), приводят к продукции четырех белков гер (гер 78, гер 68, гер 52 и гер 40) от гена гер. Белки гер обладают множеством ферментативных свойств, которые в конечном итоге отвечают за репликацию вирусного генома. Ген сар экспрессируется с промотора p40, и он кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты инициации трансляции обуславливают продукцию трех родственных капсидных белков. Один консенсусный сайт полиаденилирования расположен в положении на карте 95 генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

AAV обладает уникальными признаками, которые делают его привлекательным в качестве вектора для доставки в клетки чужеродной ДНК, например, в генной терапии. Инфицирование клеток AAV в культуре не является цитопатическим, и природное инфицирование человека и других животных является молчаливым и бессимптомным. Кроме того, AAV инфицирует много клеток млекопитающих, делая возможным нацеливание во многие разные ткани *in vivo*. Кроме того, AAV трансдуцирует медленно делящиеся и неделяющиеся клетки, и может по существу продолжать существовать на протяжении всей жизни тех клеток в виде транскрипционно активной ядерной эписомы (внехромосомный элемент). Геном провируса AAV вставляется в виде клонированной ДНК в плазмиды, что делает конструкцию рекомбинантных геномов возможной. Кроме того, поскольку сигналы, направляющие репликацию AAV и заключение генома в капсид, содержатся в ITR генома AAV, некоторая часть или все находящиеся внутри приблизительно 4,3 т.п.н генома (кодирующие белки репликации и структурные капсидные белки, гер-сар) могут быть замещены чужеродной ДНК. Для создания векторов AAV белки гер и сар могут быть предоставлены, будучи транс-активными. Другой значимый признак AAV заключается в том, что это крайне стабильный и сильный вирус. Он легко выдерживает условия, используемые для инактивации аденовируса (56°-65°C в течение нескольких часов), делая консервирование AAV холодом менее критичным. AAV может даже быть лиофилизирован. В конечном итоге, AAV-инфицированные клетки не являются устойчивыми к суперинфекции.

Множество исследований продемонстрировало длительную (больше 1,5 лет) экспрессию белка, опосредованную рекомбинантным AAV, в мышце. См., Clark et al., *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14082-14087 (1996); и Xiao et al., *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996). Также см. Chao et al., *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) и Chao et al., *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Кроме того, поскольку мышца является высоко васкуляризированной, трансдукция рекомбинантным AAV приводила 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). Кроме того, Lewis et al., *J Virol*, 76: 8769-8775 (2002) продемонстрировали, что скелетное мышечное волокно обладает необходимыми клеточными факторами для правильного гликозилирования, укладки и секреции антител, что указывает на то, что мышца способна к стабильной экспрессии секретлируемых белковых терапевтических средств. Геномы рекомбинантных AAV (rAAV) по раскрытию содержат или по существу состоят из или еще дополнительно состоят из молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан (например, SEQ ID NO: 1) и один или более ITR AAV, фланкирующих молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах rAAV может происходить из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, включая, но не ограничиваясь следующими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh74. Продукция псевдотипированного rAAV раскрыта, например, в WO 01/83692. Другие типы вариантов rAAV, например rAAV с мутациями капсида, также рассмотрены. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Нуклеотидные последовательности геномов разных серотипов AAV известны в данной области. Для стимуляции экспрессии, специфичной в отношении скелетной мышцы, могут быть использованы AAV1, AAV5, AAV6, AAV8 или AAV9. Таким образом, в одном аспекте в данном документе описан рекомбинантный вектор AAV, содержащий или по существу состоящий из полинуклеотидной последовательно-

сти, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан под транскрипционным контролем промотора и/или регуляторного элемента, специфичного в отношении мышцы. В некоторых воплощениях полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из последовательности, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной нуклеотидной последовательности человеческого  $\gamma$ -саркогликана с оптимизированными кодонами, которая изложена в SEQ ID NO: 1 (см. табл. 1) и кодирует белок, который сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана. В некоторых воплощениях полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, содержит нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1, или последовательность, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более обычно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует белок, который сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана.

Термин "идентичность последовательностей" относится к процентному содержанию оснований или аминокислот у двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностей, которые являются одинаковыми и находятся в одном и том же относительном положении. В связи с этим, одна полинуклеотидная или полипептидная последовательность обладает определенным процентом идентичности последовательностей, по сравнению с другой полинуклеотидной или полипептидной последовательностью. В случае сравнения последовательностей обычно одна последовательность служит референсной последовательностью, с которой сравниваются анализируемые последовательности. Термин "референсная последовательность" относится к молекуле, с которой сравнивают анализируемую последовательность. Полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область), обладающая определенным процентом (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) "идентичности последовательностей" с референсной последовательностью, означает, что при выравнивании процентное содержание оснований (или аминокислот) в каждом положении в анализируемой последовательности идентично основанию (или аминокислоте) в том же положении в референсной последовательности. Данное выравнивание и выраженную в процентах гомологию или идентичность последовательностей можно определять, используя программные обеспечения, известные в данной области, например, программные обеспечения, описанные в Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Предпочтительно, для выравнивания используют параметры, используемые по умолчанию. Одной программой для выравнивания является BLAST, в которой используются параметры по умолчанию. В частности, программы представляют собой BLASTN и BLASTP с использованием следующих параметров по умолчанию: генетический код - стандартный; фильтр - отсутствие; цепь - обе; пороговое значение - 60; ожидание - 10; матрица - BLOSUM62; Описания - 50 последовательностей; сортировать по - высокий показатель; Базы данных - избыточные, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR. Подробности данных программ можно найти по следующему интернет-адресу: [ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). "Эквивалент" полипептида или белка представляет собой пептид или белок, который обладает определенной идентичностью последовательностей с референсной последовательностью полипептида или белка (например, 60%-ная, 65%-ная, 70%-ная, 75%-ная, 80%-ная, 85%-ная, 90%-ная, 95%-ная, 98%-ная или 99%-ная идентичность с референсом) и сохраняет похожую активность или функцию, при сравнении с референсным полипептидом или белком.

Подразумевается, что термин "содержащий" или "содержит" означает, что композиции, например, среды, и способы включают перечисленные элементы, но, не исключая другие. Фраза "по существу состоящий из" при использовании для определения композиций и способов будет означать исключение других элементов какой-либо существенной значимости для комбинации для установленной цели. Таким образом, композиция, по существу состоящая из элементов, как определено в данном документе, не будет исключать другие вещества или стадии, которые материально не влияют на основную(ые) и новую(ые) характеристику(и) заявленного изобретения. Термин "состоящий из" будет подразумевать исключение элементов в количествах более, чем следовые, других ингредиентов и существенных стадий способа. Воплощения, определенные каждым из данных переходных терминов, находятся в пределах объема данного раскрытия.

В одном аспекте экспрессионная кассета с геном вектора gAAV по данному раскрытию фланкирована одним или более инвертированными концевыми повторами AAV. В другом аспекте полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан вектора gAAV, содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 1, и/или нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, и кодирует белок, который сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана. В еще одном аспекте полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан вектора gAAV, кодирует аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную, по меньшей мере на 99% идентичную или на 100% идентичную SEQ ID NO: 2, и кодирует белок, который сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана.

В некоторых воплощениях вектор gAAV, раскрытый в данном документе, принадлежит к серотипу

AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 или AAV rh74. В других воплощениях геном вектора gAAV содержит или по существу состоит из регуляторного элемента, специфичного в отношении мышцы, и где регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы, функционально связан с полинуклеотидной последовательностью. Неограничивающие примеры регуляторных элементов, специфичных в отношении мышцы, представляют собой элемент гена актина скелета человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфичный энхансер связывающий фактор mef, креатинкиназу мышц (МСК), усеченную МСК (tМСК), тяжелую цепь миозина (МНС), МНСК7, С5-12, энхансерный элемент мышинной креатинкиназы, элемент гена тропонина с быстросокращающейся скелетной мышцы, элемент гена тропонина с медленно сокращающейся сердечной мышцы, элемент гена тропонина I медленно сокращающейся мышцы, ядерные факторы, индуцируемые гипоксией, стероид-индуцибельный элемент и глюкокортикоид-отвечающий элемент (gre). В одном аспекте специфичный в отношении мышцы регуляторный элемент вектора gAAV представляет собой усеченную МСК (tМСК). В другом аспекте промотор и/или специфичный в отношении мышцы регуляторный элемент вектора gAAV представляет собой промотор МНСК7. В еще одном аспекте промотор МНСК7 содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3, или ее эквивалента, и обеспечивает промоторную функцию. В одном воплощении геном вектора gAAV, раскрытого в данном документе, содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из интрона, содержащего нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых воплощениях полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, или полинуклеотидной последовательности, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан, которая обладает по меньшей мере 65%-ной, по меньшей мере 70%-ной, по меньшей мере 75%-ной, по меньшей мере 80%-ной, 81%-ной, 82%-ной, 83%-ной, 84%-ной, 85%-ной, 86%-ной, 87%-ной, 88%-ной или 89%-ной, более типично по меньшей мере 90%-ной, 91%-ной, 92%-ной, 93%-ной или 94%-ной и даже более типично по меньшей мере 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 1, и сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана.

В другом аспекте рекомбинантный вектор AAV, описанный в данном документе, содержит или по существу состоит из полинуклеотидной последовательности, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан, которая обладает по меньшей мере 65%-ной, по меньшей мере 70%-ной, по меньшей мере 75%-ной, по меньшей мере 80%-ной, 81%-ной, 82%-ной, 83%-ной, 84%-ной, 85%-ной, 86%-ной, 87%-ной, 88%-ной или 89%-ной, более типично по меньшей мере 90%-ной, 91%-ной, 92%-ной, 93%-ной или 94%-ной и даже более типично по меньшей мере 95%-ной, 96%-ной, 97%-ной, 98%-ной или 99%-ной идентичностью последовательностей с аминокислотной последовательностью человеческого  $\gamma$ -саркогликана, которая изложена в SEQ ID NO: 2 (см. табл. 1), и данный белок сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана.

Таблица 1

## Неограничивающие примеры белковых и нуклеотидных последовательностей

Описание последовательности	Последовательность	SEQ ID NO
Нуклеотидная последовательность $\gamma$ -саркогликана человека (с оптимизацией кодонов)	ATGGTGAGGGAGCAGTACACCACAGCAACCGAGG GAATCTGCATCGAGAGGCCAGAGAACCAGTACGTG TATAAGATCGGCATCTACGGCTGGCGGAAGAGATG TCTGTATCTGTTTCGTGCTGCTGCTGCTGATCATCCT GGTGGTGAATCTGGCCCTGACCATCTGGATCCTGA AAGTGATGTGGTTTTCCCCAGCAGGAATGGGACAC CTGTGCGTGACAAAGGACGGACTGCGGGCTGGAGG GAGAGTCTGAGTTCCTGTTTCCCTGTATGCCAAGG AGATCCACAGCAGAGTGGATAGCTCCCTGCTGCTG CAGTCCACCCAGAACGTGACAGTGAACGCAAGGAA TAGCGAGGGAGAGGTGACCGGCAGACTGAAGGTC GGCCCCAAGATGGTGGAGGTGCAGAATCAGCAGTT CCAGATCAACTCCAATGACGGCAAGCCTCTGTTTAC AGTGGATGAGAAGGAGGTGGTGGTGGGCACCGAC AAGCTGAGGGTGACAGGACCTGAGGGCGCCCTGTT CGAGCACTCTGTGGAGACCCCACTGGTGCGCGCA	1

	GACCCTTTTCAGGATCTGAGGCTGGAGAGCCCAAC ACGCAGCCTGTCCATGGACGCACCCAGAGGCGTG CACATCCAGGCACACGCAGGCAAGATCGAGGCCCT GAGCCAGATGGATATCCTGTTCCACTCTAGCGACG GCATGCTGGTGTGGATGCCGAGACCGTGTGCCTG CCTAAGCTGGTGCAGGGCACATGGGGCCCATCTGG CTCCTCTCAGAGCCTGTACGAGATCTGCGTGTGCC CAGATGGCAAGCTGTATCTGTCCGTGGCCGGCGTG TCTACCACATGCCAGGAGCACAACCACATCTGTCTG TGA	
Аминокислотная последовательн ость $\gamma$ - саркогликана человека	MVREQYTTATEGICIERPENQYVYKIGIYGWRKCLYL FVLLLLIILVNLALTIWILKVMWFSPAGMGHLCVTKDG LRLEGESEFLPLYAKEIHSRVDSSLLLQSTQNVTVNA RNSEGEVTGRLKVGPKMVEVQNQQFQINSNDGKPLF TVDEKEVVVGTDKLRVTGPEGALFEHSVETPLVRADP FQDLRLESPTRSLSDAPRGVHIQAHAGKIEALSQMDI LFHSSDGMLVLDAETVCLPKLVQGTWGPSGSSQSLY EICVCPDGKLYLSVAGVSTTCQEHNHICL	2
5'ITR-МНСК7- Химерный интрон-hSGCG- PolyA-3'ITR (полноразмерная последовательн ость между ITR)	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CAAAGCCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTCGCC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGGGTTAACCAATTGGCGCGGCCGCAAGCTTGC ATGTCTAAGCTAGACCCCTCAGATTAATAAATACTG AGGTAAGGGCCTGGGTAGGGGAGGTGGTGTGAGA CGCTCCTGTCTCTCCTCTATCTGCCCATCGGCCCTT TGGGGAGGAGGAATGTGCCCAAGGACTAAAAAAG GCCATGGAGCCAGAGGGGCGAGGGCAACAGACCT TTCATGGGCAACCTTGGGGCCCTGCTGTCTAGCA TGCCCCACTACGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGA GGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTAT AATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCCCCCCCCCC AACACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGG TGGATCCCCTGCATGCGAAGATCTTGAACAAGGC TGTGGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTTG GGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAA GTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGC	3

TGTCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTAG GAACCAGTGAGCAAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCCA TACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCT GGGTCCGGGTGGGCACGGTGCCCGGGCAACGAG CTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGCCCCCTCCCTG GGGACAGCCCCTCCTGGCTAGTCACACCCTGTAGG CTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCC TCATTCTACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACAC TCAGGAGCAGCCAGCGGCGCGCCAGGTAAGTTTA GTCTTTTTGTCTTTTATTTAGGTCCCGGATCCGGT GGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGAT GTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTAC TTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGGTACC ACCATGGTGAGGGAGCAGTACACCACAGCAACCGA GGGAATCTGCATCGAGAGGCCAGAGAACCAGTACG TGTATAAGATCGGCATCTACGGCTGGCGGAAGAGA TGTCTGTATCTGTTCTGTCTGCTGCTGATCATC CTGGTGGTGAATCTGGCCCTGACCATCTGGATCCT GAAAGTGATGTGGTTTTCCCAGCAGGAATGGGAC ACCTGTGCGTGACAAAGGACGGACTGCGGCTGGA GGGAGAGTCTGAGTTCCTGTTTCCCCTGTATGCCAA GGAGATCCACAGCAGAGTGGATAGCTCCCTGCTGC TGCAGTCCACCCAGAACGTGACAGTGAACGCAAGG AATAGCGAGGGAGAGGTGACCGGCAGACTGAAGG TCGGCCCCAAGATGGTGGAGGTGCAGAATCAGCAG TTCCAGATCAACTCCAATGACGGCAAGCCTCTGTTT ACAGTGGATGAGAAGGAGGTGGTGGTGGGCACCG ACAAGCTGAGGGTGACAGGACCTGAGGGCGCCCT GTTTCGAGCACTCTGTGGAGACCCCACTGGTGCAGC CAGACCCTTTTCAGGATCTGAGGCTGGAGAGCCCA ACACGCAGCCTGTCCATGGACGCACCCAGAGGCGT GCACATCCAGGCACACGCAGGCAAGATCGAGGCC CTGAGCCAGATGGATATCCTGTTCCACTCTAGCGAC GGCATGCTGGTGTGGATGCCGAGACCGTGTGCCT GCCTAAGCTGGTGCAGGGCACATGGGGCCCATCTG GCTCCTCTCAGAGCCTGTACGAGATCTGCGTGTGC	
--	--

	CCAGATGGCAAGCTGTATCTGTCCGTGGCCGGCGT GTCTACCACATGCCAGGAGCACAACCACATCTGTCT GTGACTCGAGGGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTC ATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCCTGCA GGGGCGCGCCTAATCTAGAGCATGGCTACGTAGAT AAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAA CCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC	
Промотор МНСК7	AAGCTTGCATGTCTAAGCTAGACCCTTCAGATTAAA AATAACTGAGGTAAGGGCCTGGGTAGGGGAGGTG GTGTGAGACGCTCCTGTCTCTCCTCTATCTGCCCAT CGGCCCTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCAAGGACT AAAAAAGGCCATGGAGCCAGAGGGGCGAGGGCA ACAGACCTTTCATGGGCAAACCTTGGGGCCCTGCT GTCTAGCATGCCCCACTACGGGTCTAGGCTGCCCA TGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATG CCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCC CCCCCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCT GTCCCTGGTGGATCCCCTGCATGCGAAGATCTTCG AACAAGGCTGTGGGGACTGAGGGCAGGCTGTAA CAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGG ACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAA GGCCAGCTGTCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACT TAGTTTAGGAACCAAGTGAGCAAGTCAGCCCTGGG GCAGCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCT GCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCCGG GCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCC CCTCCCTGGGGACAGCCCTCCTGGCTAGTCACAC CCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGG GGCTGCCCTATTCTACCACCCTCCACAGCACA GACAGACACTCAGGAGCAGCCAGC	4
Химерный интрон	AGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCC CGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTC CTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACG	5

