

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046506**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.03.21**

**(21)** Номер заявки  
**201992426**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.05.14**

**(51)** Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*A61P 13/10* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*A61K 9/51* (2006.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ИДИОПАТИЧЕСКОЙ ГИПЕРАКТИВНОСТИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И ГИПЕРАКТИВНОСТИ ДЕТРУЗОРА**

---

**(31)** 62/505,382

**(32)** 2017.05.12

**(33)** US

**(43)** 2020.05.06

**(86)** PCT/US2018/032574

**(87)** WO 2018/209351 2018.11.15

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АЙОН ЧЭННЕЛ ИННОВЕЙШНЗ,  
ЛЛС (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Мелман Арнольд, Крайст Джордж  
(US), Андерссон Карл-Эрик (SE)**

**(74)** Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

**(56)** WO-A2-2015021061

Anonymous: "Phase 1 Study in Subjects With OAB Assessing the Safety and Activity of hMaxi-K Gene Transfer (OAB)", ClinicalTrials.gov archive, 3 June 2013 (2013-06-03), XP002783575, Retrieved from the Internet:URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NC T01870037 [retrieved on 2018-08-02] the whole document, please refer especially to the "Arms and Interventions"

ARYEH KEEHN ET AL.: "MP8-13 PLASMID-BASED CELL-SPECIFIC GENE TRANSFER TO TREAT OVERACTIVE BLADDER SYNDROME", THE JOURNAL OF UROLOGY, vol. 193, no. 4S, 15 May 2015 (2015-05-15), page e77, XP055497188, abstract  
RU-C1-2605624

**(57)** Настоящее изобретение предусматривает способы уменьшения выраженности одного или нескольких признаков или симптомов заболеваний гладких мышц. Композиции согласно настоящему изобретению могут включать плазмидный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует пептид канала Maxi-K. Композиции согласно настоящему изобретению могут вводиться в единичной стандартной дозе интрадетрузорно по меньшей мере в два или более участков.

**B1**

**046506**

**046506  
B1**

### **Родственные заявки**

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки USSN 62/505382, поданной 12 мая 2017 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

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

Настоящее изобретение в целом относится к области медицинских средств терапии для улучшения одного или нескольких симптомов, связанных с дисфункцией гладких мышц. В частности, дисфункцией гладких мышц мочевого пузыря.

### **Включение перечня последовательностей**

Полное содержание текстового файла с именем IONC-002-001WO\_SeqList.txt, созданного 11 мая 2018 года и имеющего размер 30 Кбайт, включено в данный документ посредством ссылки.

### **Предпосылки изобретения**

Аномальная функция мочевого пузыря является распространенной проблемой, которая значительно влияет на качество жизни миллионов мужчин и женщин в Соединенных Штатах. Многие распространенные заболевания (например, ВНР, сахарный диабет, рассеянный склероз и инсульт) изменяют нормальную функцию мочевого пузыря. Значительные неблагоприятные изменения в функции мочевого пузыря также являются нормальным результатом старения. Существуют два основных клинических проявления измененной физиологии мочевого пузыря: атонический мочевой пузырь и гиперрефлекторный мочевой пузырь. Атонический мочевой пузырь или гипоактивность детрузора приводит к уменьшению способности опорожнять его содержимое из-за неэффективной сократимости гладкой мышцы детрузора (наружной гладкой мышцы стенки мочевого пузыря). При атоническом или гипоактивном состоянии пониженная сократимость гладких мышц причастна к этиологии дисфункции мочевого пузыря. Таким образом, неудивительно, что фармакологическая модуляция тонуса гладких мышц недостаточна для коррекции основной проблемы. Фактически, в преобладающем способе лечения этого состояния используют стерильную периодическую катетеризацию; причем это успешное средство предупреждения хронической инфекции мочевыводящих путей, пиелонефрита и возможной почечной недостаточности. Таким образом, лечение атонического мочевого пузыря уменьшает симптомы заболевания, но не устраняет основную причину.

С другой стороны, гиперрефлекторный, не поддающийся подавлению мочевой пузырь или мочевой пузырь, который проявляет гиперактивность детрузора, самопроизвольно сокращается во время наполнения мочевого пузыря; причем это может привести к частому мочеиспусканию, ургентности и ургентному недержанию, когда человек не может контролировать мочеиспускание. Гиперрефлекторный мочевой пузырь является более сложной проблемой для лечения. Лекарственные препараты, которые использовались для лечения этого состояния, обычно являются лишь частично эффективными и имеют серьезные побочные эффекты, которые ограничивают их прием пациентом и его энтузиазм. Принятые в настоящее время варианты лечения (например, оксibuтинин и толтерадин), как правило, являются неспецифическими и чаще всего предусматривают блокаду сигнальных путей мускариновых рецепторов и/или кальциевых каналов на миоцитах мочевого пузыря. Учитывая центральное значение этих двух сигнальных путей в клеточном функционировании многих систем организма, такие терапевтические стратегии являются не только грубыми способами модуляции тонуса гладких мышц мочевого пузыря; а скорее, благодаря самому механизму(ам) их действия, они также практически гарантированно будут характеризоваться значительными и нежелательными системными эффектами. Соответственно, существует большая потребность в улучшенных вариантах лечения дисфункции мочевого пузыря. Несмотря на многочисленные попытки разработать лекарство или средство для лечения заболеваний, вызванных измененным тонусом гладких мышц, современные средства терапии являются неадекватными, поскольку они обеспечивают ограниченную эффективность и/или значительные побочные эффекты. Таким образом, в данной области давно ощущается потребность в фармацевтическом и/или медицинском вмешательстве для борьбы с первопричиной изменения тонуса гладких мышц за счет повышения эффективности с минимальными побочными эффектами.

### **Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение предусматривает способы лечения или уменьшения выраженности признака или симптома синдрома гиперактивного мочевого пузыря или гиперактивности детрузора у субъекта-человека путем внутридетрузорного введения в по меньшей мере два или более участков стандартной дозы композиции, содержащей вектор, предусматривающий промотор и нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид канала Maxi-K. Промотором является, например, промотор, специфический для гладкой мышцы, или промежуточный ранний промотор цитомегаловируса. Стандартная доза представляет собой единичную стандартную дозу. Альтернативно, две или более стандартные дозы вводятся в разное время.

Стандартная доза составляет от приблизительно 5000 до 50000 мкг. Например, стандартная доза составляет по меньшей мере 10000 мкг. Предпочтительно стандартная доза составляет 16000 мкг или 24000 мкг.

Композицию вводят в 5, 10, 15, 20 или более участков.

Признаком или симптомом является, например, частое мочеиспускание или ургентность.

В некоторых аспектах вектор содержит элементы нуклеиновой кислоты, расположенные в следующем порядке: последовательность промежуточного раннего промотора цитомегаловируса человека, та-

кая как SEQ ID NO: 1; последовательность сайта праймирования T7, такая как SEQ ID NO: 2; последовательность открытой рамки считывания hSlo, такая как SEQ ID NO: 7; сигнальная последовательность полиаденилирования BGH, такая как SEQ ID NO: 3; последовательность, обеспечивающая устойчивость к канамицину, такая как SEQ ID NO: 5 и последовательность точки начала репликации pUC, такая как SEQ ID NO: 4. В определенных аспектах последовательность открытой рамки считывания hSlo содержит точечную мутацию в положении 1054 SEQ ID NO: 7, что приводит к замене на серин в положении 352 SEQ ID NO: 8.

Настоящее изобретение предусматривает вектор, при этом вектор содержит элементы нуклеиновой кислоты, расположенные в следующем порядке: последовательность промежуточного раннего промотора цитомегаловируса человека, такая как SEQ ID NO: 1; последовательность сайта праймирования T7, такая как SEQ ID NO: 2; последовательность открытой рамки считывания hSlo, такая как SEQ ID NO: 7; сигнальная последовательность полиаденилирования BGH, такая как SEQ ID NO: 3; последовательность, обеспечивающая устойчивость к канамицину, такая как SEQ ID NO: 5; и последовательность точки начала репликации pUC, такая как SEQ ID NO: 4. В некоторых аспектах вектора последовательность открытой рамки считывания hSlo содержит одну точечную мутацию в нуклеотидном положении 1054 SEQ ID NO: 7, и указанная точечная мутация приводит к замене на серин в положении 352 SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах вектор предусматривает плазмиду, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор или липосому. В некоторых аспектах плазида представляет собой pVAX.

Настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую множество векторов по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция составлена для инъекции в гладкую мышцу. В некоторых аспектах множество векторов объединено с 20-25% сахарозой в физиологическом растворе. В некоторых аспектах фармацевтической композиции по настоящему изобретению стандартная доза представляет собой единичную стандартную дозу. В некоторых аспектах стандартная доза составляет от приблизительно 5000 до 50000 мкг. В некоторых аспектах стандартная доза составляет по меньшей мере 10000 мкг. В некоторых аспектах стандартная доза составляет 16000 мкг или 24000 мкг. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно использовать при практическом осуществлении настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, явным образом включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры, описанные в данном документе, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Другие отличительные признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения и охватываются ими.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 A-D представлена серия из четырех столбчатых графиков, которые показывают параметры мочеиспускания после 2 недель обструкции в двух группах лечения.

На фиг. 2 A-C представлена серия из трех графиков, которые демонстрируют цистометрические показания после 2 недель обструкции в контрольной группе (фиг. 2A), группе с обработкой только вектором (pVAX) (фиг. 2B) и группе, получавшей обработку с помощью hSlo (фиг. 2C).

На фиг. 3 показаны три графика цистометрических показаний для крыс, получавших только вектор (pVAX) и 300 и 1000 мкг pVAX/hSLO.

На фиг. 4 представлен столбчатый график, который показывает среднее количество копий вектора pVAX/hSLO в тканях самок крыс после двух инъекций 1000 мкг.

На фиг. 5 представлена схема, которая показывает участки инъекции вектора pVAX/hSLO у субъектов-людей.

На фиг. 6 представлен столбчатый график, показывающий обусловленное лечением изменение среднего числа мочеиспусканий в день с течением времени у субъектов-людей. Планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего (SEM).

На фиг. 7 представлен столбчатый график, показывающий обусловленное лечением изменение среднего числа эпизодов ургентности с течением времени у субъектов-людей. Планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего (SEM).

На фиг. 8 представлена плазмидная карта pVAX/hSLO.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение предусматривает способы генной терапии для лечения физиологических дисфункций мочевого пузыря. В частности, настоящее изобретение основано на открытии того, что прямая инъекция вектора, содержащего ген, который экспрессирует канал Maxi-K человека (hMaxi-K), в гладкую мышцу стенки мочевого пузыря, значительно уменьшает выраженность симптомов гиперактив-

ного мочевого пузыря и недержания мочи у женщин. В частности, участники получали общую дозу, составляющую либо 16000 мкг, либо 24000 мкг hMaxi-K, вводимую в виде 20-30 внутримышечных инъекций в мочевой пузырь. Участников осматривали 8 раз в течение 24-недельного периода и последующего наблюдения через 18 месяцев. Средние данные из дневников, собранные за 7 дней до каждого визита, показали статистически достоверное уменьшение количества мочеиспусканий в день, а также среднее количество эпизодов urgency в день для тех участников, которые получали hMaxi-K, по сравнению с плацебо.

Канал Maxi-K (также известный как канал BK) обеспечивает путь оттока ионов калия из клетки, вызывая расслабление гладкой мышцы путем ингибирования чувствительного к напряжению канала  $Ca^{2+}$  и, таким образом, осуществляя нормализацию работы органа путем снижения патологически повышенного тонуса гладкой мышцы. Термины "канал MaxiK" и "канал BK" в данном документе используются взаимозаменяемо.