## 045951

	GAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGT ACCC	
PolyA	GGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGT GTGTTGGTTTTTTGTG	6
5' ITR	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGGGTT	7
3' ITR	CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGTTCGCCCGACGCCGGGCT TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG C	8
Нуклеотидная последовательн ость $\gamma$ - саркогликана человека (дикий тип), GenBank U34976.1	ATGGTGCGTGAGCAGTACACTACAGCCACAGAAGG CATCTGCATAGAGAGGCCAGAGAATCAGTATGTCTA CAAAATTGGCATTATGGCTGGAGAAAGCGCTGTCT CTACTTGTGTTCTTCTTTTACTCATCATCCTCGTT GTGAATTTAGCTCTTACAATTTGGATTCTTAAAGTGA TGTGTTTTCTCCAGCAGGAATGGGCCACTTGTGT GTAACAAAAGATGGACTGCGCTTGAAGGGGAATC AGAATTTTTATTCCCATTGTATGCCAAAGAAATACAC TCCAGAGTGGACTCATCTCTGCTGCTACAATCAACC CAGAATGTGACTGTAATGCGCGCAACTCAGAAGG GGAGGTCACAGGCAGGTAAAAGTCGGTCCCAAAA TGGTAGAAGTCCAGAATCAACAGTTTCAGATCAACT CCAACGACGGCAAGCCACTATTTACTGTAGATGAGA AGGAAGTTGTGTTGGTACAGATAAACTTCGAGTAA CTGGGCCTGAAGGGGCTTTTTTGAACATTCAGTG GAGACACCCCTTGTGAGAGCCGACCCGTTTCAAGA CCTTAGATTAGAATCCCCACTCGGAGTCTAAGCAT GGATGCCCCAAGGGGTGTGCATATCAAGCTCACG CTGGGAAAATTGAGGCGCTTCTCAAATGGATATTC TTTTTCATAGTAGTGATGGAATGCTTGTGCTTGATG CTGAAACTGTGTGCTTACCCAAGCTGGTGCAGGGG ACGTGGGGTCCCTCTGGCAGCTCACAGAGCCTCTA CGAAATCTGTGTGTCCAGATGGGAAGCTGTACC	9

	TGTCTGTGGCCGGTGTGAGCACCACGTGCCAGGAG CACAGCCACATCTGCCTCTGA	
Аминокислотная последовательн ость капсида AAV rh.74	MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLG DRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNT YFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGF RPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTD SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNN GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDV PFHSSYAHSQSLDRLMNLIDQYLYLSRTQSTGGTA GTQQLLFSQAGPNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVST TLSQNNNSNFAWTGATKYHLNDRSLVNPVAMATH KDDEERFFPSSGVLMTFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSE EEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQNAAPIVGAVNSQG ALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMG GFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYS TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVD FAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL	10
Полинуклеотидн ая последовательн ость вектора rAAV	ATGGCTGCCGATGGTTATCTCCAGATTGGCTCGA GGACAACCTCTCTGAGGGCATTGCGAGTGGTGGG ACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAAC CAGCAAAAGCAGGACAACGGCCGGGTCTGGTGC TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACGGA CTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCGGACG CAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCA GCAGCTCCAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGT ATAATCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTG CAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCG CGCAGTCTCCAGGCCAAAAAGCGGGTTCTCGAAC CTCTGGGCCTGGTTGAATCGCCGGTTAAGACGGCT CCTGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCCA GCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGA AAGGCCAGCAGCCCGCAAAAAAGAGACTCAATTTT GGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACC CTCAACCAATCGGAGAACCACCAGCAGGCCCTCT GGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCGGTGG CGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACG	11

	GAGTGGGTAGTTCCTCAGGAAATTGGCATTGCGATT CCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGC ACCCGCACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCA CCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGACCTCGGGAG GAAGCACCACGACAACACCTACTTCGGCTACAGC ACCCCCTGGGGTATTTTACTTCAACAGATTCCAC TGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATC AACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCAAGAGGCTCAA CTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTAC GCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACC TTACCAGCACGATTGAGTCTTTACGGACTCGGAAT ACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGCTCGGCGCACCA GGCTGCCTGCCTCCGTTCGCGGCGGACGTCTTCAT GATTCCTCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACAATGG CAGTCAGGCTGTGGGCCGGTCTCTTCTACTGCC TGGAGTACTTTCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCA ACAACCTTTGAATTCAGCTACAACCTCGAGGACGTGC CCTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTG GACCGGCTGATGAACCTCTCATCGACCAGTACTT GTACTACCTGTCCCGGACTCAAAGCACGGGCGGTA CTGCAGGAACCTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCG GGCCTAACAACATGTGCGGCTCAGGCCAAGAAGTGG CTACCCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGTCTC CACGACACTGTCGCGAACAACAACAGCAACTTTG CCTGGACGGGTGCCACCAAGTATCATCTGAATGGC AGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGC TACCCACAAGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATC CAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGGGAGCTG GAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATGCTA ACCAGCGAGGAAGAAATAAAGACCACCAACCCAGT GGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGGCCGATAACC TGCAACAGCAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGGCC GTCAATAGTCAAGGAGCCTTACCTGGCATGGTGTG GCAGAACCAGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCT GGGCCAAGATTCTCATACGGACGGCAACTTTTCAT CCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAGCA	
	TCCGCCTCCTCAGATCCTGATTA AAAACACACCTGT TCCC GCGGATCCTCCGACCACCTTCAATCAGGCCA AGCTGGCTTCTTTCATCACGCAGTACAGTACCGGC CAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGA AGGAGAACAGCAAACGCTGGAACCCAGAGATTCAG TACACTTCCAACACTACTACAAATCTACAAATGTGGACT TTGCTGTCAATACTGAGGGTACTTATTCGAGCCTC GCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTGT AA	

В другом аспекте в настоящем документе описан рекомбинантный вектор AAV, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный  $\gamma$ -саркогликан, который содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в жестких условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или ее комплементом. Функциональный  $\gamma$ -саркогликан предполагает полипептид  $\gamma$ -саркогликана, который сохраняет активность  $\gamma$ -саркогликана. Активность  $\gamma$ -саркогликана является крайне важной для функции мышцы,  $\gamma$ -Саркогликан является одним из нескольких сарколеммальных трансмембранных гликопротеинов, которые взаимодействуют с дистрофином и образует комплекс дистрофин-гликопротеин, кото-

рый охватывает сарколемму и состоит из дистрофина, синтрофина,  $\alpha$ -дистрогликанов и  $\beta$ -дистрогликанов, и саркогликанов, включающих  $\gamma$ -саркогликан. Комплекс дистрофин-гликопротеин обеспечивает структурную связь между субсарколеммальным цитоскелетом и внутриклеточным матриксом мышечных клеток. Неограничивающий пример мышечных клеток включает мышечные клетки сердца, диафрагмы, ноги, тазового пояса, плеча и руки. Кроме того, неограничивающие примеры активности  $\gamma$ -саркогликана и последствия  $\gamma$ -саркогликанопатии описаны в Blake et al. (2002) *Physiol Rev.*;82(2):291-329 и Tarakci et al. (2016) *Front Biosci (Landmark Ed)*;21:744-56.

Термин "жесткие" используется для ссылки на условия, под которыми обычно в данной области понимают жесткие условия. Жесткость гибридизации принципиально определяется температурой, ионной силой и концентрацией денатурирующих агентов, таких как формамид. Примеры жестких условий для гибридизации и промывки представляют собой 0,015М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия при 65-68°C или 0,015 М хлорид натрия, 0,0015 М цитрат натрия и 50% формамид при 42°C. См. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). Также можно использовать более жесткие условия (такие как более высокая температура, более низкая ионная сила, более высокий уровень формамида или другого денатурирующего агента), однако будет затронута степень гибридизации. В примерах, где рассматривается гибридизация деоксирибонуклеотидов, дополнительные иллюстративные жесткие условия гибридизации включают промывку в 6х SSC 0,05% пиродифосфата натрия при 37°C (для олигонуклеотидов из 14 оснований), 48°C (для олигонуклеотидов из 17 оснований), 55°C (для олигонуклеотидов из 20 оснований) и 60°C (для олигонуклеотидов из 23 оснований).

Другие агенты могут быть включены в гибридизационные и промывочные буферы в целях уменьшения неспецифичной и/или фоновой гибридизации. Примеры представляют собой 0,1% бычий сывороточный альбумин, 0,1% поливинил-пирролидон, 0,1% пиродифосфат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, NaDodS04, (SDS), фиколл, раствор Денхардта, ДНК из спермы лосося, фрагментированную в результате обработки ультразвуком (или другую некомплементарную ДНК) и сульфат декстрана, хотя другие подходящие агенты так же могут быть использованы. Концентрацию и типы данных добавок можно менять без существенного воздействия на тяжесть условий гибридизации. Эксперименты по гибридизации обычно проводят при pH 6,8-7,4, однако, в условиях обычной ионной силы степень гибридизации почти не зависит от pH. См. Anderson et al., *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Условия гибридизации может регулировать специалист в данной области для обеспечения данных переменных и обеспечения образования гибридов ДНК с разным родством последовательностей.

В другом аспекте рекомбинантные векторы AAV, описанные в данном документе, могут содержать или по существу состоять из или еще дополнительно состоять из полинуклеотидной последовательности, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан, которая функционально связана с промотором и/или регуляторным элементом, специфичным в отношении мышцы. Например, регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы, представляет собой элемент гена актина скелета человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфичный энхансер связывающий фактор MEF, креатинкиназу мышц (MCK), tMCK (усеченная MCK), тяжелую цепь миозина (MHC), MHC7 (гибридная версия MHC и MCK), C5-12 (синтетический промотор), энхансерный элемент мышечной креатинкиназы, элемент гена тропонина С быстросокращающейся скелетной мышцы, элемент гена тропонина С медленно сокращающейся сердечной мышцы, элемент гена тропонина I медленно сокращающейся мышцы, ядерные факторы, индуцируемые глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE). В одном воплощении вектор гAAV содержит промотор MHC7 (SEQ ID NO: 4).

Иллюстративный вектор гAAV, описанный в данном документе, представляет собой рAAV.MHC7.hSCGC, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3; где промотор MHC7 охватывает нуклеотиды 136-927 (SEQ ID NO: 4), интрон охватывает нуклеотиды 937-1084 (SEQ ID NO: 5), последовательность  $\gamma$ -саркогликана охватывает нуклеотиды 1094-1969 (SEQ ID NO: 1) и polyA охватывает нуклеотиды 1976-2028 (SEQ ID NO: 6). См. фиг. 1. В некоторых случаях только вирусные последовательности, включенные в вектор гAAV, представляют собой инвертированные концевые повторы, которые требуются для репликации и упаковки вирусной ДНК. В некоторых случаях интрон (SEQ ID NO: 5), охватывающий нуклеотиды 7-116, и 5' UTR (5' untranslated region - 5'-нетранслируемая область) (SEQ ID NO: 7), охватывающая нуклеотиды 2128-2231, происходят из плазмиды pCMV $\beta$  (Clontech). В некоторых случаях 3' UTR содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8. В некоторых случаях рAAV.MHC7.hSCGC упакован в капсид AAV rh.74.

ДНК плазмиды по раскрытию содержат геномы гAAV. ДНК плазмиды переносятся в клетки, допустимые для инфицирования хэлперным вирусом AAV (например, аденовирусом, аденовирусом с удалением EI или герпесвирусом) для сборки генома гAAV в инфекционные вирусные частицы. Методики получения вирусных частиц гAAV, в которые должен быть упакован геном AAV, гены гер и сар и функции хэлперных вирусов, предложенные в отношении клетки, являются стандартными в данной области. Получение гAAV требует того, чтобы следующие компоненты присутствовали в одной клетке (обозначает-

мой в данном документе как упаковывающая клетка): геном гAAV, гены гер и сар AAV, отделенные от (а именно, не входящие в) генома гAAV, и функции хэлперного вируса. Гены гер и сар AAV могут происходить из любого серотипа AAV, из которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут происходить из другого серотипа AAV, чем ITR генома гAAV, включая, но, не ограничиваясь следующими серотипами AAV: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh.74. В некоторых воплощениях вектор гAAV содержит последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV2. Получение псевдотипированного гAAV раскрыто, например, в WO 01/83692, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых аспектах вектор гAAV содержит последовательности инвертированных ITR AAV2 и заключен в капсид AAV rh.74. В некоторых случаях геном вектора гAAV содержит полинуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 11. В некоторых случаях капсид AAV rh.74 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях вектор гAAV содержит полинуклеотид, который содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из последовательности, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 11, и кодирует капсидные белки VP1, VP2 и VP3 гAAV. В некоторых воплощениях вектор гAAV содержит полипептид, который содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из последовательности, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности AAV rh.74 VP3, которая изложена в SEQ ID NO: 10.

Способ получения упаковывающей линии клеток заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для получения частиц AAV. Например, плазмиду (множественные плазмиды), содержащую геном гAAV с отсутствием генов AAV гер и сар, гены AAV гер и сар, отделенные от генома гAAV, и селективный маркер, такой как ген устойчивости к неомицину, интегрируют в геном клетки. Геномы AAV вводили в бактериальные плазмиды способами, такими как образование GC хвостов (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления эндонуклеаз рестрикции (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73), или прямое лигирование тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Упаковывающую клеточную линию затем инфицируют хэлперным вирусом, таким как аденовирус. Преимущества данного способа состоят в том, что клетки являются селективируемыми и подходят для крупномасштабного получения гAAV. В других примерах подходящих способов используется аденовирус или бакуловирус, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки. В некоторых случаях геном вектора гAAV содержит полинуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 11. В некоторых случаях капсид AAV rh.74 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях вектор гAAV содержит полинуклеотид, который содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из последовательности, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 11, и кодирует капсидные белки VP1, VP2 и VP3 гAAV. В некоторых воплощениях вектор гAAV содержит полипептид, который содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из последовательности, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89%, более типично 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности AAV rh.74 VP3, которая изложена в SEQ ID NO: 10.

Обычные принципы получения гAAV рассмотрены, например, в Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial, and Immunol., 158:97-129). Разные подходы описаны в Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62: 1963 (1988); и Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); патенте США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте США № 5658.776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) Vaccine 13: 1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3: 1124-1132; патенте США № 5786211; патенте США № 5871982; и патенте США № 6258595. Приведенные выше документы включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, с особым акцентом на разделы документов, связанные с получением гAAV.

Таким образом, согласно раскрытию предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют инфекционный гAAV. В одном воплощении упаковывающие клетки могут представлять собой стабильно трансформированные раковые клетки, такие как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная

линия 293). В другом воплощении упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, как например, клетки 293 с кратковременным пассированием (клетки эмбриональных почек человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (эмбриональные фибробласты человека), клетки WI-38 (эмбриональные фибробласты человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (эмбриональные клетки легкого макака-резус).

Рекомбинантный AAV (а именно, инфекционные, заключенные в капсид частицы гAAV) по раскрытию содержат геном гAAV. Воплощения включают, но не ограничиваются гAAV с названием pAAV.MHCK7.hSCGC, который содержит полинуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3.

гAAV можно очищать способами, являющимися стандартными в данной области, как например, посредством колоночной хроматографии или градиентов плотности хлористого цезия. Способы очистки векторов гAAV от хэлперного вируса известны в данной области и включают способы, раскрытые, например, в Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); патенте США № 6566118 и WO 98/09657.

В другом воплощении в раскрытии рассматриваются композиции, содержащие или по существу состоящие из гAAV по настоящему раскрытию. Композиции, описанные в данном документе, содержат или по существу состоят из гAAV в фармацевтически приемлемом носителе. В одном конкретном воплощении композиция по данному раскрытию содержит или по существу состоит из раствора Рингера-лактат (LRS - от англ. Lactated Ringer's solution). Композиции могут также содержать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты являются нетоксичными в отношении реципиентов и являются предпочтительно инертными в используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, такие как фосфат, цитрат или другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота); сахароспирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, плуроны или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Раскрытые композиции можно использовать для одного или более из: лечения  $\gamma$ -саркогликанопатии; увеличения мышечной силы, выносливости мышц и/или мышечной массы; уменьшения фиброза; уменьшения вызванного сокращениями повреждения; уменьшения жировой инфильтрации; и/или уменьшения центральной нуклеации у субъекта, нуждающегося в этом, и/или лечения мышечной дистрофии, уменьшающего дегенерацию волокон или некротических волокон; уменьшения воспаления; повышения уровней креатинкиназы; лечения атрофии и гипертрофии мышечного волокна, и/или уменьшения дистрофического обызвествления у субъекта, страдающего мышечной дистрофией.

Титры гAAV, подлежащего введению в способах по раскрытию, будут варьировать, например, в зависимости от конкретного гAAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(ов) клеток, подлежащих нацеливанию, и могут быть определены способами, являющимися стандартными в данной области. Титры гAAV могут находиться в интервале от примерно  $1 \times 10^6$ , примерно  $1 \times 10^7$ , примерно  $1 \times 10^8$ , примерно  $1 \times 10^9$ , примерно  $1 \times 10^{10}$ , примерно  $1 \times 10^{11}$ , примерно  $1 \times 10^{12}$ , примерно  $1 \times 10^{13}$  до примерно  $1 \times 10^{14}$  или более ДНК-устойчивых частиц (DRP - от англ. DNase resistant particle) на мл. Дозировки могут быть выражены в единицах вирусных геномов (vg - от англ. viral genome).

Способы трансдукции клетки-мишени гAAV, *in vivo* или *in vitro*, рассмотрены данным раскрытием. Термин "трансдукция" используется для ссылки на введение/доставку исследуемого полинуклеотида (например, полинуклеотидной последовательности, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан) в клетку-реципиента или *in vivo* или *in vitro*, посредством описанного дефектного по репликации гAAV, что приводит к экспрессии  $\gamma$ -саркогликана клеткой-реципиентом.

В одном аспекте в данном документе предложены способы одного или более из: лечения  $\gamma$ -саркогликанопатии; увеличения мышечной силы, выносливости мышц и/или мышечной массы; уменьшения фиброза; уменьшения вызванного сокращениями повреждения; уменьшения жировой инфильтрации; и/или уменьшения центральной нуклеации у субъекта, нуждающегося в этом, и/или лечения мышечной дистрофии, уменьшающего дегенерацию волокон или некротических волокон; уменьшения воспаления; повышения уровней креатинкиназы; лечения атрофии и гипертрофии мышечного волокна, и/или уменьшения дистрофического обызвествления у субъекта, страдающего мышечной дистрофией, включающие или по существу состоящие из или еще дополнительно состоящие из введения субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), где вектор гAAV содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из экспрессионной кассеты с геном, содержащей или по существу состоящей из или еще дополнительно состоящей из полинуклеотидной последовательности, кодирующей  $\gamma$ -саркогликан под транскрипционным контролем промотора, причем указанная кассета фланкирована одним или более инвертированными

концевыми повторами AAV. В некоторых воплощениях указанный промотор представляет собой регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы. В одном воплощении способы, раскрытые в данном документе, увеличивают мышечную силу, выносливость мышц и/или мышечную массу одной или более мышц субъекта. Неограничивающие примеры мышц включают мышцы сердца, диафрагмы, бедер, голени, тазового пояса, плеча и руки. В одном конкретном воплощении мышечная сила, выносливость мышц и/или мышечная масса увеличивается по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 50% или по меньшей мере примерно на 80%, по сравнению с необработанным контрольным субъектом.

В одном конкретном аспекте субъект страдает тазово-плечевой мышечной дистрофией. В еще одном аспекте субъект страдает тазово-плечевой мышечной дистрофией, которая представляет собой тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2С.

Термины "осуществление введения" или "введение" в отношении доставки полинуклеотидов субъекту включают любой путь введения или доставки субъекту полинуклеотидов для осуществления предполагаемой функции. Введение может быть выполнено любым подходящим путем, включая перорально, интраназально, парентерально (внутривенно, внутримышечно, интраперитонеально или подкожно), интракраниально или местно. Дополнительные пути введения включают внутриорбитальный, инфузию, внутриартериальный, внутрикапсулярный, внутрисердечный, внутрикожный, внутрилегочный, интраспинальный, внутригрудинный, интратекальный, внутриматочный, внутривенный, субарахноидальный, субкапсулярный, подкожный, трансмукозальный или транстрахеальный. Введение включает самостоятельное введение и введение кем-то другим.

В одном аспекте способы, раскрытые в данном документе, включают или по существу состоят из или еще дополнительно состоят из введения композиции, содержащей или по существу состоящей из или еще дополнительно состоящей из вектора gAAV и фармацевтически приемлемого носителя. В еще одном аспекте способы, раскрытые в данном документе, включают или по существу состоят из или еще дополнительно состоят из введения вектора gAAV или композиции, содержащей или по существу состоящей из или еще дополнительно состоящей из вектора gAAV и фармацевтически приемлемого носителя, посредством внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции. В еще одном аспекте способы, раскрытые в данном документе, включают или по существу состоят из или еще дополнительно состоят из системного введения вектора gAAV или композиции, содержащей или по существу состоящей из или еще дополнительно состоящей из вектора gAAV и фармацевтически приемлемого носителя. В одном конкретном аспекте способы, раскрытые в данном документе, включают или по существу состоят из или еще дополнительно состоят из введения вектора gAAV или композиции, содержащей или по существу состоящей из или еще дополнительно состоящей из вектора gAAV и фармацевтически приемлемого носителя, парентерально посредством инъекции, инфузии или имплантации.

В одном аспекте полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, вектора gAAV для применения в способах, описанных в данном документе, содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1. В другом аспекте полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, вектора gAAV, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В еще одном аспекте вектор gAAV, используемый в способах, раскрытых в данном документе, включает или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из самокомплементарного генома вектора AAV. В одном конкретном воплощении вектор gAAV содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из генома, не имеющего ДНК *rep* и *cap* AAV. В другом воплощении вектор gAAV принадлежит к серотипу AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 или AAV rh74. В еще одном аспекте вектор gAAV принадлежит к серотипу AAV rh74, и вектор gAAV содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из капсида AAV rh.74. В еще одном аспекте капсид AAV rh.74 вектора gAAV содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 10, или ее эквивалента.

Вектор gAAV, используемый в способах, раскрытых в данном документе, может дополнительно содержать или по существу состоять из промотора и/или регуляторного элемента, специфичного в отношении мышцы, и где специфичный в отношении мышцы регуляторный элемент функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим  $\gamma$ -саркогликан. Неограничивающие примеры некоторых регуляторных элементов, специфичных в отношении мышцы, представляют собой элемент гена актина скелета человека, элемент гена сердечного актина, миоцит-специфичный энхансер связывающий фактор *mef*, креатинкиназу мышц (МСК), усеченную МСК (tМСК), тяжелую цепь миозина (МНС), МНСК7, C5-12, энхансерный элемент мышечной креатинкиназы, элемент гена тропонина с быстросокращающейся скелетной мышцей, элемент гена тропонина с медленно сокращающейся сердечной мышцей, элемент гена тропонина I медленно сокращающейся мышцей, ядерные факторы, индуцируемые гипоксией, стероид-индуцибельный элемент и глюкокортикоид-отвечающий элемент (*gre*). В одном аспекте специфичный в отношении мышцы регуляторный элемент вектора gAAV представляет собой усеченную МСК (tМСК). В

другом аспекте промотор и/или регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы, вектора gAAV представляет собой промотор МНСК7. В еще одном аспекте промотор МНСК содержит или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из нуклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3, или ее эквивалента.

В одном воплощении геном вектора gAAV, раскрытого в данном документе, содержит интрон, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5.

Способы *in vivo* включают или по существу состоят из или еще дополнительно состоят из стадии введения эффективной дозы или эффективных множественных доз композиции, содержащей или по существу состоящей из или еще дополнительно состоящей из gAAV по раскрытию, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если доза вводится перед развитием расстройства/заболевания, введение является профилактическим. Если доза вводится после развития расстройства/заболевания, введение является терапевтическим. В воплощениях раскрытия эффективная доза представляет собой дозу, которая облегчает (устраняет или уменьшает) по меньшей мере один симптом, ассоциированный с расстройством/заболеванием, подлежащим лечению, которая замедляет или предупреждает прогрессирование состояния расстройства/заболевания, которая замедляет или предупреждает прогрессирование состояния расстройства/заболевания, которая снижает степень заболевания, что приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания, и/или что продлевает выживаемость. Примером заболевания, рассматриваемого в отношении предупреждения или лечения способами по раскрытию, является мышечная дистрофия, такая как тазово-плечевая мышечная дистрофия. В некоторых воплощениях заболевание, рассматриваемое в отношении предупреждения или лечения способами по раскрытию, представляет собой тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2C (LGMD2C).

Термин "мышечная дистрофия", в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к расстройству, при котором сила и мышечная масса постепенно уменьшаются. Неограничивающие примеры заболеваний - мышечных дистрофий могут включать мышечную дистрофию Беккера, тиббиальную мышечную дистрофию, мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию Ландузи-Дежерина, саркогликанопатию, врожденную мышечную дистрофию, такую как врожденная мышечная дистрофия, обусловленная частичным дефицитом LAMA2, мерозиндефицитную врожденную мышечную дистрофию, врожденную мышечную дистрофию типа 1D, врожденную мышечную дистрофию типа Фукуяма, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 1A, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2A, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2B, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2C, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2D, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2E, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2F, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2G, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2H, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2I, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2J, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2K, тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 1C, мышечную дистрофию с ригидностью позвоночника, с простым буллезным эпидермолизом, окулофарингеальную мышечную дистрофию, врожденную мышечную дистрофию Ульриха и склероатоническую мышечную дистрофию Ульриха. В некоторых воплощениях субъект страдает тазово-плечевой мышечной дистрофией. В некоторых воплощениях субъект страдает тазово-плечевой мышечной дистрофией типа 2C (LGMD2C).

Существует по меньшей мере девятнадцать форм LGMD и данные формы классифицированы по их ассоциированным генетическим дефектам.

Тип	Тип наследования	Ген или хромосома
LGMD1A	аутосомно-доминантный	ген Миотилина
LGMD1B	аутосомно-доминантный	Ген Ламина A/C
LGMD1C	аутосомно-доминантный	Ген Кавеолина
LGMD1D	аутосомно-доминантный	Хромосома 7
LGMD1E	аутосомно-доминантный	Хромосома 6

LGMD1F	аутосомно-доминантный	Хромосома 7
LGMD1G	аутосомно-доминантный	Хромосома 4
LGMD2A	аутосомно-рецессивный	Ген кальпаина-3
LGMD2B	аутосомно-рецессивный	Ген дисферлина
LGMD2C	аутосомно-рецессивный	Ген гамма-саркогликана
LGMD2D	аутосомно-рецессивный	Ген альфа-саркогликана
LGMD2E	аутосомно-рецессивный	Ген бета-саркогликана
LGMD2F	аутосомно-рецессивный	Ген дельта-саркогликана
LGMD2G	аутосомно-рецессивный	Ген телетонина
LGMD2H	аутосомно-рецессивный	TRIM32
LGMD2I	аутосомно-рецессивный	Ген FKRP
LGMD2J	аутосомно-рецессивный	Ген титина
LGMD2K	аутосомно-рецессивный	Ген POMT1
LGMD2L	аутосомно-рецессивный	Ген ANO5

В некоторых аспектах раскрытие относится к способу лучения мышечной дистрофии (например, LGMD2C) у субъекта, включающему или по существу состоящему из или дополнительно состоящему из введения субъекту терапевтически эффективного количества вектора гAAV, кодирующего  $\gamma$ -саркогликан, как описано в данном документе, или композиции, содержащей или по существу состоящей из такого вектора гAAV.

В некоторых воплощениях согласно раскрытию предложен способ увеличения мышечной силы, выносливости мышц и/или мышечной массы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией (например, LGMD2C), включающий или по существу состоящий из или еще дополнительно состоящий из введения субъекту терапевтически эффективного количества вектора гAAV, кодирующего  $\gamma$ -саркогликан, как описано в данном документе, или композиции, содержащей или по существу состоящей из такого вектора гAAV.

В некоторых аспектах раскрытие охватывает способ уменьшения повреждения, вызванного сокращениями, у субъекта, страдающего мышечной дистрофией (например, LGMD2C), включающий или по существу состоящий из или еще дополнительно состоящий из введения субъекту терапевтически эффективного количества вектора гAAV, кодирующего  $\gamma$ -саркогликан, как описано в данном документе, или композиции, содержащей или по существу состоящей из такого вектора гAAV.

В некоторых аспектах раскрытие охватывает способ лечения у субъекта  $\gamma$ -саркогликанопатии, включающий или по существу состоящий из или еще дополнительно состоящий из введения субъекту терапевтически эффективного количества вектора гAAV, кодирующего  $\gamma$ -саркогликан, как описано в данном документе, или композиции, содержащей или по существу состоящей из такого вектора гAAV.

Раскрытие также охватывает способ уменьшения фиброза у субъекта, страдающего мышечной дистрофией (e.g., LGMD2C), включающий или по существу состоящий из или еще дополнительно состоящий из введения субъекту терапевтически эффективного количества вектора гAAV, кодирующего  $\gamma$ -саркогликан, как описано в данном документе, или композиции, содержащей или по существу состоящей из такого вектора гAAV. Термин "фиброз", в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к избыточному или нерегулируемому отложению компонентов внеклеточного матрикса (ECM) и патологическим процессам восстановления в тканях при повреждении, включая скелетную мышцу, сердечную мышцу, печень, легкое, почку и поджелудочную железу. Компоненты ECM, которые откладываются, включают коллаген, например, коллаген 1, коллаген 2 или коллаген 3 и фибронектин.

В некоторых воплощениях субъект, подвергающийся лечению способами, описанными в данном документе, может представлять собой млекопитающее. В некоторых случаях субъект представляет собой человека, примата, не являющегося человеком, свинью, лошадь, корову, собаку, кошку, кролика, мышшь или крысу. Субъект может представлять собой человека женского пола или человека мужского пола. В некоторых случаях субъект представляет собой субъект, являющийся человеком, в возрасте 1-7, 7-15, 16-25, 26-50, 50-70 или больше чем 70 лет. Рассматриваются другие возрастные интервалы, и они включают, без ограничения, возраст 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 60-70 или больше чем 70 лет, а также любой интервал, содержащийся в вышеуказанных.

В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "нуждающийся пациент" или "нуждающийся субъект", относится к пациенту или субъекту, находящемуся в зоне риска или страдающему заболеванием, расстройством или состоянием, которое поддается лечению или улучшению посредством гAAV, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую  $\gamma$ -саркогликан, или композицию, содержащую или по существу состоящую из такого гAAV, предложенного в данном документе. Нуждающийся пациент или субъект может, например, представлять собой пациента или субъекта, у которого диагностировано заболевание, ассоциированное с нарушенной функцией  $\gamma$ -саркогликана, такое как LGMD2C. Субъект может иметь мутацию или нарушенную функцию в гене или белке  $\gamma$ -

саркогликан. Термины "Субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо в данном документе.

Комбинированные терапии, включающие или по существу состоящие из или еще дополнительно состоящие из одной или более композиций, раскрытых в данном документе, и кортикостероида, также рассматриваются данным раскрытием. Комбинация, в том виде, в котором она используется в данном документе, включает одновременное лечение или последовательное лечение. Комбинации способов по раскрытию со стандартными видами медицинского лечения (например, кортикостероиды) конкретно рассматриваются, равно как и комбинации с новыми терапиями. В некоторых воплощениях субъекта можно лечить стероидом (например, преднизолоном, преднизолоном, дефлазакортом) для предотвращения или уменьшения иммунного ответа на введение гAAV, описанного в данном документе. В некоторых случаях субъект может получать аферез или другой иммуномодулятор, если у субъекта экспрессируются антитела к гAAV, описанному в данном документе.

Терапевтически эффективное количество вектора гAAV в некоторых воплощениях представляет собой дозу гAAV, находящуюся за одно или более введений в интервалах от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $5e14$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $2e13$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $3e13$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $4e13$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $5e13$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $6e13$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $7e13$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $8e13$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $9e13$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $1e14$  vg/kg, или от примерно  $1e13$  vg/kg до примерно  $2e14$  vg/kg, или от  $1e13$  vg/kg до примерно  $3e14$  vg/kg, или от примерно  $1 \times 13$  до примерно  $4e14$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  vg/kg до примерно  $4e13$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  vg/kg до примерно  $5e13$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  vg/kg до примерно  $6e13$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  vg/kg до примерно  $7e13$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  vg/kg до примерно  $8e13$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  vg/kg до примерно  $9e13$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  vg/kg до примерно  $1e14$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  vg/kg до примерно  $2e14$  vg/kg, или от  $3e13$  vg/kg до примерно  $3e14$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  до примерно  $4e14$  vg/kg, или от примерно  $3e13$  vg/kg до примерно  $5e14$  vg/kg, или от примерно  $5e13$  vg/kg до примерно  $6e13$  vg/kg, или от примерно  $5e13$  vg/kg до примерно  $7e13$  vg/kg, или от примерно  $5e13$  vg/kg до примерно  $8e13$  vg/kg, или от примерно  $5e13$  vg/kg до примерно  $9e13$  vg/kg, или от примерно  $5e13$  vg/kg до примерно  $1e14$  vg/kg, или от примерно  $5e13$  vg/kg до примерно  $2e14$  vg/kg, или от  $5e13$  vg/kg до примерно  $3e14$  vg/kg, или от примерно  $5e13$  до примерно  $4e14$  vg/kg, или от примерно  $5e13$  vg/kg до примерно  $5e14$  vg/kg, или от примерно  $1e14$  vg/kg до примерно  $2e14$  vg/kg, или от  $1e14$  vg/kg до примерно  $3e14$  vg/kg, или от примерно  $1e14$  до примерно  $4e14$  vg/kg, или от примерно  $1e14$  vg/kg до примерно  $5e14$  vg/kg. Раскрытие также включает или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из данных интервалов вектора гAAV.

Например, терапевтически эффективное количество вектора гAAV представляет собой дозу примерно  $1e13$  vg/kg, примерно  $2e13$  vg/kg, примерно  $3e13$  vg/kg, примерно  $4e13$  vg/kg, примерно  $5e13$  vg/kg, примерно  $6e13$  vg/kg, примерно  $7e13$  vg/kg, примерно  $8e13$  vg/kg, примерно  $9e13$  vg/kg, примерно  $1e14$  vg/kg, примерно  $2e14$  vg/kg, примерно  $3e14$  vg/kg, примерно  $4e14$  vg/kg и  $5e14$  vg/kg. Раскрытие также включает или по существу состоит из или еще дополнительно состоит из композиций, содержащих или по существу состоящих из или еще дополнительно состоящих из данных доз вектора гAAV.

Терапевтическое эффективное количество гAAV в некоторых воплощениях представляет собой дозу гAAV, находящуюся в интервале от примерно  $1e14$  vg/kg до примерно  $1e15$  vg/kg или от примерно  $1e15$  vg/kg до примерно  $1e16$  vg/kg. В некоторых воплощениях согласно раскрытию предложены способы введения субъекту вектора гAAV по раскрытию в дозе примерно  $1e14$  vg/kg, примерно  $1,5e14$  vg/kg, примерно  $2e14$  vg/kg, примерно  $2,5e14$  vg/kg, примерно  $3e14$  vg/kg, примерно  $3,5e14$  vg/kg, примерно  $4e14$  vg/kg, примерно  $4,5e14$  vg/kg, примерно  $5e14$  vg/kg, примерно  $5,5e14$  vg/kg, примерно  $6e14$  vg/kg, примерно  $6,5e14$  vg/kg, примерно  $7e14$  vg/kg, примерно  $7,5e14$  vg/kg, примерно  $8e14$  vg/kg, примерно  $8,5e14$  vg/kg, примерно  $9e14$  vg/kg, примерно  $9,5e14$  vg/kg, примерно  $1e15$  vg/kg, примерно  $1,5e15$  vg/kg, примерно  $2e15$  vg/kg, примерно  $2,5e15$  vg/kg, примерно  $3e15$  vg/kg, примерно  $3,5e15$  vg/kg, примерно  $4e15$  vg/kg, примерно  $4,5e15$  vg/kg, или примерно  $5e15$  vg/kg. В некоторых воплощениях согласно раскрытию предложены способы введения вектора гAAV по раскрытию субъекту в общей дозе примерно  $4,0e14$  vg/kg, примерно  $4,1e14$  vg/kg, примерно  $4,2e14$  vg/kg, примерно  $4,3e14$  vg/kg, примерно  $4,4e14$  vg/kg, примерно  $4,5e14$  vg/kg, примерно  $4,6e14$  vg/kg, примерно  $4,7e14$  vg/kg, примерно  $4,8e14$  vg/kg, примерно  $4,9e14$  vg/kg, примерно  $5,0e14$  vg/kg, примерно  $5,1e14$  vg/kg, примерно  $5,2e14$  vg/kg, примерно  $5,3e14$  vg/kg, примерно  $5,4e14$  vg/kg, примерно  $5,5e14$  vg/kg, примерно  $5,6e14$  vg/kg, примерно  $5,7e14$  vg/kg, примерно  $5,8e14$  vg/kg, примерно  $5,9e14$  vg/kg или примерно  $6e14$  vg/kg.