В отношении структуры каналы MaxiK состоят из альфа- и бета-субъединиц. Четыре альфа-субъединицы образуют пору канала, и эти альфа-субъединицы кодируются одним геном Slo1 (также называемым Slo, hSlo и подсемейством кальций-активируемых калиевых каналов Мальфа-1 или KCNMA1). Существует четыре бета-субъединицы, которые могут модулировать функцию канала MaxiK. Каждая бета-субъединица характеризуется конкретными тканеспецифической экспрессией и функциями модуляции, при этом субъединица бета-1 (регуляторная субъединица бета-1 кальций-активируемых калиевых каналов подсемейства M или KCNMB1) в основном экспрессируется в клетках гладких мышц.

Стратегические кластеры каналов MaxiK в непосредственной близости от рианодин-чувствительных запасов кальция нижележащего саркоплазматического ретикулума обеспечивают важный механизм локальной модуляции сигналов кальция (т. е. искр) и мембранного потенциала в разнообразных гладких мышцах, включая мочевой пузырь. Увеличение внутриклеточного уровня кальция увеличивает вероятность открытия канала MaxiK, увеличивая тем самым движение K наружу через чувствительный к кальцию канал MaxiK. Утечка K вызывает суммарное перемещение положительного заряда за пределы клетки, делая внутреннюю часть клетки более отрицательно заряженной по отношению к внешней стороне. Это обуславливает два основных эффекта. Во-первых, повышенный мембранный потенциал гарантирует, что кальциевый канал проводит больше времени в закрытом состоянии, чем в открытом. Во-вторых, поскольку кальциевый канал с большей вероятностью будет закрыт, наблюдается снижение суммарного притока  $Ca^{2+}$  в клетку и соответствующее снижение уровней свободного внутриклеточного кальция. Сниженный внутриклеточный уровень кальция способствует расслаблению гладких мышц. Следовательно, основное значение наличия большего количества каналов MaxiK в клеточной мембране состоит в том, что это должно приводить к усилению расслабления клеток гладких мышц в ответ на любой данный стимул для релаксации.

Усиление межклеточной коммуникации между миоцитами детрузора происходит как в животных моделях частичной обструкции уретры (PUO), так и у людей с гиперактивностью детрузора (DO). Что касается усиления межклеточной коммуникации, влияние повышенной передачи сигналов кальция может быть усилено по сравнению с нормальным мочевым пузырем с потенциально более низкими уровнями межклеточной связи. Эта повышенная передача сигналов кальция способствует, по крайней мере частично, "сокращениям без мочеиспускания", наблюдаемым в моделях крыс с PUO. Однако, если произошло параллельное увеличение экспрессии канала MaxiK (например, в результате сверхэкспрессии трансгена, кодирующего канал MaxiK, предусматриваемого композицией или способом по настоящему изобретению), то, предположительно, полученные в результате рекомбинантные и/или трансгенные каналы MaxiK, экспрессируемые этими трансфицированными клетками, могут "срывать" аномально повышенные сигналы кальция. Это предотвращает дальнейшее распространение через щелевые контакты и, таким образом, предотвращает достаточное усиление аномальной и повышенной передачи сигналов кальция (например, за счет рекрутирования не подвергнутых трансфицированию миоцитов) для ослабления аномальных сократительных реакций. Снижение аномальных сократительных реакций в отдельных клетках или группах клеток за счет сверхэкспрессии трансгена, кодирующего канал MaxiK, предусматриваемого композицией или способом по настоящему изобретению, устраняет или уменьшает сокращения без мочеиспускания, характерные для DO, клинического коррелята urgency. С другой стороны, поскольку участие спинальных рефлексов в реакции мочеиспускания вызывает скоординированные сокращения детрузора, значительно превышающие аномально повышенную передачу сигналов кальция, связанную с DO, сверхэкспрессия трансгена MaxiK может эффективно снижать или подавлять более слабый аномально повышенный сигнал кальция, который способствует DO (что измеряют на модели на животных как уменьшение IMP (давления между мочеиспусканиями) или SA (спонтанной активности) по сравнению с контрольными уровнями), без значительного или заметного влияния на более устойчивую реакцию сокращения при мочеиспускании.

Старение и заболевание могут приводить к изменениям в экспрессии конечного продукта гена hSlo, гена, который экспрессирует  $\alpha$ -субъединицу высокопорогового  $Ca^{2+}$ -активируемого, чувствительного к напряжению калиевого (BK $\alpha$ ) канала. Эти изменения приводят к снижению органоспецифической фи-

физиологической модификации тонуса гладкой мышцы, из которой состоит орган. Эффектом является повышенный тонус клеток гладких мышц в органах, что обуславливает такие заболевания человека, как эректильная дисфункция (ЭД) в половом члене, ургентность, частое мочеиспускание, никтурия и недержание мочи в мочевом пузыре (например, синдром гиперактивности мочевого пузыря (ОАВ)), астма в легких, раздражение кишечника в толстой кишке, глаукома в глазах и инфравезикальная обструкция в предстательной железе. Способы согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение предусматривает способ генной терапии для лечения физиологических дисфункций гладкой мышцы. В частности, способы согласно настоящему изобретению используются для лечения или уменьшения выраженности симптомов синдрома гиперактивного мочевого пузыря (ОАВ) или гиперактивности детрузора.

Синдром ОАВ характеризуется группой симптомов, которые включают без ограничения ургентность, частое мочеиспускание, никтурию и недержание мочи. ОАВ подразделяется на идиопатическую ОАВ и нейрогенную ОАВ.

Гиперактивность детрузора определяется как уродинамическое наблюдение, характеризующееся непроизвольными сокращениями детрузора во время фазы наполнения, которые могут быть спонтанными или спровоцированными. Гиперактивность детрузора подразделяется на идиопатическую гиперактивность детрузора и нейрогенную гиперактивность детрузора.

Композиции и способы согласно настоящему изобретению предусматривают доставку нуклеиновой кислоты, кодирующей hMaxi-K, в клетки субъекта-человека или нуждающегося в этом пациента. В некоторых случаях доставка нуклеиновой кислоты может называться генной терапией.

Композиция и способы согласно настоящему изобретению предусматривают любой подходящий способ доставки нуклеиновой кислоты hMaxi-K или ее мутанта. В некоторых случаях доставка нуклеиновой кислоты может осуществляться с использованием любого подходящего "вектора" (иногда также называемого средством для "доставки генов" или "переноса генов"). Вектор, средство для доставки, средство для доставки генов или средство для переноса генов может относиться к любой подходящей макромолекуле или комплексу молекул, содержащих полинуклеотид для доставки в целевую клетку. В некоторых случаях целевой клеткой может быть любая клетка, в которую доставляется нуклеиновая кислота или ген. Доставляемый полинуклеотид может содержать представляющую интерес для генной терапии кодирующую последовательность, такую как ген hSlo.

Ген hSlo вводится в гладкомышечную клетку мочевого пузыря путем прямой инъекции в мышцу детрузора.

Например, подходящие векторы могут включать без ограничения вирусные векторы, такие как аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV) и ретровирусы, липосомы, другие липидсодержащие комплексы и другие макромолекулярные комплексы, способные опосредовать доставку полинуклеотида к целевой клетке.

Альтернативно, ген hSlo переносится в клетки гладких мышц путем переноса голый ДНК с использованием вектора для экспрессии в млекопитающих. "Голая ДНК" в данном документе определяется как ДНК, содержащаяся в невирусном векторе. Последовательность ДНК может быть объединена со стерильным водным раствором, который предпочтительно является изотоничным крови реципиента. Такой раствор может быть получен путем суспендирования ДНК в воде, содержащей физиологически совместимые вещества (такие как хлорид натрия, глицин и тому подобное), поддерживая буферный pH, совместимый с физиологическими условиями, и делая раствор стерильным. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения ДНК объединяют с 20-25% раствором сахарозы в физиологическом растворе (например, фосфатно-солевым буфером) при подготовке к введению в клетку гладкой мышцы.

Как описано в данном документе, нуклеиновые кислоты могут относиться к полинуклеотидам. Нуклеиновая кислота и полинуклеотид могут использоваться взаимозаменяемо. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты могут предусматривать ДНК или РНК. В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты могут включать ДНК или РНК для экспрессии Maxi-K. В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты, представляющие собой РНК, могут включать без ограничения транскрипт представляющего интерес гена (например, Slo), интроны, нетранслируемые области, терминирующие последовательности и тому подобное. В других случаях нуклеиновые кислоты, представляющие собой ДНК, могут включать без ограничения такие последовательности, как последовательности гибридного промотора гена, последовательности сильного конститутивного промотора, представляющий интерес ген (например, Slo), нетранслируемые области, терминирующие последовательности и тому подобное. В некоторых случаях может использоваться комбинация ДНК и РНК. Как описано в настоящем изобретении, термин "экспрессионная конструкция" подразумевает включение любого типа генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту или полинуклеотид, кодирующие генные продукты, в которых часть или вся последовательность, кодирующая нуклеиновую кислоту, способна транскрибироваться. Транскрипт может быть транслирован в белок. В некоторых аспектах он может быть частично транслирован или не быть транслирован. В определенных аспектах экспрессия включает как транскрипцию гена, так и трансляцию мРНК в продукт гена. В других аспектах экспрессия включает только транскрипцию нуклеиновых кислот, кодирующих представляющие интерес гены.

Нуклеиновая кислота может быть измерена как количество нуклеиновой кислоты. Как правило, любое подходящее количество нуклеиновой кислоты может быть использовано с композициями и способами согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях количество нуклеиновой кислоты может составлять по меньшей мере приблизительно 1 пг, 10 пг, 100 пг, 1 нг, 10 нг, 100 нг, 200 пг, 300 пг, 400 пг, 500 пг, 600 пг, 700 пг, 800 пг, 900 пг, 1 мкг, 10 мкг, 100 мкг, 200 мкг, 300 мкг, 400 мкг, 500 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг, 900 мкг, 1 нг, 10 нг, 100 нг, 200 нг, 300 нг, 400 нг, 500 нг, 600 нг, 700 нг, 800 нг, 900 нг, 1 мг, 10 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1 г, 2 г, 3 г, 4 г или 5 г. В некоторых случаях количество нуклеиновой кислоты может составлять не более приблизительно 1 пг, 10 пг, 100 пг, 1 нг, 10 нг, 100 нг, 200 пг, 300 пг, 400 пг, 500 пг, 600 пг, 700 пг, 800 пг, 900 пг, 1 мкг, 10 мкг, 100 мкг, 200 мкг, 300 мкг, 400 мкг, 500 мкг, 600 мкг, 700 мкг, 800 мкг, 900 мкг, 1 нг, 10 нг, 100 нг, 200 нг, 300 нг, 400 нг, 500 нг, 600 нг, 700 нг, 800 нг, 900 нг, 1 мг, 10 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1 г, 2 г, 3 г, 4 г или 5 г.

В некоторых случаях количество нуклеиновой кислоты может составлять по меньшей мере приблизительно 5000 мкг, 7500 мкг, 10000 мкг, 12500 мкг, 15000 мкг, 16000 мкг, 17500 мкг, 20000 мкг, 22500 мкг, 24000 мкг, 25000 мкг, 30000 мкг, 35000 мкг, 40000 мкг, 45000 мкг или 50000 мкг.

В контексте настоящего документа микрограмм и мкг используют взаимозаменяемо.

Настоящее изобретение, в частности, предусматривает способ генной терапии, где белок канала *MaxiK*, участвующий в регуляции тонуса гладких мышц, модулирует расслабление гладких мышц. Эти белки будут способствовать или улучшать расслабление гладких мышц и, таким образом, снижать тонус гладких мышц. В частности, если тонус гладких мышц в мочевом пузыре снижается, емкость мочевого пузыря будет увеличиваться.