В разных воплощениях стадия введения может включать введение общей дозы за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более разделенных доз. Например, общая доза может быть доставлена посредством инъекции во множество сайтов на субъекте или субъекту с интервалом несколько минут, несколько часов или несколько суток.

Введение эффективной дозы композиций может осуществляться путями, являющимися стандартными в данной области, включая, внутримышечный, парентеральный, внутривенный, пероральный, буккальный, назальный, ингаляционный, интракраниальный, внутрикостный, внутриглазной, ректальный или вагинальный, но, не ограничиваясь ими. Путь(и) ведения и серотип(ы) компонентов AAV гAAV (в

частности, ITR AAV и капсидный белок) по раскрытию могут выбрать и/или сочетать специалисты в данной области, принимая во внимание инфекцию и/или состояние заболевания, подлежащее лечению, и клетки/ткань(и)-мишени, которые должны экспрессировать  $\gamma$ -саркогликан.

Согласно раскрытию предложено местное введение и системное введение эффективной дозы гAAV и композиций по раскрытию. Например, системное введение представляет собой введение в кровеносную систему таким образом, что затронут весь организм. Системное введение включает энтеральное введение, такое как поглощение через желудочно-кишечный тракт, и парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации.

В частности, фактическое введение гAAV по настоящему раскрытию может осуществляться посредством использования любого физического способа, при котором будет транспортироваться рекомбинантный вектор гAAV в ткань-мишень животного. Введение согласно раскрытию включает, но не ограничивается инъекцией в мышцу, кровоток и/или прямо в печень. Продемонстрировали, что просто ресуспендирование гAAV в фосфатно-солевом буферном растворе является достаточным для обеспечения носителя, полезного для экспрессии в мышечной ткани, и отсутствуют известные ограничения по носителям или другим компонентам, которые можно вводить совместно с гAAV (хотя следует избегать композиций, которые деградируют ДНК обычным образом с гAAV).

Капсидные белки гAAV можно модифицировать таким образом, чтобы гAAV был адресован в конкретную исследуемую ткань-мишень, такую как мышца. См., например, WO 02/053703, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции могут быть получены в виде инъеклируемых препаратов или в виде местных препаратов, подлежащих доставке в мышцу посредством трансдермального транспорта. Многочисленные препараты как для внутримышечной инъекции, так и трансдермального транспорта, ранее разработаны и могут быть использованы на практике по раскрытию. гAAV может быть использован с любым фармацевтически приемлемым носителем для удобства введения и обращения.

В целях внутримышечной инъекции можно использовать растворы в адьюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло или в водном пропиленгликоле, а также стерильные водные растворы. Такие водные растворы могут быть буферизованы, при желании, и жидкий разбавитель сначала делается изотоническим посредством физиологического раствора или глюкозы. Растворы гAAV в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли можно получать в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Также можно получать дисперсию гAAV в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. В обычных условиях хранения и применения данные препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В связи с этим все используемые стерильные водные среды являются легкодоступными посредством стандартных методик, хорошо известных специалистам в данной области.

Фармацевтические формы, подходящие для инъеклируемого применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления для немедленного приема стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы имела место возможность легкого введения посредством шприца. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Соответствующая текучесть может поддерживаться за счет применения покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено разными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тиомерсалом и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированное поглощение инъеклируемых композиций может быть обусловлено применением агентов, обеспечивающих отсроченное поглощение, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъеклируемые растворы получают в результате включения гAAV в требуемом количестве в соответствующем растворителе с разными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно, дисперсии получают посредством включения простерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из ингредиентов, перечисленных выше. В случае стельных порошков для получения стерильных инъеклируемых растворов, предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и методику лиофилизации, которые приводят к получению порошка активного ингредиента плюс любого дополнительного желательного ингредиента из их раствора, подвергнутого ранее стерилизующей фильтрации.

Трансдукцию гAAV можно также проводить *in vitro*. В одном воплощении желательные мышечные клетки-мишени отбирают у субъекта, трансдуцируют гAAV и повторно вводят в субъект. В качестве аль-

тернативы, можно использовать сингенные или ксеногенные мышечные клетки, в случаях, когда такие клетки не будут генерировать у субъекта несоответствующий иммунный ответ.

Подходящие способы трансдукции и повторного введения трансдуцированных клеток субъекту известны в данной области. В одном воплощении клетки могут быть трансдуцированы *in vitro* посредством объединения гAAV с мышечными клетками, например, в соответствующих средах, и осуществления скрининга в отношении тех клеток, несущих исследуемую ДНК, используя традиционные методики, такие как Саузерн-блоттинг и/или ПЦР, или посредством применения селективируемых маркеров. Трансдуцированные клетки затем могут быть приготовлены в фармацевтические композиции, и композицию, вводимую субъекту посредством разных методик, как например, посредством внутримышечной, внутривенной, подкожной и интраперитонеальной инъекции или посредством инъекции в гладкую или сердечную мышцу, используя, например, катетер.

Трансдукция клеток гAAV по раскрытию приводит к устойчивой экспрессии  $\gamma$ -саркогликана. Согласно настоящему изобретению таким образом предложены способы введения/доставки гAAV, которые экспрессируют  $\gamma$ -саркогликан, субъекту, являющемуся млекопитающим, предпочтительно человеком. Данные способы включают трансдукцию тканей (включая, но, не ограничиваясь тканями, такими как мышца, органами, такими как печень и мозг, и железами, такими как слюнные железы) одним или более гAAV по настоящему раскрытию. Трансдукцию можно проводить с помощью кассет с генами, содержащих тканеспецифичные регуляторные элементы. Например, согласно одному воплощению раскрытия предложены способы трансдукции мышечных клеток и мышечных тканей, на которые направлены регуляторные элементы, специфичные в отношении мышцы, включая, но, не ограничиваясь регуляторными элементами, происходящими из семейств генов актина и миозина, таких как семейство генов *myoD* [См. Weintraub et al, Science, 251: 761-766 (1991)], миоцит-специфичным энхансер-связывающим фактором MEF-2 [Cserjesi and Olson, Mol Cell Biol 11: 4854-4862 (1991)], регуляторными элементами, происходящими из гена скелетного актина человека [Muscat et al, Mol Cell Biol, 7: 4089-4099 (1987)], гена сердечного актина, элементами последовательности мышечной креатинкиназы [См. Johnson et al, Mol Cell Biol, 9:3393-3399 (1989)] и элементом энхансера мышечной креатинкиназы (mCK), регуляторными элементами, происходящими из гена тропонина С быстросокращающейся скелетной мышцы, гена тропонина С медленно сокращающейся сердечной мышцы и гена тропонина I медленно сокращающейся мышцы: ядерными факторами, индуцируемыми гипоксией (Semenza et al, Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5680-5684 (1991)), стероид-индуцибельными элементами и промоторами, включая глюкокортикоид-отвечающий элемент (GRE) (См. Mader and White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603-5607 (1993)), и другими регуляторными элементами.

Мышечная ткань представляет собой привлекательную мишень для доставки ДНК *in vivo*, поскольку она не является жизненно важным органом и является легкодоступной. В раскрытии рассматривается устойчивая экспрессия трансгена (например,  $\gamma$ -саркогликана) от трансдуцированных мышечных волокон.

Под термином "мышечная клетка" или "мышечная ткань" подразумевается клетка или группа клеток, происходящих из мышцы любого вида (например, скелетной мышцы и гладкой мышцы, например, из пищеварительного тракта, мочевого пузыря, кровеносных сосудов или сердечной ткани). Такие мышечные клетки могут быть дифференцированы или недифференцированы, как например, миобласты, миоциты, мышечные трубочки, кардиомиоциты и кардиомиобласты.

Таким образом, также в данном документе описаны способы введения эффективной дозы (или доз, вводимых по существу одновременно, или доз, вводимых с интервалами) гAAV, которые кодируют  $\gamma$ -саркогликан, нуждающемуся в этом субъекту, являющемуся млекопитающим.

Кроме того в данном документе предложены наборы, содержащие или по существу состоящие из или еще дополнительно состоящие из любого одного или более воплощений, раскрытых в данном документе, и возможные инструкции по применению. Наборы могут содержать или по существу состоять из или еще дополнительно состоять из одной или более композиций, раскрытых в данном документе, и кортикостероида или одной или более комбинированных терапий, предложенных в данном документе, и возможных инструкций по применению.

Следует понимать, что настоящее раскрытие не ограничивается конкретными описанными аспектами, ввиду этого, может, безусловно, варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, имеет целью лишь описать конкретные воплощения, и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего раскрытия будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Описан целый ряд воплощений раскрытия. Тем не менее, будет понятно, что разные модификации могут быть сделаны без отступления от сущности и объема раскрытия. Соответственно, следующие примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения объема раскрытия, описанного в формуле изобретения.

Следует предположить без четкого перечисления и если не предполагается иное, что когда настоящая технология относится к полипептиду, белку, полинуклеотиду или антителу, эквиваленту или их биологическому эквиваленту, предположительно, находится в объеме настоящей технологии.

Упоминание любого патента, патентной заявки, публикации или любого другого документа не является допущением того, что любое из вышеуказанного относится к предшествующему уровню техники, а также не представляет какое-либо допущение в отношении содержания или даты данных публикаций или документов.

Все из признаков, раскрытых в данном документе, можно объединять в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в описании изобретения, может быть заменен альтернативным признаком, служащим такой же, эквивалентной или похожей цели. Таким образом, если явно не указано иное, раскрытые признаки (например, антитела) представляют собой пример рода эквивалентных или похожих признаков.

В том виде, в котором они используются в данном документе, все числовые значения или интервалы числовых значений включают целые числа в пределах таких интервалов и доли значений или целые числа в пределах интервалов, если контекстом явно не указано иное. Кроме того, когда перечень значений описан в данном документе (например, примерно 50, 60, 70, 80, 85 или 86%), перечень включает все их промежуточные и дробные значения (например, 54, 85,4%). Таким образом, для иллюстрации ссылка на 80% или больше включает 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94% и т.д., а также 81,1, 81,2, 81,3, 81,4, 81,5% и т.д., 82,1, 82,2, 82,3, 82,4, 82,5% и т.д., и так далее.

Ссылка на целое число с более (больше) или меньше чем включает любое число, больше или меньше чем число, на которое ссылаются, соответственно. Таким образом, ссылка на меньше чем 100 включает 99, 98, 97 и т.д. вплоть до числа один (1); и меньше чем 10 включает 9, 8, 7 и т.д., вплоть до числа один (1).

В том виде, в котором они используются в данном документе, все числовые значения или интервалы включают доли значений и целые числа в пределах таких интервалов, если контекстом явно не указано иное. Таким образом, для иллюстрации ссылка на интервал числовых значений, такой как 1-10, включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, а также 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 и т.п. и так далее. Ссылка на интервал 1-50, таким образом, включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и т.д., вплоть до и включая 50, а также 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, и т.д., 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 и т.д., и так далее.

Ссылка на целый ряд интервалов включает интервалы, которые объединяют значения границ разных интервалов в пределах данного ряда. Таким образом, для иллюстрации ссылка на целый ряд интервалов, например, 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1000, 1000-1500, 1500-2000, 2000-2500, 2500-3000, 3000-3500, 3500-4000, 4000-4500, 4500-5000, 5500-6000, 6000-7000, 7000-8000 или 8000-9000 включает интервалы 10-50, 50-100, 100-1000, 1000-3000, 2000-4000 и т.д.

Модификации вышеуказанного могут быть сделаны без отступления от базовых аспектов технологии. Хотя технология была описана по существу подробно со ссылкой на одно или более конкретных воплощений, обычным специалистам в данной области будет понятно, что можно осуществлять изменения воплощений, конкретно раскрытых в данной заявке, еще данные модификации и улучшения находятся в пределах объема и сущности технологии.

Технологию, иллюстративно описанную в данном документе, подходящим образом можно осуществлять на практике в отсутствие какого(их)-либо элемента(ов), конкретно не раскрытого(ых) в данном документе. Таким образом, например, в каждом примере в данном документе любой из терминов "содержащий", "по существу состоящий из" и "состоящий из" может быть заменен любым из других двух терминов. Термины и выражения, которые были использованы, используют, исходя из описания, а не ограничения, и применение таких терминов и выражений не исключает никаких эквивалентных признаков, показанных и описанных, или их сегментов, и разные модификации возможны в объеме заявленной технологии.

Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная публикация или патент были бы конкретно и отдельно указаны включенными посредством ссылки. В случае противоречия, настоящая заявка, включая любые определения в данном документе, будет осуществлять контроль. Однако, нет упоминания какой-либо ссылки, статьи, публикации, патента, патентной публикации и патентной заявки, процитированной в данном документе, и оно не должно восприниматься как признание или любая форма предположения, что они составляют действительный предшествующий уровень техники или образуют часть обычного общего знания в любой стране в мире.

В настоящем описании следует понимать, что любой интервал концентраций, интервал выраженных в процентах содержаний, интервал отношений или интервал целочисленных значений включает значение любого целого числа в пределах перечисленного интервала, и, когда это целесообразно, его долей (как например, одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано иное. Термин "примерно", непосредственно предшествуя числу или числительному, означает, что число или числительное находится в пределах плюс или минус 10%. Следует понимать, что термины в единственном числе, в том виде, в котором они используются в данном документе, относятся к "одному или более" перечисленным компонентам, если не указано иное. Следует понимать, что применение альтернативы (например "или") означает или один, или оба или любую комбинацию альтернативных вариантов. Следует понимать, что тер-

мин "и/или" означает или один или оба из альтернативных вариантов. В том виде, в котором они используются в данном документе, термины "включает" или "содержит" используются как синонимы.

Заголовки разделов, используемые в данном документе, предложены только в организационных целях и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый предмет.

Раскрытие дополнительно описано в следующих Примерах, которые не ограничивают объем раскрытия, описанный в формуле изобретения.

#### Примеры

Пример 1. Конструкция scAAVrh74.tMCK.hSGCB и активность вектора.

Конструировали конструкцию SGCG AAV, содержащую кДНК полноразмерного человеческого  $\gamma$ -саркогликана (SCGB) с оптимизированными кодонами (SEQ ID NO: 1), как показано на фиг. 1. Конструкция SGCG AAV была сконфигурирована упакованной с использованием самокомплементарного каркаса AAV для более эффективной эффективности трансдукции. кДНК SGCG (969) была сконфигурирована под контролем промотора МНСК7 (792 п.н.). Интрон и 5' UTR происходили из плазмиды pCMV $\beta$  (Clontech). Конструкция SGCG AAV имела консенсусную последовательность Козака сразу перед стартовым кодоном ATG и маленький синтетический сигнал полиаденилирования 53 п.н. для терминации мРНК. кДНК подвергали оптимизации кодонов для применения в отношении человека и синтезировали посредством GenScript (Piscataway, NJ). Единственные вирусные последовательности, включенные в данный вектор, представляли собой инвертированные терминальные повторы AAV2, которые требовались как для репликации, так и упаковки ДНК вируса.

Вектор для данного исследования получали, используя метод тройной трансфекции клеток HEK293 в условиях высокой чистоты. Характеристика вектора после получения включала определение титра посредством количественной ПЦР с суперспирализованным стандартом, определение уровня эндотоксина (EU/мл) и оценку стерильности. Полученный вектор анализировали посредством SDS-PAGE (от англ. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis - электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) для проверки согласованности картины бэндинга с ожидаемым гAAV. Препараты вектора титровали с использованием стандарта - линейной плазмиды и повторно титровали с использованием стандарта - суперспирализованной плазмиды. Вектор получали, используя плазмиду, содержащую кДНК полноразмерного человеческого  $\gamma$ -саркогликана (NC\_000013.11), специфичный в отношении мышцы промотор МНСК7 для управления экспрессией, консенсусную последовательность Козака (CCACC), химерный интрон SV40, синтетический сайт полиаденилирования (53 п.н.) (фиг. 1). Экспрессионную кассету SGCG клонируют между ITR AAV2, упаковывают в самокомплементарный (sc) вектор AAVrh.74 для усиленной трансдукции сердечной ткани.

Обзор дизайна исследования предложен в табл. 2. Значения доз определяют посредством оценки на основе количественной ПЦР общего числа геномов вектора (vg). Включение по меньшей мере некоторого количества частично полных капсидов AAV при получении вектора может приводить к завышенной оценке дозы посредством способов на основе количественной ПЦР. Таким образом, определение эффективности при заданной дозе (например,  $5E+13$ ) предполагает, что эффективность может наблюдаться при более низкой измеренной посредством количественной ПЦР дозе вектора, когда вектор очищают с удалением частично полных капсидов AAV. Общая доза (vg) и доза, выраженная в геномах вектора на килограмм субъекта (vg/kg), перечислены в табл. 2, и на протяжении всего раздела Примеры, не учитывают частично полные капсиды AAV.

Таблица 2  
Обзор дизайна исследования scAAVrh74.MHCK7.hSGCG

Группа исследования	Путь доставки	Линия животного	Общая доза (vg)	Доза (vg/кг)	# Мышей	Конечная точка обработки (месяцы)	Анализ
Активность	в.м.	SGCG-/-	3E+11	н.п.	2	1	IF
Активность	в.в.	SGCG-/-	1E+13	5E+14	1	1,5	IF
Эффективность	в.в.	SGCG-/-	1E+12	5E+13	6	3	IF, H&E, вестерн-блоттинг, TA Phys, Dia Phys, Клетка для оценки активности, Гистопат., Биораспределение кПЦР, биохим. анализ сыворот

							ки
Эффективность	в.в.	SGCG-/-	4E+12	2E+14	6	3	IF, H&E, вестерн-блоттинг, ТА Phys, Dia Phys, Клетка для оценки активности, Гистопат., Биораспределение кПЦР, биохим. анализ сыворотки
Эффективность	в.в.	SGCG-/-	1E+13	5E+14	5	3	IF, H&E, вестерн-блоттинг, ТА Phys, Dia Phys, Клетка для оценки активности, Гистопат., Биораспределение кПЦР, биохим. анализ сыворотки

Эффект ивность	в.в.	SGCG-/-	--	--	6	--	ки IF, H&E, вестерн - блоттин г, TA Phys, Dia Phys, Клетка для оценки активно сти, Гистопа т., биохим. анализ сыворот ки
Эффект ивность	в.в.	C57BL/6	LRS	--	6	3	IF, H&E, вестерн - блоттин г, TA Phys, Dia Phys, Клетка для оценки активно сти, Гистопа т., биохим. анализ сыворот ки

н.п.: не применимо.

IF: иммунофлуоресценция; H&E: окраска гематоксилином и эозином; TA Phys: измерения удельной силы и устойчивость к ECC повреждению в TA мышце; Dia Phys: измерения удельной силы в мышце диафрагмы; Гистопат: официальное рассмотрение гистопатологии; "--": неинъецированный.

Всех животных при оценке эффективности обрабатывали в возрасте 4-8 недель и вскрывали через 3 месяца после инъекции. SGCG-/- мышей отрицательного контроля вскрывали в возрасте 4 месяцев.

Определение активности тестируемого продукта scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG достигалось в результате проведения внутримышечных и системных инъекций вектора SGCG-/- мышам. Мыши дикого типа, которым инъецировали раствор Рингера-лактат (LRS), служат положительным контролем, и неинъецированные SGCG-/- мыши служат отрицательным контролем.

Переднюю большеберцовую мышцу (TA) из мышей BL6 дикого типа (WT) в возрасте 8 недель и мышей, нокаутированных по  $\gamma$ -саркогликану ( $\gamma$ -SG KO), выделяли, и срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для визуализации гистологии каждой мышцы. Даже в этом самом раннем возрасте мышца  $\gamma$ -SG KO демонстрировала фенотип заболевания в мышце с некротическими мышечными волокнами, воспалительными инфильтратами и наличием фиброзной ткани (фиг. 2).

Конструкцию SGCG AAV упаковывали в AAV серотипа rh.74 с созданием рекомбинантного AAV (rAAV) с названием scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG. В общей сложности 3 мышам проводили инъекцию для определения активности scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG. Одна мышца C57BL/6 WT, которой инъецировали LRS, и одна неинъецированная SGCG-/- мышца служили положительным и отрицательным контролями, соответственно. Остальные 3 мыши являлись SGCG-/-, и им осуществляли инъекцию или в.м. (внутри-мышечно) в LTA (n равен 2), или в.в. (внутривенно) в хвостовую вену (n равен 1) scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG для определения того, является ли партия вектора активной. Дизайн исследования кратко обобщен в табл. 3.

Таблица 3  
Анализ активности scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG

Число мышей	Линия мышей	Инъецируемое вещество	Доза (общая, vg)	Путь доставки	Объем (мкл)
1	SGCG-/-	н.п.	Отрицательный контроль	н.п.	н.п.
1	C57BL/6	LRS	Положительный контроль	в.в.	200
2	SGCG-/-	AAV.hSGCG	$3 \times 10^{11}$ vg	в.м.	30
1	SGCG-/-	AAV.hSGCG	$1 \times 10^{13}$ vg	вв.	460
					(230/230)

Мышам  $\gamma$ -SG KO инъецировали scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG посредством внутримышечной (в.м.) инъекции в мышцу ТА в возрасте 4 недель в общей дозе  $3 \times 10^{11}$  vg. Мышей умерщвляли через 4 недели после инъекции (возраст 8 недель), и мышцу ТА выделяли и осуществляли свежую заморозку в метилбутане, охлаждаемом жидким азотом. Иммунофлуоресцентное (IF) окрашивание на  $\gamma$ -саркогликан показало отсутствие  $\gamma$ -саркогликана в инъецируемой правой ТА (RTA) мышце и показало почти полное восстановление экспрессии мембранного белка  $\gamma$ -саркогликан в инъецируемой левой ТА (LTA) мышце (фиг. 3А). Вестерн-блоттинг в отношении  $\gamma$ -саркогликана (фиг. 3В) показал экспрессию  $\gamma$ -саркогликана в двух ТА мышцах BL6 WT; отсутствие белка в ТА мышце  $\gamma$ -SG KO; и восстановление экспрессии белка  $\gamma$ -саркогликан в ТА мышце от инъецированных мышей #794 и #795.

Доставка scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG посредством в.м. введения SGCG-/- мышам в установленной общей дозе  $3 \times 10^{11}$  vg, приводила к 93,03%-ной экспрессии hSGCG в инъецированных LTA мышцах, которая похожа на уровни ранее исследуемого авторами изобретения вектора  $\beta$ -саркогликана (scAAVrh.74.МНСК7.hSGCB). Визуализация на основе иммунофлуоресценции мышцей, которым вводили дозу вектора (ID животных: 794, 795) подтверждает экспрессию трансгена hSGCG (фиг. 3А). Изображения 20X включены для визуализации количества экспрессии в инъецированной мышце. Как и ожидалось, мышшь C57BL/6 WT демонстрировала 100%-ную экспрессию белка  $\gamma$ -саркогликан, и у SGCG-/- мыши полностью отсутствовала экспрессия  $\gamma$ -саркогликана (фиг. 3С).

Системное инъецирование через хвостовую вену одной SGCG-/- мыши (#797) приводило к высоким уровням экспрессии трансгена hSGCG. Заявитель смог осуществить трансдукцию на уровне 94,00% или выше во всех скелетных мышцах данной мыши, обработанной общей дозой  $1 \times 10^{13}$  vg ( $5 \times 10^{14}$  vg/kg) scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG, для анализа активности. Средний уровень выраженной в процентах экспрессии трансгена hSGCG, доставляемого AAV, среди всех анализируемых скелетных мышц составлял 95,98%. Заявитель также смог достигнуть очень высоких уровней трансдукции в сердце при системной доставке. Репрезентативные иммунофлуоресцентные изображения 20X всех скелетных мышц наряду с диафрагмой и сердцем, иллюстрирующие обширную экспрессию hSGCG, показаны на фиг. 7.

Пример 2. Активность и токсичность вектора scAAVrh74.tMCK.hSGCB у мышей BL6 WT.

Мышам BL6 WT инъецировали scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG посредством внутримышечной (в.м.) инъекции в ТА мышцу в возрасте 4 недели в общей дозе  $3 \times 10^{11}$  vg. Мышей умерщвляли через 4 недели после инъекции (в возрасте 8 недель), и мышцу ТА выделяли и осуществляли свежую заморозку в метилбутане, охлаждаемом жидким азотом. Иммунофлуоресцентное (IF) окрашивание на  $\gamma$ -саркогликан демонстрировало окрашивание мембраны на  $\gamma$ -саркогликан в неинъецированной правой ТА (RTA) мышце и демонстрировало внутриклеточное окрашивание, указывающее на сверхэкспрессию белка  $\gamma$ -саркогликан в инъецированной левой ТА (LTA) мышце (фиг. 4А). Вестерн-блоттинг в отношении  $\gamma$ -саркогликана (фиг. 4В) показал сверхэкспрессию белка  $\gamma$ -саркогликан в инъецированной LTA мышце. Окрашивание H&E ТА мышцы продемонстрировало отсутствие токсичности с полным отсутствием каких-либо центральных ядер, некротических волокон, воспалительной инфильтрации или фиброзной ткани как в неинъецированной RTA, так и инъецированной LTA (фиг. 5).

Пример 3. Экспрессия гена после системной доставки scAAVrh.74.tMCK.hSGCB.

Мышам  $\gamma$ -SG KO в возрасте 4-5 недель внутривенно в хвостовую вену инъецировали общую дозу  $1 \times 10^{12}$  vg ( $5 \times 10^{13}$  vg/kg). Мышей умерщвляли после 6 недель обработки. Иммунофлуоресцентное окрашивание на ТА, икроножной (GAS), четырехглавой (QUAD), ягодичной (GLUT), поясничной (PSOAS) мышце, трицепсе (TRICEP), диафрагме и сердечной мышце демонстрировало обширную экспрессию  $\gamma$ -саркогликана (фиг. 6).

Определение эффективности тестируемого продукта scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG достигали посредством выполнения системных инъекций SGCG-/- мышам (генотип: sgcgC57), используя однократную дозу (общая доза  $1 \times 10^{13}$  vg,  $5 \times 10^{14}$  vg/kg). Системная инъекция scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG в клинической дозе (общая доза  $1 \times 10^{12}$  vg ( $5 \times 10^{13}$  vg/kg)), средней дозе (общая доза  $4 \times 10^{12}$  vg ( $2 \times 10^{14}$  vg/kg)) и

высокой дозе (общая доза  $1 \times 10^{13}$  vg ( $5 \times 10^{14}$  vg/kg)) в хвостовую вену SGCG-/- мыши при умерщвлении через 3 месяца после инъекции.

В соответствии с результатами анализа активности scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG авторов изобретения, заявитель осуществлял доставку вектора посредством инъекции через хвостовую вену 5 SGCG-/- мышам в общей дозе анализа авторами изобретения активности  $1 \times 10^{13}$  vg ( $5 \times 10^{14}$  vg/kg) для оценки экспрессии трансгена и эффективности вектора авторов изобретения при системной доставке за продолжительный период времени 3 месяца. Мышам осуществляли инъекцию в возрасте 4-х недель, и полное вскрытие проводили через 3 месяца после инъекции. Все скелетные мышцы, обсуждаемые выше в анализе активности наряду с диафрагмой и сердцем, выделяли для анализа. Органы, включая легкие, почки, печень, селезенку и гонады, также удаляли для исследований токсикологии и биораспределения. Кратко, экспрессия трансгена hSGCG оставалась на высоком уровне после 3-х месячной обработки, и опять все мышцы от обработанных мышей трансдуцировали на высоком уровне. Это сопровождалось улучшенной гистопатологией мышцы и улучшенной функцией мышцы TA и диафрагмы. Системная доставка вектора scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG не вызывала какой-либо токсичности в мышцах или органах.

Экспрессия  $\gamma$ -Саркогликана.

Иммунофлуоресцентное окрашивание на человеческий  $\gamma$ -саркогликан использовали для определения экспрессии трансгена hSGCG в шести скелетных мышцах, как левых, так и правых, помимо диафрагмы и сердца всех SGCG-/- мышей, которым вводили системную инъекцию вектора scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG. Данные мышцы включали TA, GAS, QUAD, GLUT, PSOAS, TRI. В целях анализа экспрессии и эффективности трансдукции изображения левой и правой мышцей от 5 обработанных мышей использовали для количественной оценки. Четыре изображения 20X делали для каждой мышцы, и процент hSGCG-позитивных волокон (число позитивных экспрессирующих волокон/общее число волокон) определяли для каждого изображения, обеспечивая среднюю выраженную в процентах трансдукцию для каждой мышцы от каждой мыши. На фиг. 8A показаны репрезентативные изображения от обработанных мышей и продемонстрированы высокие уровни экспрессии, составляющие в среднем 92,26% по всем мышцам, подвергающимся количественной оценке, включая диафрагму. Заявитель снова также наблюдал высокие уровни трансдукции в сердечной мышце у всех мышей, обработанных вектором. На фиг. 8B показан вестерн-блоттинг, который подтверждает экспрессию трансгена hSGCG во всех скелетных мышцах и сердце от мышей, которым осуществляли внутривенную доставку вектора scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG. В табл. 4 перечислена средняя, выраженная в процентах экспрессия по четырем изображениям 20X для каждой мышцы от каждой мыши, наряду со средним для каждой мышцы по всем 5 мышам.

Таблица 4

Средняя, выраженная в процентах экспрессия трансгена $\gamma$ -Саркогликана						
ID животного	5229	5230	5231	5232	5233	Среднее
Мышца						
TA	97,79	97,79	99,54	99,13	96,59	98,17
GAS	90,88	90,88	74,14	97,67	93,49	89,41
QUAD	88,37	88,37	96,85	95,01	76,15	88,95
GLUT	96,19	96,19	91,12	100	92,83	95,27
PSOAS	97,55	97,55	99,01	49,88	97,92	88,38
TRI	97,32	97,32	99,31	94,98	93,31	96,45
DIA	93,02	93,02	75,56	97,14	87,22	89,19

Гистопатология обработанной мышцы.

Мышцы от SGCG-/- мышей, как скелетные, так и сердечные, демонстрируют обширную миопатию, включая выраженную атрофию и гипертрофию мышечных волокон с множественными очагами некроза. Также имеет место увеличение числа мононуклеарных клеток воспаления (лимфоциты и макрофаги, с рассеянными нейтрофилами) и повышенное дистрофическое обызвествление, жировая инфильтрация, центральная нуклеация и фиброз. Окрашивание гематоксилином и эозином на фиг. 9A иллюстрирует данный дистрофический фенотип у SGCG-/- мышей при сравнении с нормальными мышцами WT и улучшение патологии мышцы после лечения. Количественная оценка гистологических параметров показывает значимое увеличение числа волокон с центральной нуклеацией в скелетных мышцах SGCG-/- мышей с последующим уменьшением центральной нуклеации в многочисленных разных скелетных мышцах в результате переноса гена  $\gamma$ -саркогликана (фиг. 9B). Более глубокий анализ гистопатологии мышцы обна-

руживает нормализацию распределения волокон по размеру вместе с увеличением среднего диаметра волокон у больных SGCG-/- мышцей, обработанных вектором, во всех трех исследуемых мышцах (GAS, PSOAS и TRI) (фиг. 10A-10F). Количество отдельных центральных ядер и средние диаметры волокон для разных мышц анализировали от каждой мыши.

Пример 4. Физиологический дефицит у мышцей  $\gamma$ -SG KO.

Окрашивание Сириусом красным будут проводить для количественной оценки количества фиброзной ткани. Мышцей  $\gamma$ -SG KO и мышцей BL6 WT будут тестировать в возрасте 4-х месяцев для оценки того, имеется ли дефицит силы в скелетной мышце. Переднюю большеберцовую (ТА) мышцу будут тестировать в отношении значимого уменьшения удельной силы и устойчивости к повреждению, по сравнению с контролями. Мышцу-диафрагму будут также тестировать похожим образом для выявления каких-либо значимых уменьшений. Данное измеримое уменьшение будет обеспечивать меру функционального исхода заболевания для того, чтобы установить эффективность терапии на основе AAV.hSGCB.

Пример 5. Функциональный исход заболевания после обработки scAAVrh74.tMCK.hSGCB.

Когорты мышцей  $\gamma$ -SG KO будут инъецированы на долговременной основе на протяжении трехмесячных исследований для количественной оценки эффективности и токсичности (табл. 5). Мыши будут подвергаться анализу в клетке перед умерщвлением для определения общей активности обработанных мышцей, по сравнению с контролями  $\gamma$ -SG KO. ТА мышцу и мышцу диафрагмы будут подвергать анализу физиологии для определения удельной силы и устойчивости к повреждению/утомлению. Мышцы  $\gamma$ -SG KO будут сравнивать с контролями BL6 WT для того, чтобы установить меры функционального исхода заболевания, которые можно будет использовать для определения эффективности обработки у обработанных мышцей. Все скелетные мышцы будут подвергать IF (иммунофлуоресценция)-окрашиванию в отношении экспрессии  $\gamma$ -саркогликана, N&E-окрашиванию на гистопатологию. Количественную полимеразную цепную реакцию (кПЦР) будут проводить на мышцах и органах из инъецированных мышцей для определения биораспределения генома вектора.

Таблица 5

Линия мышцей	Тестируемый продукт	Человеческая доза	Размер образца	Конечная точка
C57/BL6	LR*	н.п.	6	12 недель
SGCG KO	LR	н.п.	6	12 недель
SGCG KO	scAAVrh74.MHCK7.SGCG	$5 \times 10^{13}$ vg/кг	6	12 недель
SGCG KO	scAAVrh74.MHCK7.SGCG	$1 \times 10^{14}$ vg/кг	6	12 недель
SGCG KO	scAAVrh74.MHCK7.SGCG	$2 \times 10^{14}$ vg/кг	6	12 недель

Пример 6. Функциональная оценка системной доставки.