Кроме того, настоящее изобретение, в частности, предусматривает способ регулирования тонуса гладких мышц мочевого пузыря у субъекта, включающий введение в клетки гладких мышц мочевого пузыря субъекта последовательности ДНК, кодирующей белок, участвующий в регуляции тонуса гладких мышц, и обеспечении экспрессии в достаточном количестве клеток гладких мышц мочевого пузыря субъекта для усиления релаксации мочевого пузыря у субъекта. В данном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению используют для уменьшения выраженности состояния гиперрефлекторного мочевого пузыря. Гиперрефлекторный мочевой пузырь может являться следствием различных нарушений, включая нейрогенные и артериогенные дисфункции, а также другие состояния, которые вызывают неполное расслабление или повышенную сократимость гладкой мышцы мочевого пузыря. Пациент может являться животным или человеком, а предпочтительно является человеком.

Рекомбинантные векторы и плазмиды согласно настоящему изобретению также могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую подходящие регуляторные элементы, чтобы влиять на экспрессию векторной конструкции в подходящей клетке-хозяине. Используемый в данном документе термин "экспрессия" относится к способности вектора обеспечивать транскрипцию вставленной последовательности ДНК в мРНК, чтобы произошел синтез белка, кодируемого вставленной нуклеиновой кислотой. Специалистам в данной области будет понятно следующее: (1) что ряд различных энхансеров и промоторов подходит для использования в конструкциях согласно настоящему изобретению; и (2) что конструкции будут содержать необходимые стартовые, терминирующие и регуляторные последовательности для обеспечения правильной транскрипции и обработки последовательности ДНК, кодирующей белок, участвующий в регуляции тонуса гладких мышц, при введении рекомбинантной векторной конструкции в клетку-хозяина.

Невирусные векторы, предусматриваемые настоящим изобретением, для экспрессии в клетке гладкой мышцы последовательности ДНК, кодирующей белок, участвующий в регуляции тонуса гладкой мышцы, могут включать весь или часть любого из следующих векторов, известных специалистам в данной области техники:

pVax

(Thermo Fisher Scientific), pCMV $\beta$  (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pET-3d (Novagen), pProEx-1 (Life Technologies), pFastBac 1 (Life Technologies), pSFV (Life Technologies), pcDNA2 (Invitrogen), pSL301 (Invitrogen), pSE280 (Invitrogen), pSE380 (Invitrogen), pSE420 (Invitrogen), pTrcHis A,B,C (Invitrogen), pRSET A,B,C (Invitrogen), pYES2 (Invitrogen), pAC360 (Invitrogen), pVL1392 и pV1392 (Invitrogen), pCDM8 (Invitrogen), pcDNA I (Invitrogen), pcDNA I(amp) (Invitrogen), pZeoSV (Invitrogen), pRc/CMV (Invitrogen), pRc/RSV (Invitrogen), pREP4 (Invitrogen), pREP7 (Invitrogen), pREP8 (Invitrogen), pREP9 (Invitrogen), pREP10 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pEBVHis (Invitrogen) и  $\lambda$ Pop6.

Другие векторы будут очевидны для специалиста в данной области. Предпочтительно вектором является pVax.

В некоторых вариантах осуществления последовательность вектора pVax содержит последовательность:

```

1  GACTCTTCGC GATGTACGGG CCAGATATAC GCGTTGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA
61 ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
121 АСТТАСГГТА ААТГГСССГС СТГГСТГАСС ГСССААСГАС ССССГССССТ ТГАСГТСААТ
181 ААТГАСГТАТ ГТТСССАТАГ ТААСГССААТ АГГГАСТТТС САТТГАСГТС ААТГГГТГГА
241 СТАТТТАСГГ ТАААСТГССС АСТТГГСАГТ АСАТСААГТГ ТАТСАТАТГС СААГТАСГСС
301 СССТАТТГАС ГТСААТГАСГ ГТАААТГГСС СГССТГГСАТ ТАТГСССАГТ АСАТГАССТТ
361 АТГГГАСТТТ ССТАСТТГГС АГТАСАТСТА СГТАТТАГТС АТСГСТАТТА ССАТГГТГАТ
421 ГСГГТТТТГГ САГТАСАТСА АТГГГСГТГГ АТАСГГТТТ ГАСТСАСГГГ ГАТТТССААГ
481 ТСТССАССС АТТГАСГТСА АТГГГАГТТТ ГТТТТГГСАС СААААТСААС ГГГАСТТТСС
541 ААААТГТСГТ ААСААСТССС ССССАТГАС ГСАААТГГГС ГГТАГГСГТГ ТАСГГТГГГА
601 ГГТСТАТАТА АССААГСТС ТСТГГСТААС ТАГАГААССС АСТГСТТАСТ АСГТТАСГА
661 ААТТААТАСГ АСТСАСТАТА ГГГАГАСССА АСГТГГСТАГ СГТТТАААСТ ТААГСТТГГТ
721 АССАГСТСГ ГАТССАСТАГ ТССАГТГТГГ ТГГААТТСТГ САГАТАТССА ГСАСАГТГГС
781 ГСГГСТСГА ГТСТАГАГГГ СССГТТТААА ССССГТГАС АССТСГАСТ ГТГССТТСТА
841 ГТТГССАГСС АТСТГТТГТТ ТГССССТССС ССГТГССТТ СТТГАСССТГ ГААГТГССА
901 СТССАСТГТ ССТТТСТТАА ТАААТГАГГ АААТТГСАТС ГСАТТГТСТГ АГТАГГТГТС
961 АТТСТАТТСТ ГГГГГТГГГ ГТГГГСГАГ АСАГСААГГГ ГГАГГАТТГГ ГААГАСААТА
1021 ГСАГСАТГС ТГГГГАТГС ГТГГГСТСТА ТГГСТТСТА ТГГГСГГТТ ТАТГГАСАГС
1081 ААГСААССГ ААТТГССАГ СТГГГГСГСС СТСТГГТААГ ГТТГГГААГС ССТГСАААГТ
1141 АААСТГГАТГ СТТТСТСГС ГССАААГГАТ СТГАТГГСГС АГГГГАТСАА ГСТСТГАТСА
1201 АГАГАСАГГА ТГАГГАТСТТ ТТСГСАТГАТ ТГААСААГАТ ГГАТТГСАСГ САГТТСТС
1261 ГСГГСТТГГ ГТГГАГАГГС ТАТТСГГСТА ТГАСТГГСА СААСАГАСАА ТСГГСТГСТС
1321 ТГАТГССГСС ГТГТТССГГС ТГТСАСГСА ГГГГСГССС ГТТСТТТТТГ ТСАААГССГА
1381 ССТГТССГГТ ГСССТГААТГ ААСТГСААГА СГААГСАСГ СГГСТАТСТГ ГГСТГГССА
1441 ГАСГГСГТТ ССТТГСГСАГ СТГТГСТСА СГТТГТСАСТ ГААГСГГГАА ГГГАСТГГСТ
1501 ГСТАТТГГГС ГААГТГССГ ГСГААГГАТ ССТГТСАТСТ САСТТГСТ СГСССГААА
1561 АГТАТССАТ АТГГСТГАТ СААТГСГГС ГСТГСАТАСГ СТТГАТСССГ СТАССТГССС
1621 АТТССАССА СААГСАААС АТСГСАТСА ГСГАССАСТ АСТСГГАТГ ААГССГТСТ
1681 ТГТСГАТСАГ АТАГАТТГ АСГААГАСА ТСААГГГСТС ГСГССАГСС ААСТГТТСГС
1741 САГГСТСААГ ГСГАСАТГС ССГАСГГСА ГГАТСТСГТС ГТГАСССАТГ ГСГАТГССТГ
1801 СТТГССГААТ АТСАТГГТГГ ААААТГГССС СТТТТСТГГА ТТСАТСГАСТ ГТГГССГГСТ
1861 ГГГТГТГГСГ АСГСГТАТС АГГАСАТАС ГТТГГСТАСС СГТГАТАТТГ СТГААГАСТ
1921 ТГГСГГСГАА ТГГГСТГАСС ГСТТСТСГТ ГСТТТАСГГТ АТСГСССГСТС ССГАТТСГА
1981 ГСГСАТСГСС ТТСТАТСГСС ТТСТТГАСГА ГТТСТТСТГА АТТАТТААСГ СТТАСААТТТ
2041 ССТГАТСГГ ТАТТТТСТС ТТАСГСАТСТ ГТГСГГТАТТ ТСАСАССГСА ТАСАГГТГГС
2101 АСТТТТСГГГ ГАААТГТГСГ СГГААССССТ АТТТГТТТАТ ТТТТСТАААТ АСАТТСАААТ
2161 АТГАТСССГ ТСАТГАГАСА АТААСССТГА ТАААТГСТТС ААТААТАСГА СГТГСТАААА
2221 СТТСАТТТТТ ААТТТААААГ ГАТСТАГГТГ ААГАТССТТТ ТТГАТААТСТ САТГАССААА
2281 АТСССТТААС ГТГАГТТТТТ ГТТССАСТГА ССГТСАААА ССГТАГАААА ГАТСАААГГА
2341 ТСТТСТТГАГ АТСТТТТТТ ТСТГСГСГА АТСТГСТГСТ ТГСАААСААА ААААССАССГ
2401 СТАССАГСГГ ТГГТТТГТТТ ГССГГАТСАА ГАГСТАССАА СТСТТТТТТС ГААГГТААСТ
2461 ГГСТТСАСА АГАСГСАГАТ АССАААТАСТ ГТСТТСТАГ ТГАТГССГТА ГТТАГГССАС
2521 САСТТСААГА АСТСТГАТГ АСГССТАСА ТАССТСГСТС ТГСТААТСТС ГТТАССАГТГ
2581 ГСТГСТГССА ГТГГСГАТАА ГТСГТГСТТ АСГГГТТГГ АСТСАААСГ АТАГТТАССГ
2641 ГАТАААГСГС АСГГТСГГГ АТГААСГГГ ГГТТСГТГСА САСАСССАГ СТТГГАСГСА
2701 АСГАССТАСА ССГААСТГА АТАССТАСА СГТГАГСТАТ ГАГАААГСГС САСГСТТССС
2761 ГААГГГАГАА АГГСГГАСАГ ГТАТССГГТА АСГГСГААГГ ТСГГААСААГ АГАСГСАСГ
2821 АГГГАСГТТС САГГГГГААА СССТГГТАТ СТТТАТАГТС СТГТСГГГТТ ТСГССАСТС
2881 ТГАСТТГАСГ ГТСГАТТТТТ ГТГАТГСТСГ ТСААГГГГГС ГГАССТАТГ ГАААААСГСС
2941 АСГААСГСГ ССТТТТТАСГ ГТТСТТГГС ТТТТГСТГС СТТТТГСТСА САТГТТСТТ