Для определения того, обеспечивает ли перенос гена hSGCG функциональную пользу мышце, пораженной болезнью, заявитель оценивал функциональные свойства ТА мышцей и мышцей диафрагмы от SGCG-/- мышцей, обработанных scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG. В соответствии с Примерами 1-5, заявитель сначала демонстрировал гистопатологию в скелетной мышце конечности и диафрагмах у мышцей в отсутствие  $\gamma$ -саркогликана. Анализ *in situ* ТА мышцей необработанных SGCG-/- мышцей обнаружил статистически значимое уменьшение, составляющее 37,68%, в нормированной генерации удельной силы, по сравнению с ТА мышцей BL6 WT (BL6 WT: 291,65 мН/мм<sup>2</sup> в сравнении с SGCG-/-: 181,77 мН/мм<sup>2</sup>). Результаты по удельной силе значительно повышались до нормальных уровней WT, по сравнению с SGCG-/- мышцей после обработки (SGCG-/-: 181,77 мН/мм<sup>2</sup>, по сравнению с обработанными: 266,02 мН/мм<sup>2</sup>) (фиг. 11A и 11C). Одна дополнительная мера функционального исхода заболевания для определения функциональной пользы переноса гена hSGCG заключается в оценке устойчивости к повреждению, вызываемому сокращениями в ТА мышце после повторных эксцентрических сокращений. Мышца ТА нормальных мышцей BL6 WT необработанных SGCG-/- мышцей теряла только 18% генерации силы после цикла из 10 эксцентрических сокращений, по сравнению с 37%-ной потерей силы в необработанной SGCG-/-ТА мышце. SGCG-/- мышцей, обработанные вектором, имели улучшение до указанных выше уровней WT, где наблюдали только 10%-ную потерю силы после протокола эксцентрических сокращений (ECC) (фиг. 11B).

Для дополнительного анализа возможной функциональной пользы, происходящей от системной доставки терапевтического трансгена hSGCG, и, в конечном итоге, улучшающей фенотип заболевания SGCG-/- мышцей, проводили лазерный мониторинг активности в камере "открытое поле" на всех группах мышцей. На графике на фиг. 12 изображено уменьшение на 23,64% общей способности передвигаться в х и у плоскостях у SGCG-/- мышцей, по сравнению с нормальными BL6 WT (BL6 WT: 7655,42 прерывания лучей/ч, в сравнении с SGCG-/-: 5846,00 прерывания лучей/ч). scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG-обработанные мыши в целом были более активны, по сравнению с SGCG-/- мышцами по количеству наблюдаемому, и количественное измерение активности в камере "открытое поле" показало 24,90%-ное увеличение в общей способности передвигаться (SGCG-/-: 5846,00 прерывания лучей/ч, в сравнении с обработанными: 7301,80 прерывания лучей /ч). Точные значения для каждого параметра у отдельных

мышей также измеряли.

Пример 7. Токсикология и биораспределение вектора.

Цель данного исследования заключалась в оценке какой-либо возможной токсичности или проблем безопасности генной терапии hSGCG у SGCG<sup>-/-</sup> мышей через 3 месяца после доставки тестируемого продукта scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG с использованием тех же животных, описанных выше. Тестируемый продукт вводили 5 SGCG<sup>-/-</sup> в общей дозе  $1,0 \times 10^{13}$  vg ( $5 \times 10^{14}$  vg/kg) внутривенным (в.в.) путем в объеме 460 мкл, разбивали на две отдельные инъекции по 230 мкл, утром и днем, в возрасте 4 недели. Шесть SGCG<sup>-/-</sup> мышей служили необработанными контролями с заболеванием, и 5 мышей C57BL/6 WT служили нормальными здоровыми контролями (табл. 6). Полное вскрытие проводили на всех мышках для выделения шести скелетных мышц (TA, GAS, QUAD, GLUT, PSOAS и TRI), как левой, так и правой стороны, наряду с диафрагмой и сердцем, а также внутренних органов, включая легкие, почки, печень, селезенку и гонады. Для оценки безопасности вектора авторов изобретения окрашивание гематоксилином и эозином проводили на криосрезам мышечной ткани и все отобранные органы фиксировали в формалине и также окрашивали гематоксилином и эозином. Данные срезы затем официально проверял на токсичность независимый патологоанатом ветеринар, и вредного воздействия не выявляли, и результаты кратко обобщены ниже в табл. 7, и также получали подробное гистопатологическое заключение. Количественную ПЦР проводили для оценки биораспределения вектора, и данные результаты показаны ниже в табл. 7 и на фиг. 13.

Гистопатологический анализ ткани, трансдуцированной вектором.

Для определения профиля безопасности и токсикологии scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG с использованием системной доставки, все скелетные мышцы, включая диафрагму, наряду с сердцем и пятью другими органами, отобранными из группы SGCG<sup>-/-</sup> мышей, которым вводили дозу вектора, и контроли из данного доклинического исследования окрашивали H&E, и срезы каждой ткани официально рассматривались независимым патологоанатомом ветеринаром. Подробности относительно групп и дизайн исследования показаны в табл. 6.

Таблица 6

Краткая информация по когортам для гистопатологического обзора переноса гена scAAVrh.74.MHCK7.hSGCG

	Генотип	Когорта	Доза (vg)	Пол	Возраст при инъекции и	Возраст при вскрытии	Время обработки
1	SGCG <sup>-/-</sup>	Тестируемый продукт	$1,0 \times 10^{13}$	женский	1 месяц	4 месяца	3 месяца
				женский	1 месяц	4 месяца	3 месяца
				женский	1 месяц	4 месяца	3 месяца
				женский	1 месяц	4 месяца	3 месяца
				женский	1 месяц	4 месяца	3 месяца
2	BL6 WT	Контроль-носитель	LRS	мужской	1 месяц	4 месяца	3 месяца
				мужской	1 месяц	4 месяца	3 месяца
				мужской	1 месяц	4 месяца	3 месяца
				мужской	1 месяц	4 месяца	3 месяца
				мужской	1 месяц	4 месяца	3 месяца
3	SGCG <sup>-/-</sup>	Контроль заболевание	н.п.	женский	н.п.	4 месяца	н.п.
				женский	н.п.	4 месяца	н.п.
				мужской	н.п.	4 месяца	н.п.
				мужской	н.п.	4 месяца	н.п.

Кратко, в.в. инъекция scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG не вызывала никаких микроскопических изменений в мышечных волокнах каких-либо исследуемых скелетных мышц (табл. 7). Кроме того, не наблюдали связанных с обработкой очаговых поражений ни в какой из тканей, оцениваемых гистологически, что указывало на то, что тестируемый продукт хорошо переносился, см. полный отчет в Appendix J (№ отчета AAVrh74-SGCG-MOUSE-001.1). Любые отмечаемые изменения видели как у обработанных, так и контрольных мышей, и рассматривались как случайный результат. Кроме того, независимый обзор показал, что относительно референсных образцов от контрольных мышей введение тестируемого продукта scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG по существу снижало атрофию, дегенерацию и разрушение мышечных волокон, что свидетельствует о том, что вектор может улучшать степень миопатии, ассоциированной с отсутствием SGCG у больных мышей.

Таблица 7

Результаты гистопатологии исследования безопасности scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG у SGCG-/- мышей

Тестируемый продукт (доза вектора)	Возраст при инъекции	Продолжительность обработки	Анализируемые ткани	Официальная гистопат.
scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG (общая доза 1e13vg – 5e14vg/kg) 5 анализируемых животных	1 месяц	3 месяца	Скелетные мышцы, сердце, легкие, почка, печень, селезенка, гонады	Нет данных

Биораспределение генома вектора.

Наличие ДНК-последовательностей, специфичных к тестируемому продукту, исследовали, используя анализ на основе количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР). Анализ биораспределения проводили на образцах тканей, собранных у двух SGCG-/- животных, которым вводили дозу вектора. Положительный сигнал в какой-то мере равен или больше чем 100 выявленных копий одноцепочечной ДНК/мкг геномной ДНК. Ткани отбирали при вскрытии, и использовали наборы специфичных в отношении вектора праймеров-зондов, специфичных к последовательностям промотора МНСК7. В табл. 8 и на фиг. 13 изображены копии генома вектора, выявленные в каждом образце ткани от мышей, которым инъецировали scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG.

Транскрипт scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG выявляли при варьирующих уровнях во всех отобранных тканях. Как и ожидалось, в то время как вектор выявляли при высоких уровнях в печени ввиду природы внутривенного пути доставки, самые высокие уровни наблюдали в скелетной мышце и сердце. Самые низкие уровни выявляли в легких, почке и селезенке. Эти данные указывают на то, что тестируемый продукт эффективно доставлялся во все исследуемые ткани мышей, которым вводили дозу вектора.

Таблица 8

Результаты количественной ПЦР после системной доставки высокой дозы scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG SGCG-/- мышцам

Ткань	Копии генома вектора /мкг	
	5229	5231
Сердце	1,56E+06	1,30E+06
Легкое	1,15E+05	2,29E+05
Почка	1,74E+05	2,48E+05
Печень	9,23E+06	1,50E+07
Селезенка	1,58E+05	9,05E+04
Диафрагма	4,63E+05	1,60E+06
TRI	3,35E+05	3,48E+05
TA	6,23E+05	6,70E+05

Биохимический анализ сыворотки.

Для дополнительной оценки функции печени заявитель оценивал уровни двух ферментов печени, которые являются параметрами биохимического анализа нормальной сыворотки, аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Оценка любого из данных ферментов может свидетельствовать о повреждении гепатоцитов и нарушенной функции печени. Заявитель анализировал сыворотку от всех 6 мышей C57BL/6 WT, всех 6 необработанных SGCG-/- мышей и всех 5 мышей, которым вводили дозу scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG. На фиг. 14А показано увеличение уровня АЛТ у необработанных SGCG-/- мышей с удвоением уровней, наблюдаемых у здоровых мышей BL6 WT (BL6 WT: 44,20 ед/л в

сравнении с SGCG-/-: 89,00 ед/л). В.в. доставка scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG SGCG-/- мышам приводила к уменьшению уровней АЛТ на 32,02% (SGCG-/-: 89,00 ед./л в сравнении с обработанными: 60,50 ед./л). На фиг. 14В показаны уровни АСТ во всех трех группах мышей, показано значимое 113,27%-ное увеличение у необработанных SGCG-/- мышей (BL6 WT: 326,00 ед/л в сравнении с SGCG-/-: 695,25 ед/л). Данные уровни АСТ снижались на 41,10% после системной доставки scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG (фиг. 14В). В целом, в то время как уровни ферментов печени, считающихся биомаркерами повреждения печени, повышены у больных SGCG-/- мышей, системный перенос гена hSGCG у больных SGCG-/- мышей приводит в норму как уровни АЛТ, так и АСТ. Определяли отдельные значения для каждого фермента у всех мышей.

В заключение, было показано, что системная доставка двух разных доз вируса AAV, несущего трансген hSGCB, является безопасной и нетоксичной. Тестируемые дозы включают общую дозу  $1,2 \times 10^{13}$  vg ( $6,0 \times 10^{14}$  vg/кг) и общую дозу  $1,0 \times 10^{13}$  vg ( $5,0 \times 10^{14}$  vg/кг). В частности, системная доставка высокой дозы (общая доза  $1,0 \times 10^{13}$  vg -  $5,0 \times 10^{14}$  vg/кг) scAAVrh.74.МНСК7.hSGCG через хвостовую вену SGCG-/- является безопасной и эффективной в восстановлении экспрессии  $\gamma$ -саркогликана и купировании дистрофической гистопатологии в мышце, пораженной заболеванием.

#### Перечень последовательностей

<110> RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL

<120> ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ПРОТИВ ТАЗОВО-ПЛЕЧЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ТИПА 2С

<130> 106887-7141

<140>

<141>

<150> 62/624, 616

<151> 2018-01-31

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 876

<212> ДНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 1

```

atggtgaggg agcagtacac cacagcaacc gagggaaatct gcatcgagag gccagagaac      60
cagtacgtgt ataagatcgg catctacggc tggcggaaga gatgtctgta tctgttcgtg      120
ctgctgctgc tgatcatcct ggtggtgaat ctggccctga ccatctggat cctgaaagtg      180
atgtgggtttt cccagcagg aatgggacac ctgtgcgtga caaaggacgg actgcggtctg      240
gagggagagt ctgagttcct gtttcccctg tatgccaagg agatccacag cagagtggat      300
agctccctgc tgctgcagtc caccagaac gtgacagtga acgcaaggaa tagcgagggg      360
gaggtgaccg gcagactgaa ggtcggcccc aagatggtgg aggtgcagaa tcagcagttc      420
cagatcaact ccaatgacgg caagcctctg tttacagtgg atgagaagga ggtggtggtg      480
ggcacccgaca agctgaggggt gacaggacct gagggcgccc tgttcgagca ctctgtggag      540
acccactgg tgccgcgaga cccttttcag gatctgaggc tggagagccc aacacgcagc      600

```

045951

ctgtccatgg acgcacccag aggcgtgcac atccaggcac acgcaggcaa gatcgaggcc 660  
ctgagccaga tggatatacct gttccactct agcgacggca tgctgggtgct ggatgccgag 720  
accgtgtgcc tgccctaagct ggtgcagggc acatggggcc catctggctc ctctcagagc 780  
ctgtacgaga tctgcgtgtg cccagatggc aagctgtatc tgtccgtggc cggcgtgtct 840  
accacatgcc aggagcaciaa ccacatctgt ctgtga 876

<210> 2  
<211> 291  
<212> ПРТ  
<213> Homo sapiens

<400> 2  
Met Val Arg Glu Gln Tyr Thr Thr Ala Thr Glu Gly Ile Cys Ile Glu  
1 5 10 15

Arg Pro Glu Asn Gln Tyr Val Tyr Lys Ile Gly Ile Tyr Gly Trp Arg  
20 25 30

Lys Arg Cys Leu Tyr Leu Phe Val Leu Leu Leu Leu Ile Ile Leu Val  
35 40 45

Val Asn Leu Ala Leu Thr Ile Trp Ile Leu Lys Val Met Trp Phe Ser  
50 55 60

Pro Ala Gly Met Gly His Leu Cys Val Thr Lys Asp Gly Leu Arg Leu  
65 70 75 80

Glu Gly Glu Ser Glu Phe Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Lys Glu Ile His  
85 90 95

Ser Arg Val Asp Ser Ser Leu Leu Leu Gln Ser Thr Gln Asn Val Thr  
100 105 110

Val Asn Ala Arg Asn Ser Glu Gly Glu Val Thr Gly Arg Leu Lys Val  
115 120 125

Gly Pro Lys Met Val Glu Val Gln Asn Gln Gln Phe Gln Ile Asn Ser  
130 135 140

Asn Asp Gly Lys Pro Leu Phe Thr Val Asp Glu Lys Glu Val Val Val  
145 150 155 160

Gly Thr Asp Lys Leu Arg Val Thr Gly Pro Glu Gly Ala Leu Phe Glu  
165 170 175

His Ser Val Glu Thr Pro Leu Val Arg Ala Asp Pro Phe Gln Asp Leu

045951

180 185 190

Arg Leu Glu Ser Pro Thr Arg Ser Leu Ser Met Asp Ala Pro Arg Gly  
195 200 205

Val His Ile Gln Ala His Ala Gly Lys Ile Glu Ala Leu Ser Gln Met  
210 215 220

Asp Ile Leu Phe His Ser Ser Asp Gly Met Leu Val Leu Asp Ala Glu  
225 230 235 240

Thr Val Cys Leu Pro Lys Leu Val Gln Gly Thr Trp Gly Pro Ser Gly  
245 250 255

Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Glu Ile Cys Val Cys Pro Asp Gly Lys Leu  
260 265 270

Tyr Leu Ser Val Ala Gly Val Ser Thr Thr Cys Gln Glu His Asn His  
275 280 285

Ile Cys Leu  
290

<210> 3

<211> 2225

<212> ДНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 3

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60

ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgcgagc gcgagagagg gagtgggggtt aaccaattgg 120

cgcgcccgca agcttgcatg tctaagctag acccttcaga ttaaaaataa ctgaggtaag 180

ggcctgggta ggggaggtgg tgtgagacgc tctgtctct cctctatctg cccatcggcc 240

ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaggc catggagcca gagggcgag 300

ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg 360

gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 420

taaccagac atgtggctgc ccccccccc ccaacacctg ctgcctctaa aaataaccct 480

gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat cttcgaaca ggctgtgggg gactgagggc 540

aggctgtaac aggcttgggg gccagggctt atacgtgcct gggactcca aagtattact 600

gttccatggt cccggcgaag ggccagctgt cccccccag ctagactcag cacttagttt 660

## 045951

aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa	720
gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg	780
ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctctgggcta gtcacaccct gtaggctcct	840
ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac	900
agacactcag gagcagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt	960
caggtcccgg atccgggtgg ggtgcaaatc aaagaactgc tcctcagtgg atgttgcctt	1020
tacttctagg cctgtacgga agtggtactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtaccggg	1080
taccaccatg gtgagggagc agtacaccac agcaaccgag ggaatctgca tcgagaggcc	1140
agagaaccag tacgtgtata agatcggcat ctacggctgg cggaagagat gtctgtatct	1200
gttcgtgctg ctgctgctga tcatcctggg ggtgaatctg gccctgacca tctggatcct	1260
gaaagtgatg tggttttccc cagcaggaat gggacacctg tgcgtgacaa aggacggact	1320
gcggtctggag ggagagtctg agttcctggt tcccctgtat gcccaaggaga tccacagcag	1380
agtggatagc tcctctgctg tgcagtccac ccagaacgtg acagtgaacg caaggaatag	1440
cgagggagag gtgaccggca gactgaaggc cggccccaag atggaggagg tgcagaatca	1500
gcagttccag atcaactcca atgacggcaa gcctctgttt acagtggatg agaaggagg	1560
ggtggtgggc accgacaagc tgaggggtgac aggacctgag ggcgccctgt tcgagcactc	1620
tgtggagacc ccaactggtg gcgcagaccc ttttcaggat ctgaggctgg agagcccaac	1680
acgcagcctg tccatggacg caccagagg cgtgcacatc caggcacacg caggcaagat	1740
cgaggccctg agccagatgg atatcctggt ccaactctagc gacggcatgc tgggtgctgga	1800
tgccgagacc gtgtgcctgc ctaagctggg gcagggcaca tggggcccat ctggctcctc	1860
tcagagcctg tacgagatct gcgtgtgccc agatggcaag ctgtatctgt ccgtggccgg	1920
cgtgtctacc acatgccagg agcacaacca catctgtctg tgactcgagg gccgcaataa	1980
aagatcttta ttttcattag atctgtgtgt tggttttttg tgtgtcctgc aggggcgcgc	2040
ctaactctaga gcatggctac gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt aactacaagg	2100
aaccctagt gatggagtgt gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg	2160
ggcgacaaa ggtcgcccga cggccgggct ttgcccgggc ggctcagtg agcgagcgag	2220
cgcgc	2225

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 792

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная Последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

045951

<400> 4  
aagcttgcat gtctaagcta gacccttcag attaaaaata actgaggtaa gggcctgggt 60  
aggggaggtg gtgtgagacg ctctgtctc tcctctatct gcccatcggc cctttgggga 120  
ggaggaatgt gcccaaggac taaaaaaagg ccatggagcc agaggggcca gggcaacaga 180  
cctttcatgg gcaaaccttg gggccctgct gtctagcatg cccactacg ggtctaggct 240  
gcccatgtaa ggaggcaagg cctggggaca ccgagatgc ctggttataa ttaaccaga 300  
catgtggctg ccccccccc cccaacaact gctgcctcta aaaataacct tgtccctggt 360  
ggatcccctg catgcgaaga tcttogaaca aggctgtggg ggactgaggg caggctgtaa 420  
caggcttggg ggccagggtc tatacgtgcc tgggactccc aaagtattac tgttccatgt 480  
tcccggcgaa gggccagctg tcccccgcca gctagactca gcacttagtt taggaaccag 540  
tgagcaagtc agcccttggg gcagcccata caaggccatg gggctgggca agctgcacgc 600  
ctgggtccgg ggtgggcacg gtgcccgggc aacgagctga aagctcatct gctctcaggg 660  
gcccctccct ggggacagcc cctcctggct agtcacaccc tgtaggctcc tctatataac 720  
ccaggggac aggggctgcc ctattctac caccacctcc acagcacaga cagacactca 780  
ggagcagcca gc 792

<210> 5  
<211> 148  
<212> ДНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 5  
aggtaagttt agtctttttg tcttttattt cagggtcccgg atccgggtgg ggtgcaaadc 60  
aaagaactgc tcctcagtgg atggtgcctt tacttctagg cctgtacgga agtgttactt 120  
ctgctctaaa agctgcggaa ttgtacc 148

<210> 6  
<211> 53  
<212> ДНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 6  
ggccgcaata aaagatcttt attttcatta gatctgtgtg ttggtttttt gtg 53

<210> 7  
<211> 110

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная Последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

&lt;400&gt; 7

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgsc cgggcaaaagc ccgggcgctcg ggcgaccttt 60

ggtcgccccg cctcagtgag cgaгсgagcg cgcagagagg gagtggggtt 110

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 104

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная Последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

&lt;400&gt; 8

ссactccctc tctgсgсgct cгctcgctca ctgaggccgг gcgaccaaaг gtcgccccgac 60

gccccgggctt tgccccgggсg gcctcagtgа gcgagcгagc gcgc 104

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 876

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

atgggtgсgtg агсagtacac tacagccaca gaaggcatct gcatagagag gccagagaat 60

cagtatgtct acaaaaattgg catttatggc tggagaaagc gctgtctcta cttgtttggt 120

cttcttttac tcatcatcct cgttgtgaat ttagctctta caatttggat tcttaaagtг 180

atgtggtttt ctccagcagg aatggggccac ttgtgtgtaa caaaagatgg actgсgcttg 240

gaaggggaat cagaattttt attcccattg tatgccaaag aaatacactc cagagtggac 300

tcatctctgc tgctacaatc aaccсagaat gtgactgtaa atgсgсgcaa ctсagaaggг 360

gaggtcacag gcaggttaaa агtcggтccc aaaatggtag aagtccagaa tcaacagttt 420

cagatcaact ccaacгacгг caagccacta tttactgtag atgagaagga агttgtggtt 480

ggtacagata aacttcgagt aactgggсct gaaggggctc tttttgaaca ttcagtggag 540

acaccсcttg tcagagccga cccgtttcaa gaccttagat tagaatcccc cactcгgagт 600

ctaagcatgg atgccccaaг ggggtgtgcat attcaagctc acgctgggaa aattgaggcg 660

ctttctcaaa tggatattct ttttcatagt агtgatggaa tgcttgtgct tgatgctgaa 720

actgtgtgct taccсaagct ggtgcagggg acgtggggtc cctctggcag ctсacagagc 780

ctctacgaaa tctgtgtgtg tccagatggg aagctgtacc tgtctgtggc cgggtgtgagc 840

accacgtgcc aggagcacag ccacatctgc ctctga 876

## 045951

<210> 10  
 <211> 535  
 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная Последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 10  
 Met Ala Ala Gly Gly Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp  
 20 25 30  
 Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro  
 35 40 45  
 Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly  
 50 55 60  
 Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp  
 85 90 95  
 Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn  
 100 105 110  
 Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly  
 115 120 125  
 Thr Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr  
 130 135 140  
 Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly  
 145 150 155 160  
 Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly  
 165 170 175  
 Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe  
 180 185 190  
 Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn  
 195 200 205  
 Phe Glu Phe Ser Tyr Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr

## 045951

210						215											220
Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln		
225					230					235					240		
Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Arg	Thr	Gln	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly		
				245					250					255			
Thr	Gln	Gln	Leu	Leu	Phe	Ser	Gln	Ala	Gly	Pro	Asn	Asn	Met	Ser	Ala		
			260					265					270				
Gln	Ala	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro	Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val		
		275					280					285					
Ser	Thr	Thr	Leu	Ser	Gln	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Ala	Trp	Thr	Gly		
	290					295					300						
Ala	Thr	Lys	Tyr	His	Leu	Asn	Gly	Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Pro	Gly		
305					310					315					320		
Val	Ala	Met	Ala	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Glu	Glu	Arg	Phe	Phe	Pro	Ser		
				325					330					335			
Ser	Gly	Val	Leu	Met	Phe	Gly	Lys	Gln	Gly	Ala	Gly	Lys	Asp	Asn	Val		
			340					345					350				
Asp	Tyr	Ser	Ser	Val	Met	Leu	Thr	Ser	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr		
		355					360					365					
Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Gln	Tyr	Gly	Val	Val	Ala	Asp	Asn	Leu	Gln		
	370					375					380						
Gln	Gln	Asn	Ala	Ala	Pro	Ile	Val	Gly	Ala	Val	Asn	Ser	Gln	Gly	Ala		
385					390					395					400		
Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	Asn	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro		
				405					410					415			
Ile	Trp	Ala	Lys	Ile	Pro	His	Thr	Asp	Gly	Asn	Phe	His	Pro	Ser	Pro		
			420					425					430				
Leu	Met	Gly	Gly	Phe	Gly	Leu	Lys	His	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile		
		435					440					445					
Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Thr	Phe	Asn	Gln	Ala		
	450					455					460						

045951

Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val  
465 470 475 480

Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro  
485 490 495

Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe  
500 505 510

Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr  
515 520 525

Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
530 535

<210> 11

<211> 2217

<212> ДНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 11

atggctgccc atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60  
gagtgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaaccsaaag ccaaccagca aaagcaggac 120  
aacggccggg gtctgggtgct tcttggttac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180  
aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcgccctcg agcacgaca ggcctacgac 240  
cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cggcgagttt 300  
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgcgc agtcttccag 360  
gccaaaaagc gggttctcga acctctgggc ctggttgaat cgccgggtaa gacggctcct 420  
ggaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgtctc cagactcctc tacgggcatc 480  
ggcaagaaag gccagcagcc cgcaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcgactca 540  
gagtcagctc ccgacctca accaatcgga gaaccaccag caggccctc tgggtctggga 600  
tctggtacaa tggctgcagg cgggtggcgt ccaatggcag acaataacga aggcgcccag 660  
ggagtgggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720  
atcaccacca gcacctgcac ctgggcccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa 780  
atctccaacg ggacctcggg aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc 840  
ccctgggggt attttgactt caacagattc cactgccact tttcaccacg tgactggcag 900  
cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaacttcaa gctcttcaac 960  
atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgccaa taaccttacc 1020

```

agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg      1080
caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac      1140
ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggctgt ctttctactg cctggagtac      1200
tttcctttctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgaat tcagctacaa cttcgaggac      1260
gtgcccttcc acagcagcta cgcgcacagc cagagcctgg accggctgat gaaccctctc      1320
atcgaccagt acttgtaacta cctgtcccgg actcaaagca cgggcggtac tgcaggaact      1380
cagcagttgc ttttttctca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg      1440
ctaccgggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac      1500
agcaactttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg      1560
aatcctggcg ttgcatggc taccacaag gacgacgaag agcgatTTTT tccatccagc      1620
ggagtcttaa tgtttgggaa acagggagct ggaaaagaca acgtggacta tagcagcgtg      1680
atgctaacca gcgaggaaga aataaagacc accaaccagc tggccacaga acagtacggc      1740
gtggtggccg ataacctgca acagcaaac gccgctccta ttgtaggggc cgtcaatagt      1800
caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca gggccccatc      1860
tgggccaaga ttctcatac ggacggcaac tttcatccct cgccgctgat gggaggcttt      1920
ggactgaagc atccgctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgttcc cgcggatcct      1980
ccgaccacct tcaatcaggc caagctggct ttttcatca cgcagtacag taccggccag      2040
gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag      2100
attcagtaca cttccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag      2160
ggtacttatt cggagcctcg cccattggc acccgttacc tcaccgtaa tctgtaa      2217

```

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение рекомбинантного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для получения лекарственного средства для лечения  $\gamma$ -саркогликанопатии; увеличения мышечной силы, выносливости мышц и/или мышечной массы; или для уменьшения фиброза или повреждения, вызванного сокращениями, у субъекта, где вектор гAAV содержит полинуклеотидную последовательность, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

2. Применение рекомбинантного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для получения лекарственного средства для лечения  $\gamma$ -саркогликанопатии, где вектор гAAV содержит полинуклеотидную последовательность, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую  $\gamma$ -саркогликан, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

3. Применение рекомбинантного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для получения лекарственного средства для уменьшения жировой инфильтрации или центральной нуклеации у субъекта, где вектор гAAV содержит полинуклеотидную последовательность, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

4. Применение по любому из пп.1-3, где полинуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1.

5. Применение по любому из пп.1-4, где вектор гAAV содержит самокомплементарный геном вектора AAV.

6. Применение по любому из пп.1-5, где вектор гAAV содержит геном, не содержащий ДНК гер и сар AAV.

7. Применение по любому из пп.1-6, где вектор гAAV принадлежит к серотипу AAV1, AAV2,

AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 или AAV rh74 или их варианту.

8. Применение по п.6, где указанный вектор гAAV содержит капсид AAV rh.74.

9. Применение по п.8, где капсид AAV rh.74 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10.

10. Применение по любому из пп.1-9, где геном вектора гAAV содержит регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы, необязательно выбранный из группы, состоящей из элемента гена актина скелета человека, элемента гена сердечного актина, элемента миоцит-специфичного энхансер-связывающего фактора (*mef*), промотора креатинкиназы мышцы (МСК), промотора усеченной МСК (tМСК), элемента тяжелой цепи миозина (МНС), промотора МНСК7, C5-12, энхансерного элемента мышечной креатинкиназы, элемента гена тропонина с быстро сокращающейся скелетной мышцы, элемента гена тропонина с медленно сокращающейся сердечной мышцы, элемента гена тропонина I медленно сокращающейся мышцы, элемента ядерных факторов, индуцируемых гипоксией, стероид-индуцибельного элемента и глюкокортикоид-отвечающего элемента (*gre*).

11. Применение по п.10, где регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы, представляет собой усеченную МСК (tМСК).

12. Применение по любому из пп.1-11, где промотор представляет собой промотор МНСК7.

13. Применение по п.12, где промотор МНСК7 содержит нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4.

14. Применение по любому из пп.1-13, где геном вектора гAAV содержит интрон, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5.

15. Применение по любому из пп.1-14, где полинуклеотидная последовательность кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

16. Способ лечения  $\gamma$ -саркогликанопатии у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей вектор гAAV, включающий в себя полинуклеотидную последовательность, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Способ по п.16, где субъект страдает тазово-плечевой мышечной дистрофией.

18. Способ по п.17, где тазово-плечевая мышечная дистрофия представляет собой тазово-плечевую мышечную дистрофию типа 2С.

19. Способ по любому из пп.16-18, где указанную композицию вводят путем внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

20. Способ по любому из пп.16-19, включающий системное введение указанной композиции.

21. Способ по любому из пп.16-20, где композицию вводят парентерально посредством инъекции, инфузии или имплантации.

22. Способ по любому из пп.16-21, увеличивающий мышечную силу, выносливость мышц и/или мышечную массу одной или более мышц субъекта.

23. Способ по п.22, где одна или более мышц выбраны из группы, состоящей из сердца, диафрагмы, бедер, голени, тазового пояса, плеча и руки.

24. Применение по любому из пп.1-3, где мышечная сила, выносливость мышц и/или мышечная масса увеличивается по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 50% или по меньшей мере примерно на 80%, по сравнению с необработанным контрольным субъектом.

25. Рекомбинантный вектор AAV (гAAV), содержащий капсид AAV и экспрессионную кассету с геном, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую  $\gamma$ -саркогликан под транскрипционным контролем промотора, при этом указанный вектор гAAV содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

26. Вектор гAAV по п.25, в котором экспрессионная кассета с геном фланкирована одним или более инвертированными концевыми повторами AAV.

27. Вектор гAAV по п.25, в котором полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, содержит нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1.

28. Вектор гAAV по любому из пп.25-27, где вектор принадлежит к серотипу AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 или AAV rh74 или их варианту.

29. Вектор гAAV по любому из пп.25-28, причем геном вектора гAAV содержит регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы, необязательно выбранный из группы, состоящей из элемента гена актина скелета человека, элемента гена сердечного актина, элемента миоцит-специфичного энхансер-связывающего фактора (*mef*), промотора креатинкиназы мышцы (МСК), промотора усеченной МСК (tМСК), элемента тяжелой цепи миозина (МНС), МНСК7, C5-12, энхансерного элемента мышечной креатинкиназы, элемента гена тропонина с быстро сокращающейся скелетной мышцы, элемента гена тропонина с медленно сокращающейся сердечной мышцы, элемента гена тропонина I медленно сокращающейся мышцы, элемента ядерных факторов, индуцируемых гипоксией, стероид-индуцибельного элемен-

та и глюкокортикоид-отвечающего элемента (gre).

30. Вектор gAAV по п.29, в котором регуляторный элемент, специфичный в отношении мышцы, представляет собой усеченную МСК (tМСК).

31. Вектор gAAV по любому из пп.25-30, в котором промотор представляет собой МНСК7.

32. Вектор gAAV по п.31, в котором промотор МНСК7 содержит нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4.

33. Вектор gAAV по любому из пп.25-32, в котором геном вектора gAAV содержит нуклеотидную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5.

34. Вектор gAAV по любому из пп.25-33, в котором полинуклеотидная последовательность, кодирующая  $\gamma$ -саркогликан, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

35. Композиция для лечения  $\gamma$ -саркогликанопатии у субъекта, причем лечение приводит к:  
 увеличению мышечной силы, выносливости мышц и/или мышечной массы у субъекта;  
 уменьшению фиброза у субъекта;  
 уменьшению повреждения, вызванного сокращениями, у субъекта;  
 лечению мышечной дистрофии у субъекта, страдающего мышечной дистрофией;  
 уменьшению дегенерации волокон или некротических волокон у субъекта, страдающего мышечной дистрофией;  
 уменьшению воспаления у субъекта, страдающего мышечной дистрофией;  
 повышению уровней креатинкиназы у субъекта, страдающего мышечной дистрофией;  
 лечению атрофии и гипертрофии мышечных волокон у субъекта, страдающего мышечной дистрофией;  
 уменьшению дистрофического обызвествления у субъекта, страдающего мышечной дистрофией;  
 уменьшению жировой инфильтрации у субъекта; или  
 уменьшению центральной нуклеации у субъекта;  
 где композиция содержит вектор gAAV по любому из пп.25-34 и фармацевтически приемлемый носитель.

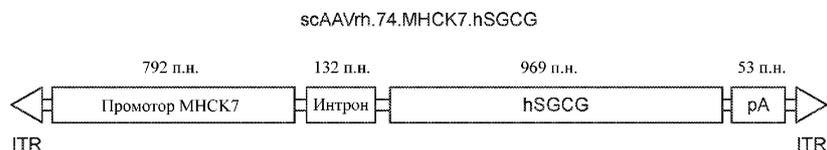
36. Композиция по п.35, содержащая раствор Рингера-лактат (LRS).

37. Клетка-хозяин, содержащая вектор gAAV по любому из пп.25-34 или полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

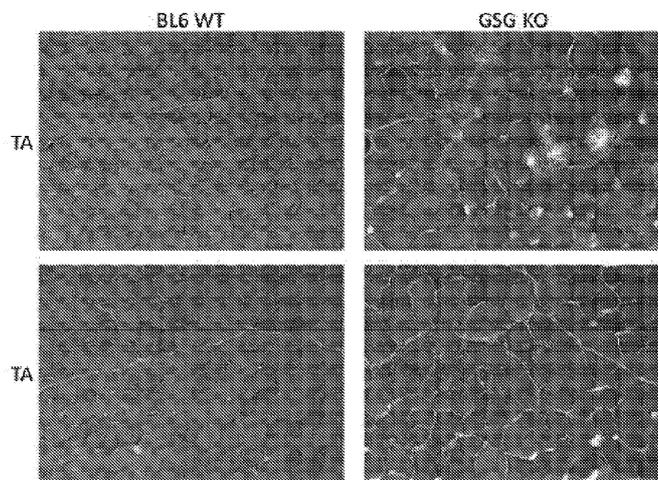
38. Композиция по любому из пп.35-36, дополнительно содержащая кортикостероид.

39. Набор для лечения  $\gamma$ -саркогликанопатии, содержащий композицию по любому из пп.35-36.