```

(SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления последовательность pVAX содержит последовательность с по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления последовательность pVAX предусматривает замену G на A в положении 2 SEQ ID NO: 10, дополнительный G в положении 5 SEQ ID NO: 10, замену T на C в положении 1158 SEQ ID NO: 10, отсутствие A в положении 2092 SEQ ID NO: 10, замену T на C в положении 2493 SEQ ID NO: 10 или их комбинацию. Промоторы, подходящие для настоящего изобретения, включают без ограничения конститутивные промоторы, тканеспецифичные промоторы и индуцибельные промоторы. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для гладких мышц. В других вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для мышечной клетки. Предпочтительно промотор не является специфичным для экспрессии в уротелии промотором.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессия последовательности ДНК, кодирующей белок, участвующий в регуляции тонуса гладких мышц, контролируется и зависит от конкретного вектора, в который была введена последовательность ДНК. Некоторые эукариотические векторы были сконструированы таким образом, чтобы они могли экспрессировать встроенные нуклеиновые кислоты с достижением высоких уровней в клетке-хозяине. Такие векторы используют один из ряда мощных промоторов для обеспечения высокого уровня экспрессии. В эукариотических векторах используются промоторно-энхансерные последовательности вирусных генов, особенно генов опухолевых вирусов. Данный конкретный вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает регуляцию экспрессии последовательности ДНК, кодирующей белок, путем использования индуцибельных промоторов. Неограничивающие примеры индуцибельных промоторов включают металлотиониновые промоторы и промоторы вируса опухоли молочной железы мыши. В зависимости от вектора экспрессия последовательности ДНК в клетке гладкой мышцы будет индуцирована добавлением определенного соединения в определенный момент цикла роста клетки. Другие примеры промоторов и энхансеров, эффективных для использования в рекомбинантных векторах согласно настоящему изобретению, включают без ограничения CMV (цитомегаловирус), SV40 (вирус обезьян 40), HSV (вирус простого герпеса), EBV (вирус Эпштейна-Барра), ретровирус, аденовирусные промоторы и энхансеры и специфические для гладких мышц промоторы и энхансеры. Примером специфического для гладких мышц промотора является SM22 $\alpha$ . Иллюстративные промоторы, специфические для гладкой мышцы, описаны в патенте США № 7169764, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. В предпочтительных вариантах осуществления промотор представляет собой последовательность промотора SM22 $\alpha$  и может включать без ограничения такие последовательности, как

```

gaattcagga cgtaatcagt ggctggaaag caagagctct agaggagctc
tgacccttcc ttcagatgcc acaaggaggt gctggagttc tatgcaccaa
cagccaggct ggctgtagtg gattgagcgt ctgaggctgc acctctctgg
gttctgggtg agactgacc tgcctgaggg ttctctcctt cctctctctt
ccctctccct ctccctctct ctgtttcctg aggtttccag gattggggat
gacaccacta aagccttacc ttttaagaag ttgcattcag tgagtgtgtg
cagatagggg cagaggagag ctggttctgt ctccactgtg tttggctctg
tcagaccatc aggtgtgata gcagttgtct ttaaccctaa ccctgagcct
tcccttccca agaccactga agctaggtgc aagataagtg gggacccttt
aggatctttc acgataagga ctattttgaa gggagggagg gtgacactgt
ttaccctagt gtctccagcc ttgccaggcc ttaaaccatcc gccattgtc
aagggggccag ggttgacttg ctgctaaaca aggcactccc tagagaagca
gcataccata cctgtgggca ggatgaccca tgttctgcca cgcacttggt
aggccacttt gaacctcaat tttctcaact gttaaatggg gtggtaactg
ataaagggga acgtgaaagg aaggcgtttg catagtgcct ggttgtgcag
gtcaagacta gttcccacca actcgaatctt aaagccttgc aagaaggtgg
ccttgacagg tctttgtctg ggccaaactc tagaatgcct ccccttttct
agagcagacc caagtccggg taacaaggaa gggtttcagg gtccctgcca
ttcccggccg ccctcagcac cgccccgccc cgacccccgc agcatctcca
cagcttatta tagcttaaac cctgcagcca actcctttct gggactcaga
agacatagca ggtactgaac gtctcacctg ctgaggtggt cctagtcctc
accgctctta gcccgctaga agccttgga ctatctcata ccaggctgca
cttgtttgtc ttctcattga taaaaggttt aagcatgcag agaatgtctc
cggtgcccc cgacagactg ctccaacttg gtgtctttcc ccaaataatg
agcctgtgtg gagtgagtgg ggcgccccgg ggtggtgagc caagcagact
tccatgggca gggaggggcg ccagcggacg gcagaggggt gacatcactg
cctaggcggc ctttaaacc ctcaccagc cggcgccccca gcccgctctgc
cccagcccag acaccgaagc tactctcctt ccagtccaca aacgaccaag
ccttgtaagt gcaagtcac (SEQ ID NO: 9).

```

В предпочтительных вариантах осуществления промотор представляет собой последовательность промежуточного раннего промотора цитомегаловируса человека и может включать без ограничения такие последовательности, как

```
CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACG
TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG
AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC
TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGC
AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGA
CGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCC
GCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT (SEQ
ID NO: 1).
```

В некоторых аспектах может быть включен сайт праймирования T7, как например без ограничения такие последовательности, как TAATACGACTCACTATAGGG под SEQ ID NO: 2.

В некоторых аспектах рекомбинантный вирус и/или плазида, используемые для экспрессии последовательности ДНК или белка согласно настоящему изобретению, содержит последовательность поли А (полиаденилирования), такую как последовательности, представленные в данном документе (например, последовательность поли А BGN). Как правило, любая подходящая последовательность поли А может использоваться для желаемой экспрессии трансгена. Например, в некоторых случаях настоящее изобретение предусматривает последовательности, содержащую последовательность поли А BGN или часть последовательности поли А BGN. В некоторых случаях настоящее раскрытие предусматривает последовательности поли А, содержащие комбинацию одной или нескольких последовательностей или элементов последовательности поли А. В некоторых случаях последовательность поли А не используется. В некоторых случаях одна или несколько последовательностей поли А могут определяться как нетранслируемые области (UTR), 3'-UTR или терминирующие последовательности.

Длина последовательности поли А может предусматривать длину, составляющую 1-10 п.о., 10-20 п.о., 20-50 п.о., 50-100 п.о., 100-500 п.о., 500 п.о. -1 т.п.н., 1 т.п.н. - 2 т.п.н., 2 т.п.н. - 3 т.п.н., 3 т.п.н. - 4 т.п.н., 4 т.п.н. - 5 т.п.н., 5 т.п.н. -6 т.п.н., 6 т.п.н. - 7 т.п.н., 7 т.п.н. - 8 т.п.н., 8 т.п.н. - 9 т.п.н. и 9 т.п.н. - 10 т.п.н. Длина последовательности поли А может предусматривать длину, составляющую по меньшей мере 1 п.о., 2 п.о., 3 п.о., 4 п.о., 5 п.о., 6 п.о., 7 п.о., 8 п.о., 9 п.о., 10 п.о., 20 п.о., 30 п.о., 40 п.о., 50 п.о., 60 п.о., 70 п.о., 80 п.о., 90 п.о., 100 п.о., 200 п.о., 300 п.о., 400 п.о., 500 п.о., 600 п.о., 700 п.о., 800 п.о., 900 п.о., 1 т.п.н., 2 т.п.н., 3 т.п.н., 4 т.п.н., 5 т.п.н., 6 т.п.н., 7 т.п.н., 8 т.п.н., 9 т.п.н. и 10 т.п.н. Длина последовательности поли А может предусматривать длину, составляющую не более 1 п.о., 2 п.о., 3 п.о., 4 п.о., 5 п.о., 6 п.о., 7 п.о., 8 п.о., 9 п.о., 10 п.о., 20 п.о., 30 п.о., 40 п.о., 50 п.о., 60 п.о., 70 п.о., 80 п.о., 90 п.о., 100 п.о., 200 п.о., 300 п.о., 400 п.о., 500 п.о., 600 п.о., 700 п.о., 800 п.о., 900 п.о., 1 т.п.н., 2 т.п.н., 3 т.п.н., 4 т.п.н., 5 т.п.н., 6 т.п.н., 7 т.п.н., 8 т.п.н., 9 т.п.н. и 10 т.п.н.

В некоторых случаях поли А BGN может включать без ограничения такие последовательности, как

```
agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctggtggt tgccccctccc
ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cttttcctaa
taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct
gggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata
gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta gtgggctct (SEQ ID NO: 3).
```

В некоторых случаях последовательности поли А могут быть оптимизированы в отношении различных параметров, влияющих на экспрессию белка, включая без ограничения время полужизни мРНК трансгена в клетке, стабильность мРНК трансгена или регуляцию транскрипции. Например, последовательности поли А могут быть изменены для увеличения транскрипции мРНК трансгена, что может привести к увеличению экспрессии белка. В некоторых случаях последовательности поли А могут быть изменены для уменьшения времени полужизни транскрипта мРНК трансгена, что может привести к снижению экспрессии белка.

В некоторых аспектах вектор содержит последовательность, представляющую собой последовательность, кодирующую точку начала репликации, как например таковые предусмотренные в данном документе. Последовательности точки начала репликации, как правило, обеспечивает последовательность, полезную для воспроизводства плазмиды/вектора.

В некоторых случаях, последовательность точки начала репликации pUC может включать без ограничения такие последовательности, как

```

ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta
atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt
gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca
gagcgcagat accaaatact gtccttctag tntagccgta gttaggccac
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaactct
gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg
actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag
atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa
aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg
agggagcttc cagggggaaa cgcctggat ctttatagtc ctgtcgggtt
tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctgggc
ttttgctggc cttttgctca catgttctt (SEQ ID NO: 4).

```

Вектор также может содержать селективируемый маркер. Селективируемые маркеры могут быть положительными, отрицательными или бифункциональными. Положительные селективируемые маркеры позволяют осуществлять отбор клеток, несущих маркер, тогда как отрицательные селективируемые маркеры позволяют избирательно исключать клетки, несущие маркер. Описано множество таких маркерных генов, включая бифункциональные (то есть положительные/отрицательные) маркеры (см., например, Lupton, S., WO 92/08796, опубликованный 29 мая 1992 г.; и Lupton, S., WO 94/28143, опубликованный 8 декабря 1994 г.). Примеры отрицательных селективируемых маркеров могут предусматривать включение генов устойчивости к антибиотикам, таким как ампициллин или канамицин. Такие маркерные гены могут обеспечить дополнительную меру контроля, которая может обладать преимуществом в контексте генной терапии. Большое разнообразие таких векторов известно в данной области и, как правило, доступно.

В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая устойчивость к канамицину, может включать без ограничения такие последовательности, как

```

ttcgcgatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg
gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc
tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgcga ggggcgcccg gttctttttg
tcaagaccga cctgtccggg gccctgaatg aactgcaaga cgaggcagcg
cggctatcgt ggctggccac gacgggctt ccttgcgcag ctgtgctcga
cgttgctact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg
ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc
atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc
attcgaccac caagcgaaac atcgcatacg gcgagcacgt actcggatgg
aagccggctt tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc
gcccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc ccgacggcga
ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg
aaaatggccg cttttctgga ttcactgact gtggccggct ggggtgtggcg
gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct
tggcggcgaa tgggctgacc gcttctctgt gctttacggg atcgccgctc
ccgattegca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga
(SEQ ID NO: 5).

```

Рекомбинантный вектор/плазмида содержит полинуклеотид, кодирующий белок Мах1-К человека, мутантный белок Мах1-К или его функциональный фрагмент. Иллюстративная нуклеиновая кислота, кодирующая белок Мах1-К, подходящий для использования в настоящем изобретении, включает последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 6. hSlo





361 TCGGGGGCAAGACGAAGGAGGCCAGAAGATTAACAATGGCTCAAGCCAGGCGGATGGC 420  
 121 C G G K T K E A Q K I N N G S S Q A D G

421 ACTCTCAAACCAGTGGATGAAAAAGAGGAGGCAGTGGCCGCCGAGGTGGCTGGATGACC 480  
 141 T L K P V D E K E E A V A A E V G W M T

481 TCCGTGAAGGACTGGGCGGGGTGATGATATCCGCCAGACACTGACTGGCAGAGTCTCG 540  
 161 S V K D W A G V M I S A Q T L T G R V L

541 GTTGTCTTAGTCTTTGCTCTCAGCATCGGTGCACTTGTAAATACTTCATAGATTCATCA 600  
 181 V V L V F A L S I G A L V I Y F I D S S

601 AACCCAATAGAATCCTGCCAGAATTTCTACAAAGATTTACATTACAGATCGACATGGCT 660  
 201 N P I E S C Q N F Y K D F T L Q I D M A

661 TTCAACGTGTTCTTCCTTCTACTTCGGCTTGGCGTTTATTGCAGCCAACGATAAATTG 720  
 221 F N V F F L L Y F G L R F I A A N D K L

721 TGGTCTGGCTGGAAGTGAAGTCTGTAGTGGATTTCTTCACGGTGCCCCCGTGTTTGTG 780  
 241 W F W L E V N S V V D F F T V P P V F V

781 TCTGTGTAAGTAAACAGAAGTTGGCTTGGTTTGGAGATTTTAAAGAGCTCTGAGACTGATA 840  
 261 S V Y L N R S W L G L R F L R A L R L I

841 CAGTTTTCAGAAATTTTGCAGTTTCTGAATATTCTTAAACAAGTAATTCATCAAGCTG 900  
 281 Q F S E I L Q F L N I L K T S N S I K L

901 GTGAATCTGCTCTCCATATTTATCAGCACGTGGCTGACTGCAGCCGGGTTTCATCCATTTG 960  
 301 V N L L S I F I S T W L T A A G F I H L

961 GTGGAGAATTCAGGGGACCCATGGGAAAATTTCCAAAACAACCAGGCTCTCACCTACTGG 1020  
 321 V E N S G D P W E N F Q N N Q A L T Y W

1021 GAATGTGTCTATTTACTCATGGTCACAATGTCCACCGTTGGTTATGGGGATGTTTATGCA 1080  
 341 E C V Y L L M V T M S V G Y G D V Y A  
 ATGGTCACAATGTCC CCGTTGGTTATGGGGAT (SEQ ID NO:11)

1081 AAAACCACACTTGGGCGCCTCTTCATGGTCTTCTTCATCCTCGGGGACTGGCCATGTTT 1140  
 361 K T T L G R L F M V F F I L G G L A M F

1141 GCCAGCTACGTCCCTGAAATCATAGAGTTAATAGGAAACCGCAAGAAATACGGGGGCTCC 1200  
 381 A S Y V P E I I E L I G N R K K Y G G S

1201 TATAGTGGGTTAGTGGAAAGAACACATTTGGTCTGCGGACACATCACTCTGGAGAGT 1260  
 401 Y S A V S G R K H I V V C G H I T L E S

1261 GTTCCAACCTCCTGAAGGACTTTCTGCACAAGGACCGGGATGACGTCAATGTGGAGATC 1320  
 421 V S N F L K D F L H K D R D D V N V E I

1321 GTTTTTCTTACAACATCTCCCCAACCTGGAGCTTGAAGCTCTGTTCAAACGACATTTT 1380  
 441 V F L H N I S P N L E L E A L F K R H F

1381 ACTCAGGTGGAATTTTATCAGGGTTCCGTCCTCAATCCACATGATCTTGCAAGAGTCAAG 1440  
 461 T Q V E F Y Q G S V L N P H D L A R V K

1441 ATAGAGTCAGCAGATGCATGCCTGATCCTTGCCAACAAGTACTGCGCTGACCCGGATGCG 1500

481 I E S A D A C L I L A N K Y A D P D A  
  
 1501 GAGGATGCCTCGAATATCATGAGAGTAATCTCCATAAAGAACTACCATCCGAAGATAAGA 1560  
 501 E D A S N I M R V I S I K N Y H P K I R  
  
 1561 ATCATCACTCAAATGCTGCAGTATCACAACAAGGCCCATCTGCTAAACATCCCGAGCTGG 1620  
 521 I I T Q M L Q Y H N K A H L L N I P S W  
  
 1621 AATTGAAAAGAAGGTGATGACGCAATCTGCCTCGCAGAGTTGAAGTTGGGCTTCATAGCC 1680  
 541 N W K E G D D A I C L A E L K L G F I A  
  
 1681 CAGAGCTGCCTGGCTCAAGGCCTCTCCACCATGCTTGCCAACCTCTTCTCCATGAGGTCA 1740  
 561 Q S C L A Q G L S T M L A N L F S M R S  
  
 1741 TTCATAAAGATTGAGGAAGACACATGGCAGAAATACTACTTGAAGGAGTCTCAAATGAA 1800  
 581 F I K I E E D T W Q K Y Y L E G V S N E  
  
 1801 ATGTACACAGAATATCTCTCCAGTGCCTTCGTGGGTCTGTCCTTCCCTACTGTTTGTGAG 1860  
 601 Y T E Y L S S A F V G L S F P T V C E  
  
 1861 CTGTGTTTTGTGAAGCTCAAGCTCCTAATGATAGCCATTGAGTACAAGTCTGCCAACCGA 1920  
 621 L C F V K L K L L M I A I E Y K S A N R  
  
 1921 GAGAGCCGTATATTAATTAATCCTGGAAACCATCTTAAGATCCAAGAAGGTACTTTAGGA 1980  
 641 E S R I L I N P G N H L K I Q E G T L G  
  
 1981 TTTTTTCATCGCAAGTGATGCCAAAGAAGTTAAAAGGGCATTTTTTTTACTGCAAGGCCTGT 2040  
 661 F F I A S D A K E V K R A F F Y C K A  
  
 2041 CATGATGACATCACAGATCCCAAAAGAATAAAAAAATGTGGCTGCAAACGGCTTGAAGAT 2100  
 681 H D D I T D P K R I K K C G C K R L E D  
  
 2101 GAGCAGCCGTCAACACTATCACCAAAAAAAGCAACGGAATGGAGGCATGCGGAACTCA 2160  
 701 E Q P S T L S P K K K Q R N G G M R N S  
  
 2161 CCAAACACCTCGCCTAAGCTGATGAGGCATGACCCCTTGTTAATTCCTGGCAATGATCAG 2220  
 721 P N T S P K L M R H D P L L I P G N D Q  
  
 2221 ATTGACAACATGGACTCCAATGTGAAGAAGTACGACTCTACTGGGATGTTTCACTGGTGT 2280  
 741 I D N M D S N V K K Y D S T G M F H W C  
  
 2281 GCACCCAAGGAGATAGAGAAAGTCATCCTGACTCGAAGTGAAGCTGCCATGACCGTCTCTG 2340  
 761 A P K E I E K V I L T R S E A A T V L  
  
 2341 AGTGGCCATGTCGTGGTCTGCATCTTTGGCGACGTCAGCTCAGCCCTGATCGGCCTCCGG 2400  
 781 S G H V V V C I F G D V S S A L I G L R  
  
 2401 AACCTGGTGATGCCGCTCCGTGCCAGCAACTTTCATTACCATGAGCTCAAGCACATTGTG 2460  
 801 N L V P L R A S N F H Y H E L K H I V  
  
 2461 TTTGTGGGCTCTATTGAGTACCTCAAGCGGGAATGGGAGACGCTTCATAACTCCCCAAA 2520  
 821 F V G S I E Y L K R E W E T L H N F P K

2521 GTGTCCATATTGCCTGGTACGCCATTAAGTCGGGCTGATTTAAGGGCTGTCAACATCAAC 2580  
**841 V S I L P G T P L S R A D L R A V N I N**

2581 CTCTGTGACATGTGCGTTATCCTGTGAGCCAATCAGAATAATATTGATGATACTTCGCTG 2640  
**861 L C D M C V I L S A N Q N N I D D T S L**

2641 CAGGACAAGGAATGCATCTTGGCGTCACTCAACATCAAATCTATGCAGTTTGATGACAGC 2700  
**881 Q D K E C I L A S L N I K S M Q F D D S**

2701 ATCGGAGTCTTGCAGGCTAATTCCTCCCAAGGGTTCACACCTCCAGGAATGGATAGATCCTCT 2760  
**901 I G V L Q A N S Q G F T P P G M D R S S**

2761 CCAGATAACAGCCCAGTGCACGGGATGTTACGTCAACCATCCATCACAACCTGGGGTCAAC 2820  
**921 P D N S P V H G M L R Q P S I T T G V N**

2821 ATCCCCATCATCACTGAACTAGTGAACGATACTAATGTTTCAGTTTTTGGACCAAGACGAT 2880  
**941 I P I I T E L V N D T N V Q F L D Q D D**

2881 GATGATGACCCTGATACAGAACTGTACCTCACGCAGCCCTTTGCCTGTGGGACAGCATT 2940  
**961 D D D P D T E L Y L T Q P F A G T A F**

2941 GCCGTGAGTGTCTTGGACTCACTCATGAGCGGACGTAATGACAATATCCTCACC 3000  
**981 A V S V L D S L M S A T Y F N D N I L T**

3001 CTGATACGGACCCTGGTGACCGGAGGAGCCACGCCGGAGCTGGAGGCTCTGATTGCTGAG 3060  
**1001 L I R T L V T G G A T P E L E A L I A E**

3061 GAAAACGCCCTTAGAGGTGGCTACAGCACCCCGCAGACACTGGCCAATAGGGACCGCTGC 3120  
**1021 E N A L R G G Y S T P Q T L A N R D R C**

3121 CGCGTGGCCAGTTAGCTCTGCTCGATGGCCATTTGCGGACTTAGGGGATGGTGGTTGT 3180  
**1041 R V A Q L A L L D G P F A D L G D G G C**

3181 TATGGTGATCTGTTCTGCAAAGCTCTGAAAACATATAATATGCTTTGTTTTGGAATTTAC 3240  
**1061 Y G D L F C K A L K T Y N M L C F G I Y**

3241 CGGCTGAGAGATGCTCACCTCAGCACCCCGAGTCAAGTGCACAAAGAGGTATGTCATCACC 3300  
**1081 R L R D A H L S T P S Q C T K R Y V I T**

3301 AACCCGCCCTATGAGTTTGAGCTCGTGCCGACGACCTGATCTTCTGCTTAATGCAGTTT 3360  
**1101 N P P Y E F E L V P T D L I F C L M Q F**

3361 GACCACAATGCCGGCCAGTCCCAGGCGCCAGCTGTCCCATTCCCTCCCACTCGTCGAGTCC 3420  
**1121 D H N A G Q S R A S L S H S S H S S Q S**

3421 TCCAGCAAGAAGAGCTCCTCTGTTCACTCCATCCCATCCACAGCAAACCGACAGAACCGG 3480  
**1141 S S K K S S S V H S I P S T A N R Q N R**

3481 CCCAAGTCCAGGGAGTCCCAGGACAAACAGAAGTACGTGCAGGAAGAGCGGCTT 3538 (SEQ ID NO:  
 7)  
**1161 P K S R E S R D K Q K Y V Q E E R L (SEQ ID NO: 8)**

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает клетку гладкой мышцы, которая экспрессирует последовательность экзогенной ДНК, кодирующую белок, участвующий в регуляции тонуса гладких мышц. Используемый в данном документе термин "экзогенная" означает любую ДНК, которая вводится в организм или клетку. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность ДНК кодирует hSlo.

Фармацевтические композиции.