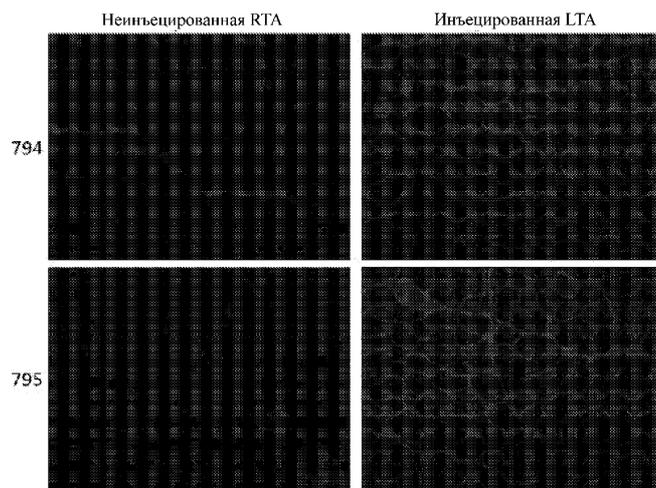
40. Набор по п.39, дополнительно содержащий кортикостероид.



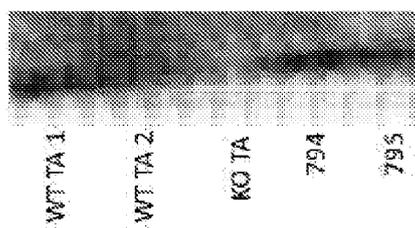
Фиг. 1



Фиг. 2



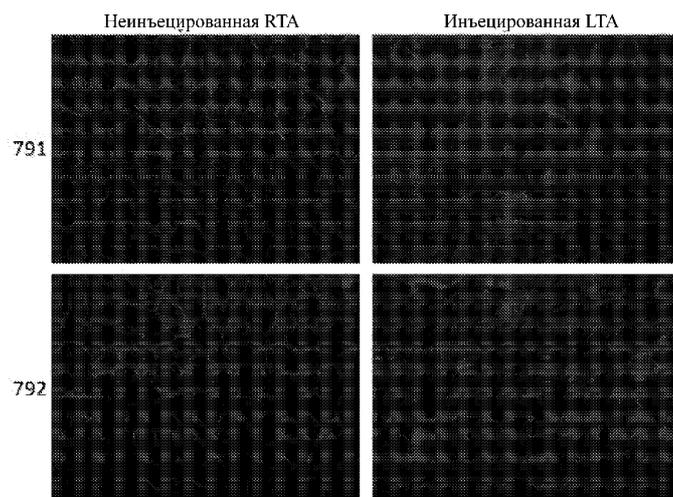
Фиг. 3А



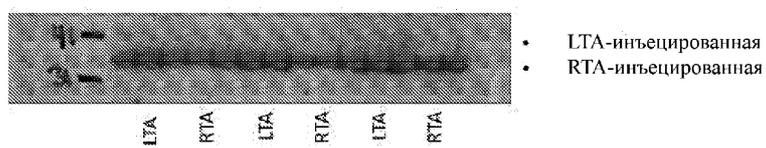
Фиг. 3В



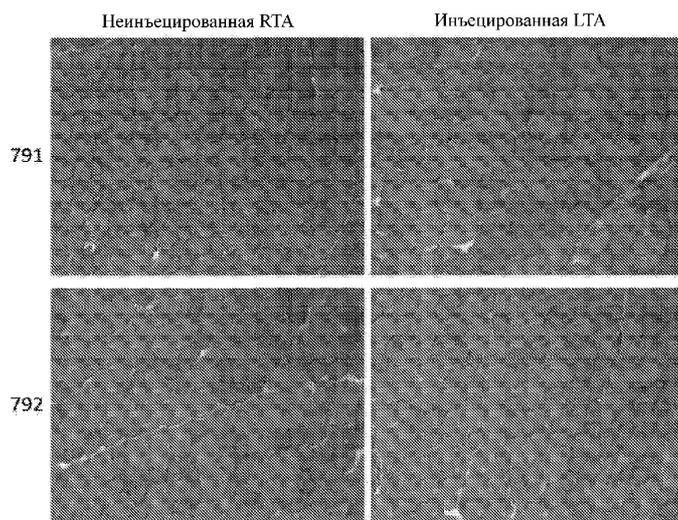
Фиг. 3С



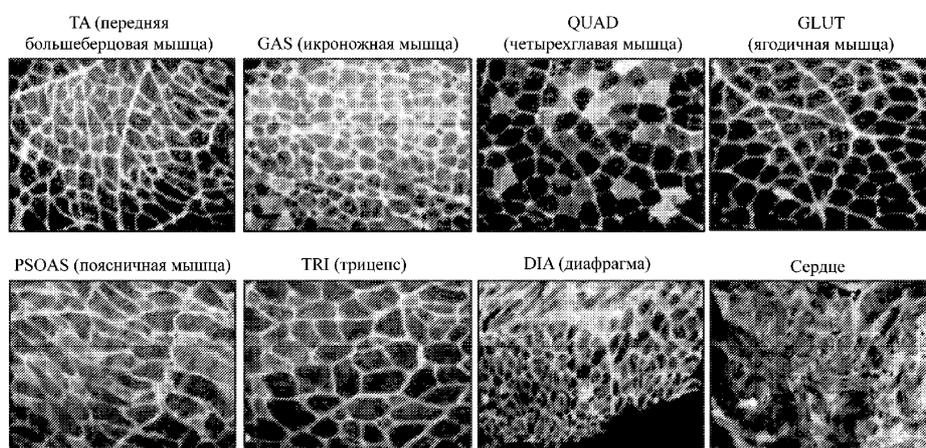
Фиг. 4А



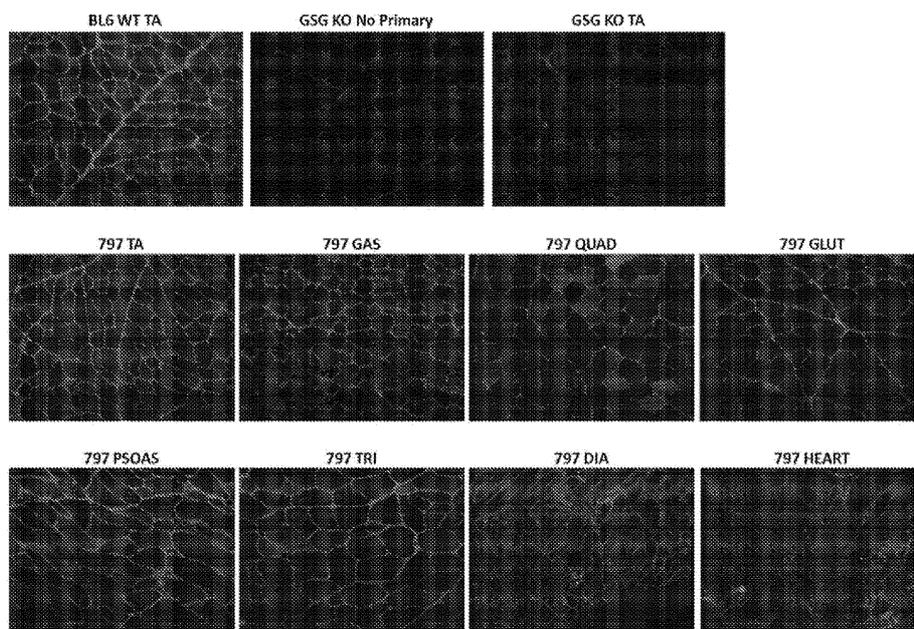
Фиг. 4В



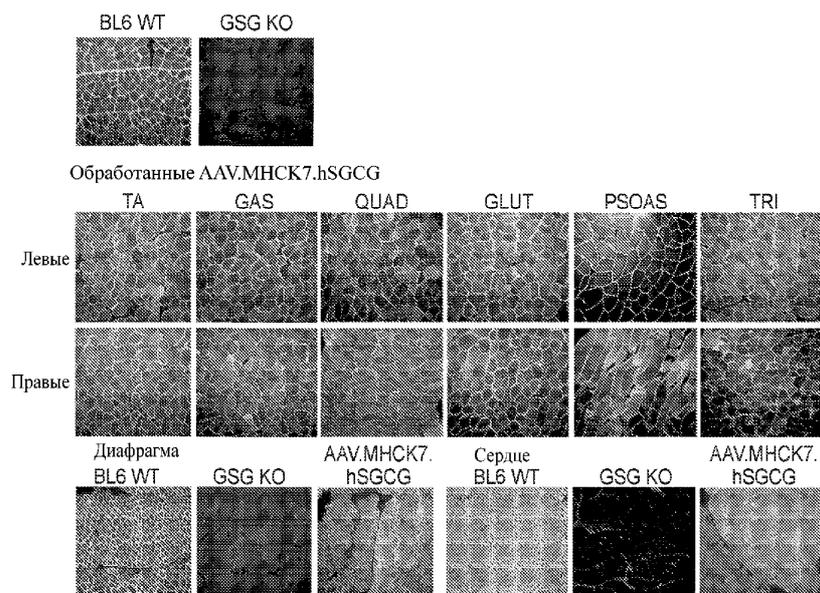
Фиг. 5



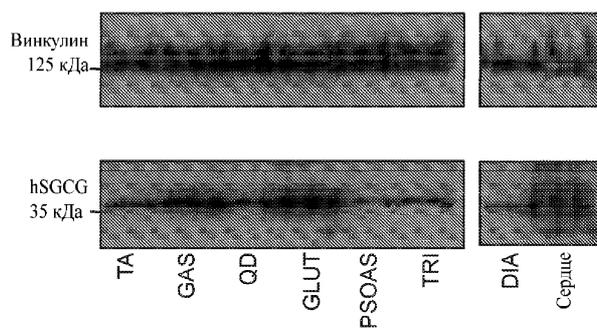
Фиг. 6



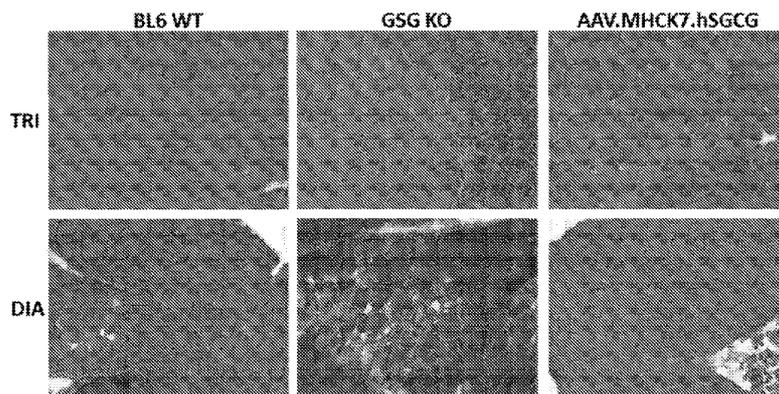
Фиг. 7



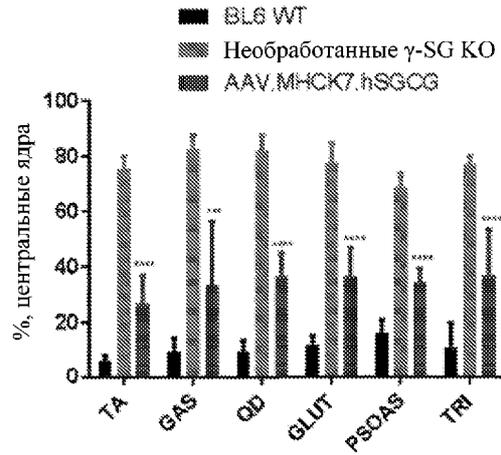
Фиг. 8А



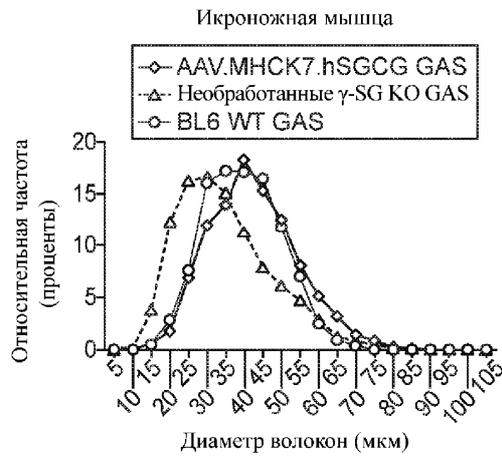
Фиг. 8В



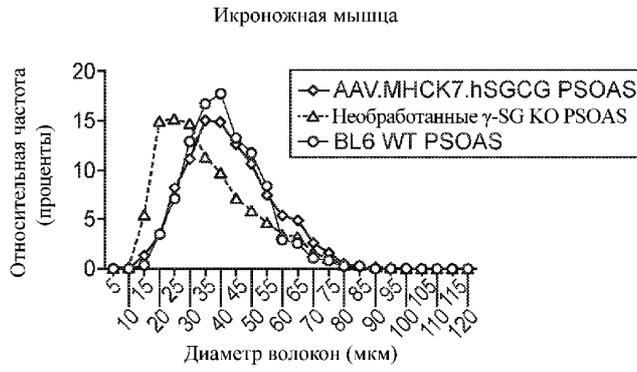
Фиг. 9А



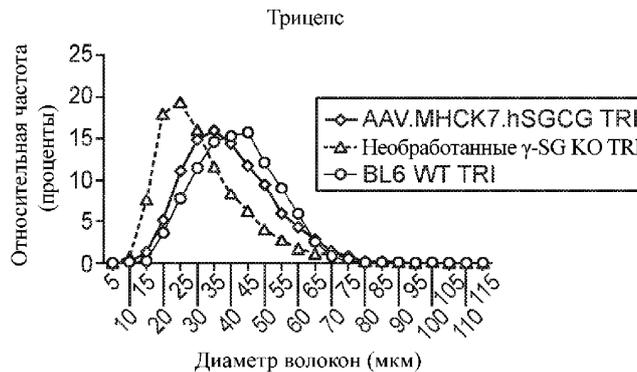
Фиг. 9B



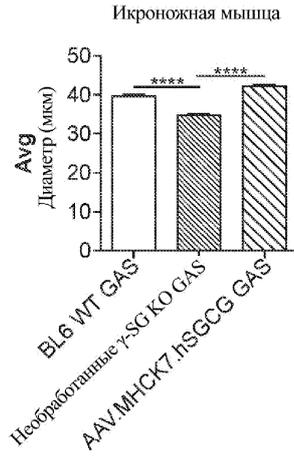
Фиг. 10A



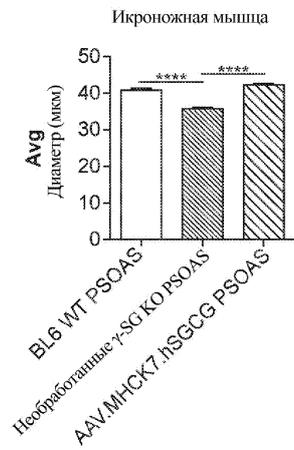
Фиг. 10B



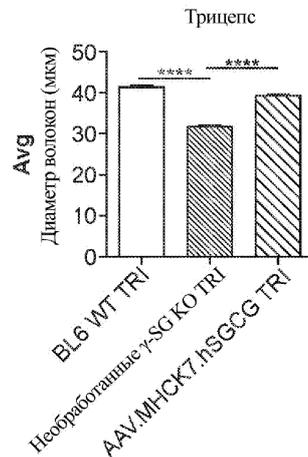
Фиг. 10C



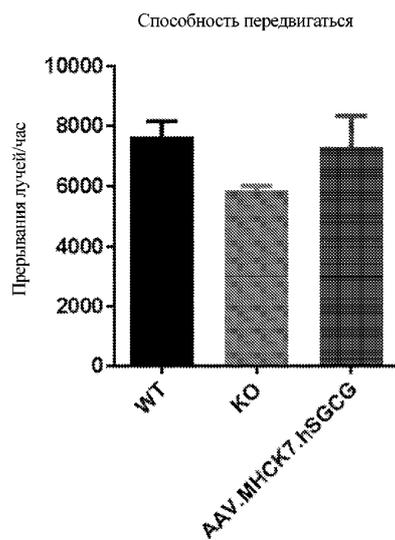
Фиг. 10D



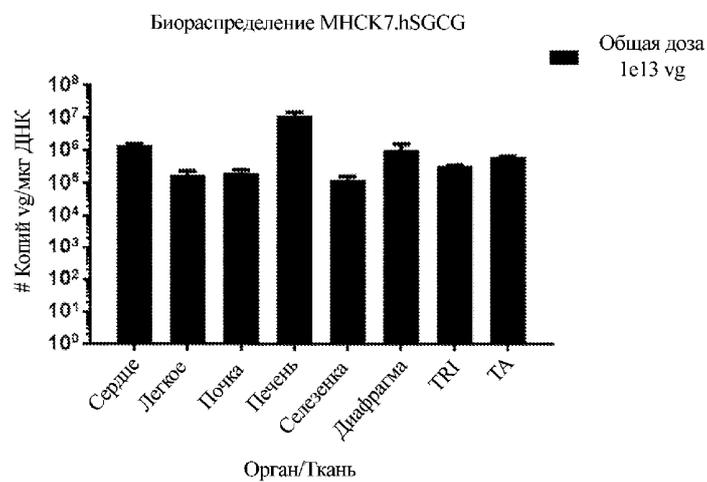
Фиг. 10E



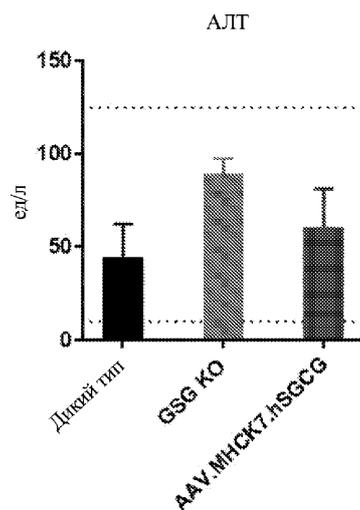
Фиг. 10F



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14А

045951