Фармацевтическая композиция представляет собой состав, содержащий один или несколько активных ингредиентов, а также одно или несколько вспомогательных веществ, носителей, стабилизаторов или объемобразующих средств, который подходит для введения пациенту-человеку для достижения желаемого диагностического результата или терапевтического или профилактического эффекта. Для стабильности при хранении и удобства обращения фармацевтическая композиция может быть составлена в виде лиофилизированного (то есть высушенного путем замораживания) или высушенного в вакууме порошка, который может быть разведен в солевом растворе или воде перед введением пациенту. Альтерна-

тивно, фармацевтическая композиция может быть составлена в виде водного раствора. Фармацевтическая композиция может содержать белковый активный ингредиент. Различные вспомогательные вещества, такие как альбумин и желатин, использовались с разной степенью успеха, чтобы попытаться стабилизировать белковый активный ингредиент, присутствующий в фармацевтической композиции. Кроме того, криопротекторы, такие как спирты, используются для уменьшения денатурации белка в условиях замораживания при лиофилизации. Фармацевтические композиции, подходящие для внутреннего применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить через шприц. Она должна быть стабильной в условиях получения и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ, таких как полисорбаты (Tween.TM.), додецилсульфат натрия (лаурилсульфат натрия), лауридиметиламиноксид, цетилтриметиламмонийбромид (СТАВ), полиэтоксифирированные спирты, полиоксиэтиленсорбитан, октоксифол (Triton X100.TM.), N,N-диметилдодециламин-N-оксид, гексадецилтриметиламмония бромид (НТАВ), простой лауриловый эфир полиоксила 10, Brij 721.TM, соли желчных кислот (дезоксихолат натрия, холат натрия), плюроновые кислоты (F-68, F-127), полиоксил касторового масла (Cremophor.TM.), этоксилат нонилфенола (Tergitol.TM), циклодекстрины и этилбензетония хлорид (Hyamine.TM.). Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобных. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как манит, сорбит, хлорид натрия. Длительная абсорбция композиций для внутреннего применения может быть достигнута путем включения в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы могут быть получены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций способами получения являются вакуумная сушка и сушка путем замораживания, которые обеспечивают получение порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из их предварительно стерильно отфильтрованного раствора. Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями для введения.

Некоторые композиции согласно настоящему изобретению также включают соединения-носители в состав. Используемый здесь термин "соединение-носитель" или "носитель" может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, которая является инертной (то есть сама по себе не обладает биологической активностью), но распознается как нуклеиновая кислота процессами, происходящими *in vivo*, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или способствования ее удалению из кровообращения. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, как правило, с избытком последнего вещества может привести к значительному снижению содержания нуклеиновой кислоты, обнаруживаемой в печени, почках или других резервуарах вне кровообращения, предположительно из-за конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, обнаружение частично модифицированного фосфоротиоата олигонуклеотида в ткани печени может быть снижено при осуществлении его введения совместно с полиинозиновой кислотой, декстрансульфатом, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'-изотиоциано-стильбен-2,2'-дисульфоновой кислотой (Miyao et al., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183). Вектор может быть включен в фармацевтические композиции для введения пациентам, представляющим собой млекопитающих, в частности людей. Вектор или вирионы могут быть составлены с нетоксичными инертными фармацевтически приемлемыми водными носителями, предпочтительно при pH в диапазоне от 3 до 8, более предпочтительно в диапазоне от 6 до 8, наиболее предпочтительно в диапазоне от 6,8 до 7,2. Такие стерильные композиции будут содержать вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтическую молекулу, растворенный в водном буфере, характеризующимся приемлемым pH при разведении.

В некоторых аспектах фармацевтические композиции, предусмотренные в данном документе, содержат терапевтически эффективное количество вектора в смеси с фармацевтически приемлемым носи-

телем и/или вспомогательным веществом, например соевым раствором, фосфатно-соевым буфером, фосфатом и аминокислотами, полимерами, полиолами, сахаром, буферами, консервантами и другими белками. Иллюстративными аминокислотами, полимерами и сахарами и т. п. являются соединения октилфеноксиполиэтокситанола, соединения моностеарата полиэтиленгликоля, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, сахароза, фруктоза, декстроза, мальтоза, глюкоза, маннит, декстран, сорбит, инозитол, галактитол, ксилит, лактоза, трегалоза, бычий или человеческий сывороточный альбумин, цитрат, ацетат, растворы Рингера и Хэнка, цистеин, аргинин, карнитин, аланин, глицин, лизин, валин, лейцин, поливинилпирролидон, полиэтилен и гликоль.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, содержит буфер, такой как фосфатно-соевой буфер (PBS) или натрий-фосфатный/натрий-сульфатный буфер, трис-буфер, глициновый буфер, стерильную воду и другие буферы, известные специалисту, такие как описанные в Good et al. (1966) *Biochemistry* 5:467. Предпочтительная фармацевтическая композиция содержит фосфат натрия, хлорид натрия и сахарозу.

В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, содержит вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит, сахароза или декстран, в количестве приблизительно 1-30 процентов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 процентов (об./об.). Предпочтительно сахароза составляет приблизительно 10-30% (об./об.), наиболее предпочтительно сахароза составляет приблизительно 20% (об./об.).

Перед введением фармацевтическая композиция не содержит компонентов, используемых в ходе получения, например, компонентов культуры, белка клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина, плазмидной ДНК и по сути не содержит загрязнений микоплазмами, эндотоксинами и микроорганизмами. Предпочтительно фармацевтическая композиция характеризуется менее 10, 5, 3, 2 или 1 КОЕ/мазок. Наиболее предпочтительно композиция характеризуется 0 КОЕ/мазок. Уровень эндотоксина в фармацевтической композиции составляет менее 20 ЕЭ/мл, менее 10 ЕЭ/мл или менее 5 ЕЭ/мл.

Наборы.

Композиции и реагенты, полезные для настоящего изобретения, могут быть упакованы в наборы для облегчения применения настоящего изобретения. В некоторых аспектах способ по настоящему изобретению предусматривает набор, содержащий рекомбинантную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению. В некоторых аспектах способ по настоящему изобретению предусматривает набор, содержащий рекомбинантный вирус по настоящему изобретению. Инструкции могут быть в любой желаемой форме, включая без ограничения напечатанные на вкладыше набора, напечатанные на одном или нескольких контейнерах, а также хранимые в электронном виде инструкции, предоставленные на электронном носителе данных, таком как машиночитаемый носитель данных. Также необязательно включен пакет программного обеспечения на машиночитаемом носителе данных, который позволяет пользователю интегрировать информацию и рассчитывать контрольную дозу.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает набор, содержащий фармацевтические композиции, предусмотренные в данном документе. В еще одном аспекте изобретение предусматривает наборы для лечения заболеваний. В одном аспекте набор содержит: (а) рекомбинантный вирус, предусмотренный в данном документе, и (б) инструкции по введению в клетки или индивидууму терапевтически эффективного количества рекомбинантного вируса. В некоторых аспектах набор может содержать фармацевтически приемлемые соли или растворы для введения рекомбинантного вируса. Необязательно, набор может дополнительно содержать инструкции для подходящих рабочих параметров в форме этикетки или отдельного вкладыша. Например, в наборе могут находиться стандартные инструкции, информирующие врача или лаборанта в отношении получения дозы рекомбинантного вируса.

Необязательно набор может дополнительно содержать информацию в отношении стандарта или контроля для того, чтобы образец пациента можно было сравнить с контрольной информацией в отношении стандарта, чтобы определить, является ли тестируемое количество рекомбинантного вируса терапевтическим количеством. Необязательно набор может дополнительно содержать устройства для введения, такие как шприц, игла с фильтром, удлинительная трубка и канюля. Определения

Композиции и способы согласно настоящему изобретению, как описано в данном документе, могут предусматривать использование, если не указано иное, общепринятых методик и описаний молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), клеточной биологии, биохимии, иммунохимии и офтальмологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие общепринятые способы включают в себя способы наблюдения и анализа сетчатки или зрения у субъекта, клонирования и распространения рекомбинантного вируса, составления фармацевтической композиции и биохимической очистки и иммунохимии. Конкретные иллюстративные примеры подходящих методик можно получить посредством ссылки на приведенные в данном документе примеры. Однако эквивалентные общепринятые процедуры, конечно, также могут быть использованы. Такие общепринятые методы и описания можно найти в стандартных лабораторных руководствах, таких как

Eds., *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV)* (1999); Weiner, et al., Eds., *Genetic Variation: A Laboratory Manual* (2007); Dieffenbach, Dveksler, Eds., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (2003); Bowtell and Sambrook, *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual* (2003); Mount, *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2004); Sambrook and Russell, *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2006) и Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2002) (все от Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L., *Biochemistry* (4th Ed.) W.H. Freeman, N.Y. (1995); Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, London (1984); Nelson and Cox, Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 3rd Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2000) и Berg et al., *Biochemistry*, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2002),

все из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки для любых целей. Используемые в данном документе формы единственного числа предназначены также для включения форм множественного числа, если контекст явно не указывает на иное. Кроме того, в той степени, в которой термины "включая", "включает", "имеющий", "имеет", "с" или их варианты используются в подробном описании и/или формуле изобретения, такие термины предназначены для включения, аналогично термину "содержащий".

Диапазоны могут быть выражены в данном документе как от "приблизительно" одного конкретного значения и/или до "приблизительно" другого конкретного значения. В другом случае такой диапазон при его указании включает значения от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Подобным образом, когда значения выражены в виде аппроксимаций с использованием предваряющего слова "приблизительно", будет понятно, что конкретное значение представляет собой другой случай. Кроме того, будет понятно, что конечные точки каждого из диапазонов являются значимыми как по отношению к другой конечной точке, так и независимо от другой конечной точки. Используемый в данном документе термин "приблизительно" относится к диапазону, который составляет плюс или минус 15% от заявленного числового значения в контексте конкретного использования. Например, приблизительно 10 будет включать диапазон от 8,5 до 11,5. Термин "приблизительно" также учитывает типичную ошибку или неточность измерения значений.

В контексте настоящего изобретения термин "осуществление лечения" или "лечение", как используется в данном документе, означает регрессию, уменьшение выраженности, подавление развития или предупреждение нарушения или состояния, в отношении которого применяют такой термин, или одного или нескольких симптомов такого нарушения или состояния (например, синдрома идиопатической гиперактивности мочевого пузыря).

Согласно настоящему изобретению термин "пациент" или "пациент, нуждающийся в этом" предназначен для человека или млекопитающего, не являющегося человеком, затронутых, или которые, вероятно, могут быть затронуты синдромом идиопатического гиперактивного мочевого пузыря.

Используемый в данном документе термин "детрузор" или "мышца детрузора" означает мышцу мочевого пузыря. Под "внутридетрузорно" подразумевается введение в мышцу детрузора.

Как подразумевается в данном документе, выражение "выделенная нуклеиновая кислота" относится к любому типу выделенной нуклеиновой кислоты, в частности она может быть природной или синтетической, ДНК или РНК, одноцепочечной или двухцепочечной. В частности, если нуклеиновая кислота является синтетической, она может содержать неприродные модификации оснований или связей, в частности для повышения устойчивости к деградации нуклеиновой кислоты. Когда нуклеиновая кислота представляет собой РНК, модификации, в частности, включают экпирование ее концов или модификацию 2'-положения рибозного остова, чтобы снизить реакционную способность гидроксильной группы, например, путем подавления гидроксильной группы (с получением 2'-дезоксирибозы или 2'-дезоксирибозо-2'-фторирибозы) или замены гидроксильной группы алкильной группой, такой как метильная группа (с получением 2'-О-метилрибозы).

Две аминокислотные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот являются "по сути гомологичными" или "по сути аналогичными", когда более 80%, предпочтительно более 85%, предпочтительно более 90% аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот являются идентичными или более чем приблизительно 90%, предпочтительно более 95% являются схожими (функционально идентичными). Чтобы определить процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, могут быть добавлены гэпы в первой аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания со

второй аминокислотой последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. Когда положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны. Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, являющихся общими для последовательностей. В одном варианте осуществления две последовательности имеют одинаковую длину. Определение процентной идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Предпочтительно аналогичные или гомологичные последовательности идентифицируются путем выравнивания с использованием, например, программы наложения GCG (Genetics Computer Group, Руководство по работе с программным пакетом GCG, версия 7, Мадисон, Висконсин) или любого из алгоритмов сравнения последовательностей, таких как BLAST, FASTA и др.

Используемый в данном документе термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Одним типом вектора является "плаزمид", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы для экспрессии в млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы для экспрессии в млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы, векторы экспрессии, способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны.

Другие варианты осуществления.

Хотя настоящее изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

#### Примеры

Пример 1. Доклинические исследования в отношении переноса гена hMaxi-K.

Крысы.

Патофизиология частичной обструкции выходного отверстия мочеиспускательного канала в крысиной модели повторяет многие важные аспекты соответствующих симптомов, проявляемых в отношении нижних мочевыводящих путей, наблюдаемых у людей. Отмеченные физиологические и патофизиологические сходства дают основания предположить, что исследования на мочевом пузыре крысы позволят понять, по крайней мере, некоторые аспекты физиологии и дисфункции мочевого пузыря человека.

Поскольку физиология мочевого пузыря крысы аналогична многим аспектам мочевого пузыря человека, в ходе исследований была изучена потенциальная применимость предусматривающей введение в мочевой пузырь К-канала генной терапии с использованием кДНК hSlo (т. е. канала maxi-K) для улучшения проявлений гиперактивности мочевого пузыря в модели крыс с частичной обструкцией выходного отверстия мочеиспускательного канала.

В одном исследовании двадцать две самки крыс Sprague-Dawley были подвергнуты частичной обструкции уретры (то есть выходного отверстия мочеиспускательного канала, PUO), при этом 17 ложнооперированных контрольных крыс изучали параллельно. После 6 недель обструкции надлобковые катетеры хирургическим путем помещали в купол мочевого пузыря у всех крыс. Двенадцати крысам с обструкцией инстиллировали в мочевой пузырь 100 мкг hSlo/pcDNA в 1 мл 20% сахарозы в PBS во время катетеризации, и еще 10 крыс с обструкцией получали 1 мл 20% сахарозы в PBS (7 крыс) или 1 мл 20% сахарозы в PBS, содержащей только pcDNA (3 крысы). Через два дня после хирургической операции для всех животных проводили цистометрию для изучения характеристик рефлекса мочеиспускания у бодрствующих крыс в условиях свободного поведения. Обструкция была связана с увеличением веса мочевого пузыря в три-четыре раза и изменениями практически каждого значения оценки параметров мочеиспускания (см. табл. 1).

Крысы с обструкцией, которым вводили 20% сахарозу в PBS, регулярно проявляли спонтанные сокращения мочевого пузыря между мочеиспусканиями. В отличие от этого, инъекция hSlo устраняла гиперактивность мочевого пузыря, связанную с обструкцией, без заметного влияния на любой другой цистометрический параметр. Предположительно, экспрессия hSlo в мочевом пузыре у крыс функционально противодействует повышенной сократительной способности, обычно наблюдаемой у животных с обструкцией, и, таким образом, улучшает проявления гиперактивности мочевого пузыря.

В другом исследовании была изучена способность переноса гена hSlo изменять и/или улучшать флуктуации давления между мочеиспусканиями, наблюдаемые в модели самцов крыс с обструкцией. Для этих исследований крыс подвергали обструкции в течение 2 недель с использованием промежуточного доступа. После 2 недель обструкции крыс катетеризировали для цистометрических исследований и по-

мещали в 1 из 2 групп лечения. Контрольные крысы одной возрастной группы подвергали ложной обструкции и изучали параллельно.

Средние значения параметров мочеиспускания у всех подопытных животных приведены в табл. 2, а отличительные характеристики из данных сведений графически изображены на фиг. 1 и 2. Важно отметить, что, как и при исследовании на самке крысы с 6-недельной обструкцией, однократная внутрипузырная инстиляция 100 мкг hSlo/pVAX была связана со статистически достоверными изменениями нескольких параметров мочеиспускания, имеющих большое физиологическое значение. В третьем исследовании оценивали эффекты переноса гена hSlo после 2 недель частичной обструкции выходного отверстия мочеиспускательного канала у самок крыс. Чтобы создать частичную обструкцию выходного отверстия мочеиспускательного канала (PUO), лигатура была помещена на мочеиспускательный канал самок крыс Sprague-Dawley весом 200-250 г (Christ et al., 2001), как описано выше. Через две недели после наложения лигатуры крыс подвергали хирургической операции по установке надлобкового катетера. Через два дня исследования функции мочевого пузыря (то есть цистометрия) были выполнены на бодрствующих крысах в условиях свободного поведения, находящихся в метаболических клетках. Как показано в табл. 3 и на фиг. 3, после 2 недель частичной обструкции выходного отверстия мочеиспускательного канала у самок крыс наблюдаются значительные изменения в отношении функции мочевого пузыря, о чем свидетельствует более чем двукратное увеличение емкости мочевого пузыря и появление значительных спонтанных сокращений мочевого пузыря. Повышенные спонтанные сокращения мочевого пузыря наблюдались как флуктуации давления между мочеиспусканиями (см. фиг. 3), и их можно количественно определить, как показано в табл. 3, по соответствующему увеличению, наблюдаемому для значений SA и IMP. Однократная внутрисветовая инъекция в мочевой пузырь 300 мкг и 1000 мкг pVAX/hSlo (в 1 мл 20% сахарозы в PBS) приводила к почти полному устранению гиперактивности детрузора. Этот эффект отражается в значительном снижении IMP и SA у крыс с обструкцией, которые получали hSlo, по сравнению с крысами, получавшими только вектор pVAX (см. табл. 3). Хотя истинная взаимосвязь эффекта в отношении DO для переноса гена hSlo не была показана в этой модели, это исследование продемонстрировало, что при вариации DO на 1 log-единицу (от 100 до 1000 мкг) имеется статистически достоверное и, более того, физиологически значимое уменьшение DO при отсутствии какого-либо обнаруживаемого влияния на способность мочевого пузыря к опорожнению. Таким образом, в данной животной модели pVAX/hSlo способен улучшать патофизиологические эффекты DO, связанной с обструкцией оттока, без какого-либо вредного влияния на функцию мочевого пузыря. Подобные эффекты наблюдались после инстиляции 100 мкг pVAX/hSlo у самок крыс Sprague Dawley с 6-недельной обструкцией, которые показаны ниже. Исследование на кроликах для оценки распределения различных объемов при переносе генов, введенных в стенку мочевого пузыря, выполняли до начала проведения клинического испытания у женщин с ОАВ с использованием прямых внутрипузырных инъекций (табл. 4). Использовали девять самок взрослых новозеландских белых кроликов весом в среднем 6 фунтов. Животных анестезировали и вводили pVAX-lacZ в детрузор в аликвотах по 0,05, 0,1 и 0,15 мл в 4, 8 и 10 участков стенки мочевого пузыря. Дополнительной группе из 3 животных вводили только носитель только в самом большом объеме носителя (4, 8 или 10 участков×0,15 мл). Плазмиды находились в растворе в концентрации 4000 мкг/мл. Через неделю животных умерщвляли, а мочевые пузыри извлекали и взвешивали. Области, выделенные синим цветом, подготавливали для гистологического и молекулярного анализов. Молекулярный анализ экспрессирующей hSlo ткани проводили с помощью экстракции РНК и ПЦР в реальном времени. Кроме того, проводили гистопатологическое исследование различных тканей кролика. Из-за трудностей, связанных с осуществлением прямых инъекций в мочевой пузырь в данной животной модели, инъекцию 0,05 мл получал только один кролик. Шести кроликам вводили 0,1 мл в 4, 8 и 10 участков (3 изнутри мочевого пузыря; 3 снаружи мочевого пузыря). Трем кроликам вводили 0,15 мл в 4, 8 и 10 участков. Результаты показали, что кролики с большим количеством инъекций (8-10 инъекций) характеризовались меньшей экспрессией, чем некоторые животные с наименьшим количеством инъекций (4 инъекции). Общий вывод состоит в том, что прямая инъекция в стенку мочевого пузыря приводит к экспрессии гена, однако, по-видимому, наибольшая эффективность достигается при более широком рассредоточении инъекций, возможно, на расстоянии 1 см друг от друга. Ген выявляли в крови не позднее 30 мин после обработки. Из-за наложения швов наблюдались гранулематозные поражения (распространенный артефакт в модели кролика).

#### Токсикология.

Для показания ОАВ технически невозможно моделировать тот же трансуретральный путь внутрипузырного введения pVAX/hSlo у крыс, который будет использоваться в исследованиях с участием людей. Поэтому в исследованиях токсикологии и биораспределения, оценивающих внутрипузырную инъекцию pVAX/hSlo, к мочевому пузырю животных получали доступ хирургическим путем, а исследуемый материал вводился непосредственно в мочевой пузырь с помощью иглы. Эффект pVAX/hSlo в отношении гематологических и химических показателей оценивали у пятнадцати нормальных самок крыс Sprague-Dawley весом 275-300 г. 1000 мкг либо вектора pVAX/hSlo (8 животных), либо вектора pVAX (7 животных) вводили непосредственно в просвет мочевого пузыря после получения доступа хирургическим путем. Образцы крови собирали посредством прокола сердца сразу после того, как животных умерщвляли с

помощью анестезии с использованием CO<sub>2</sub> через 4, 8 и 24 ч и через 1 неделю после введения испытуемого материала. Образцы анализировали на глюкозу, азот мочевины, креатинин, общий белок, общий билирубин, щелочную фосфатазу, ALT, AST, холестерин, натрий, калий, хлорид, соотношение A/G, соотношение BUN/креатинин, глобулин, липазу, амилазу, триглицериды, СРК, GTP, магний и осмоляльность. Лабораторные параметры были сходными между pVAX/hSlo и контролями в четырех временных точках.

Эффект pVAX/hSlo в отношении гистопатологии у самок крыс Sprague-Dawley (275-300 г) оценивали в двух исследованиях. В первом исследовании четырем крысам выполняли операцию по частичной обструкции мочевого пузыря, а спустя 2 недели вводили 100 мкг pVAX/hSlo в 1000 мкл 20% сахарозы в PBS непосредственно в просвет мочевого пузыря посредством обеспечения хирургического доступа к мочевому пузырю. По одному животному умерщвляли через 1, 8 и 24 ч и через одну неделю после введения pVAX/hSlo. Ткани 47 органов немедленно фиксировали в 10% формалине и обрабатывали для рутинного гистопатологического исследования. Гистопатологические изменения отмечали только в мочевом пузыре и состояли из серозита, отека, кровоизлияния и фиброза. Эти изменения соответствовали ожидаемым изменениям при частичной обструкции мочеиспускательного канала и не рассматривались как связанные с инъекцией pVAX/hSlo.

Ввиду гистопатологических изменений в мочевом пузыре крыс с PUO, которым вводили pVAX/hSlo, оценивали эффект pVAX/hSlo по сравнению с вектором (pVAX) и 20% сахарозы в PBS в отношении гистологии мочевого пузыря у нормальных крыс. После обеспечения доступа хирургическим путем непосредственно в просвет мочевого пузыря вводили следующий тестируемый материал: 1) 0,6 мл 20% сахарозы в PBS, 2) 1000 мкг pVAX в 0,6 мл 20% сахарозы в PBS или 3) 1000 мкг pVAX/hSlo в 0,6 мл 20% сахарозы в PBS. Животных умерщвляли с помощью CO<sub>2</sub> через 72 ч после инстилляций и мочевые пузыри удаляли и немедленно фиксировали в 10% растворе формалина. Временную точку в 72 ч выбирали для ограничения механического воздействия прокола иглой на стенку мочевого пузыря и сведения к минимуму любых возможных эффектов воспаления, которые могут быть вызваны pVAX/hSlo, вектором или разбавителем. При осмотре мочевого пузыря не было выявлено никаких макроскопических изменений. В целом, не было выявлено никаких связанных с лечением различий между pVAX/hSlo и средоносителем или pVAX. Никаких связанных с лечением изменений в уретелии отмечено не было. Повреждения, видимые при гистологическом исследовании, соответствовали травме от иглы, использованной для инъекции, поскольку они были очаговыми, а не диффузными или многоочаговыми по распределению. В исследовании биораспределения испытуемый материал вводили непосредственно в просвет обнаженных мочевых пузырей нормальных самок крыс Sprague-Dawley весом 275-300 г. 1000 мкг pVAX/hSlo в 0,6 мл 20% сахарозы в PBS вводили 12 животным, и 0,6 мл 20% сахарозы в PBS вводили 5 животным (фиг. 4). По четыре животных умерщвляли через 24 ч, 1 неделю и 1 месяц после введения испытуемого материала. Образцы тканей собирали в следующем определенном порядке: сердце, печень, мозг, почка, селезенка, легкое, аорта, трахея, лимфатический узел, глаз, бицепс, толстая кишка, влагалище и матка.

Образцы геномной ДНК анализировали на ген канамицина с помощью валидированного способа QPCR. Результаты показывают, что после инъекции 1000 мкг pVAX/hSlo плазмиду можно обнаружить через 24 ч в аорте, матке, мочевом пузыре и уретре. Через 1 неделю в мочевом пузыре было измерено примерно 13 миллионов копий/мкг общей ДНК, а в бицепсах в незначительной степени также можно было выявить pVAX/hSlo. Результаты изображены в графическом виде на фиг. 4 (ниже).

Хотя эти результаты отличаются от результатов после интракавернозной инъекции, выявление 13 млн копий/мкг общей ДНК по-прежнему ниже, чем количество, составляющее <30 копий плазмиды/10 клеток-хозяев, которое поддерживается в месте инъекций ДНК-вакцины после 60 дней в клинических исследовательских испытаниях нового лекарственного средства (IND), проводимых для этих вакцин. Эти исследования ДНК-вакцины показали, что внутримышечная, подкожная, внутрикожная или биобаллистическая доставка не приводила к длительному присутствию плазмиды в эктопических участках. Кроме того, процедура введения pVAX/hSlo непосредственно в обнаженный хирургическим путем мочевой пузырь животных может объяснить возможность обнаружения плазмиды в ткани, отличной от мочевого пузыря. У людей hMaxi-K будут инстиллировать непосредственно в мочевой пузырь с использованием трансуретрального катетера, и риск распространения плазмиды из-за повреждения ткани или травмы, очевидно, заметно снижается.

Пример 2. Клиническое испытание переноса гена hMaxi-K, проводимое с участием людей.

Схема клинического испытания.

Данное исследование является многоцентровым исследованием фазы 1B, оценивающим безопасность и потенциальную активность двух возрастающих доз гена hMaxi-K, вводимых в виде прямой инъекции в стенку мочевого пузыря женщин с идиопатическим (не являющимся нейрогенным) синдромом гиперактивного мочевого пузыря (ОАВ) и гиперактивностью детрузора (DO).

Исследуемая популяция представляет собой женщин возрастом  $\geq 18$  лет, не обладающих детородным потенциалом (например, подвергнутых гистерэктомии, лигированию маточных труб или в постменопаузе, определяемой как последний менструальный цикл, произошедший за >12 месяцев до включения в исследование, или FSH в сыворотке >40 мМЕ/л), с гиперактивным мочевым пузырем (ОАВ) и гиперак-

тивностью детрузора, которые в остальном здоровы.

Критерии включения включают клинические симптомы гиперактивного мочевого пузыря продолжительностью  $\geq 6$  месяцев, включая по меньшей мере одно из следующего.

1. Частое мочеиспускание ( $\geq 8/24$  ч).
2. Симптомы ургентности (жалоба на внезапное непреодолимое желание к мочеиспусканию, которое трудно отложить) или никтурия (жалоба на пробуждение ночью два или более раз для осуществления опорожнения).
3. Ургентное недержание мочи (в среднем 5 раз в неделю, при этом ургентное недержание мочи определяют как жалобу на непроизвольную утечку, сопровождающуюся или немедленно следующую за ургентностью).

У участников также сканировали мочевой пузырь при скрининге, демонстрируя остаточный объем  $\leq 200$  мл и задокументированную во время уродинамического исследования исходного уровня гиперактивность детрузора  $\geq 1$  неконтролируемому сокращению(-иям) детрузора при по меньшей мере 5 см/Н<sub>2</sub>O.

В табл. 6 показаны обзор схемы лечения и процедур согласно визитам. Основной целью этого исследования является оценка возникновения нежелательных явлений и их связь с однократным лечением, предусматривающим примерно 20-30 внутримышечных инъекций hMaxi-K в стенку мочевого пузыря, по сравнению с плацебо (20% сахарозы в PBS). Данное исследование представляло собой двойное слепое несбалансированное плацебо-контролируемое испытание с последовательным введением доз. Участниками были здоровые женщины в возрасте 18 лет и старше, не обладающие детородным потенциалом, с умеренной OAB/DO продолжительностью  $\geq$  шести месяцев, сопровождающейся по меньшей мере одним из следующего: частыми мочеиспусканиями  $\geq 8$  раз в день, симптомами ургентности или никтурии (жалобой на пробуждение ночью два или более раз для осуществления опорожнения), ургентным недержанием мочи (пятью или более эпизодами недержания в неделю) и гиперактивностью детрузора с  $\geq 1$  неконтролируемым физическим сокращением(ми) детрузора при давлении по меньшей мере 5 см/Н<sub>2</sub>O, задокументированном на CMG. Для всех участников предыдущее лечение антихолинэргическими препаратами не было эффективным. Для четверых терапия ботулиническим токсином типа А не была эффективной.

Участникам случайным образом назначали либо hMaxi-K в одной из двух доз (16000 мкг или 24000 мкг), либо плацебо. Лечение проводилось в виде 20-30 внутримышечных инъекций в стенку мочевого пузыря во время цистоскопии. Участников осматривали 8 раз в течение 24-недельного периода со следующим после исследования наблюдением через 18 месяцев. Все сообщаемые нежелательные явления, возникающие после введения доз исследуемого лекарственного средства, были зарегистрированы. Комплексные CMG проводили при скрининговом визите 1А (неделя - 1) и на неделе 4 (визит 5) и на неделе 24 (визит 8) после инъекции. Остаточное содержание мочи (PVR) измеряли при каждом визите с помощью Bladderscan®.

Данные для оценки эффективности оценивали с использованием сводной описательной статистики по группам лечения (комбинированные группы с плацебо относительно 2 групп активного лечения и комбинированные группы с плацебо относительно комбинированные группы лечения). Линейные модели со смешанными эффектами использовали для оценки различий в изменениях по сравнению с исходным уровнем между плацебо и активным лечением, а также для проверки, присутствовала ли зависимость доза-реакция для разных результатов. Модели обобщенных оценочных уравнений (GEE) использовали для оценки эффектов для бинарных конечных точек. Имелось 6 участников, которые получали 16000 мкг, 3 участника, которые получали 24000 мкг, и 4 участника, которые получали плацебо. В обеих группах активного лечения большинство нежелательных явлений (АЕ) характеризовались легкой степенью тяжести, и все они считались не связанными с исследуемым лекарственным средством. После лечения hMaxi-K у двух женщин наблюдались умеренные не связанные с ним инфекции мочеполовых путей: одна получала 24000 мкг в месяц после введения дозы, а другая получала 16000 мкг через 6 месяцев после введения дозы. В группе, получавшей 16000 мкг, было зарегистрировано одно не связанное с лечением серьезное АЕ, представляющее собой обострение ранее существовавшей астмы из-за холодной погоды, которое потребовало посещения пункта неотложной помощи и разрешилось после лечения астмы. Ни один из субъектов не прекратил лечение из-за АЕ, и все включенные субъекты завершили 6-месячное испытание. Кроме того, в течение следующего после исследования 18-месячного долгосрочного наблюдения для оценки безопасности не было отмечено никаких проблем у субъектов, которых наблюдали до настоящего времени (9 из 13 завершили 18-месячные наблюдения; 13 из 13 завершили 12-месячные наблюдения).

Усредненные данные из дневников, собранные за 7 дней до каждого визита, выявили статистически достоверные ( $p < 0,05$ ) улучшения относительно плацебо и исходного уровня с длительным снижением среднего числа мочеиспусканий в день и среднего числа эпизодов ургентности в день в течение 6 месяцев испытания. Изменения, показанные в таблицах 7 и 8 ниже, представляют собой изменения среднего значения ( $\pm$  SE) относительно исходного уровня относительно плацебо.

Параметры качества жизни (согласно опроснику о состоянии здоровья больницы Королевского колледжа) показали статистически достоверные устойчивые изменения среднего значения для индивиду-

альных групп активного лечения и для комбинированных групп активного лечения (все дозы) относительно плацебо и относительно исходного уровня в областях воздействия на жизнь, ролевого функционирования, физических ограничений, социальных ограничений и сна и энергии. Результаты данной фазы IV клинического испытания показали значительное уменьшение числа эпизодов мочеиспускания и ургентности после однократного введения hMaxi-K, которое длилось в течение 6 месяцев испытания. Данные результаты наблюдались в отсутствие изменения PVR и серьезных нежелательных явлений, связанных с лечением. Результаты этого нового клинического испытания впервые показывают, что однократное внутридурозное введение человеческого гена Maxi-K являлось безопасным.

Несмотря на небольшую численность включенной популяции, общие результаты из дневников участников показали достоверные снижения ( $p < 0,05$ ) среднего числа мочеиспусканий и среднего числа эпизодов ургентности относительно плацебо и относительно исходного уровня для всех групп активного лечения и эпизодов ургентного недержания относительно исходного уровня для всех доз исследуемого лекарственного средства. Ответ участников на лечение показал некоторые положительные значения  $p$  для всех активных доз относительно плацебо в ходе визитов 3 и 5 (см. табл. 9). Что касается уменьшения количества мочеиспусканий и эпизодов ургентности, то эти достоверные изменения относительно плацебо и относительно исходного уровня наблюдались при всех визитах до последнего 8 визита (24 недели). Не имелось никаких достоверных различий между 2 вариантами активного лечения (16000 мкг и 24000 мкг), возможно, из-за небольшого числа участников, включенных в группу, получавшую 24000 мкг ( $N=3$ ).

Параметры качества жизни (согласно опроснику о состоянии здоровья больницы Королевского колледжа) показали статистически достоверное среднее улучшение для индивидуальных групп активного лечения и для комбинированных групп активного лечения (все дозы) относительно плацебо и относительно исходного уровня во многих областях.

Это включало следующее.

Область 2. Воздействие на жизнь:

$P=0,014$  для всех активных доз и  $p=0,007$  для 24000 мкг при визите 5 относительно исходного уровня;

$P=0,016$  для 24000 мкг при визите 5 относительно плацебо;

$P=0,016$  для группы, получавшей 24000 мкг, относительно группы, получавшей 16000 мкг, при визите 5;

$P=0,043$  для всех активных доз относительно исходного уровня при визите 6;

$P=0,010$  для 16000 мкг и  $p=0,005$  для всех активных доз относительно исходного уровня при визите 7;

$P=0,026$  для всех активных доз относительно исходного уровня при визите 8.

Область 3. Ролевое функционирование:

$P=0,004$ ,  $p=0,015$ ,  $p=0,001$  для 16000 мкг, 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при визите 5;

$P=0,030$ ,  $p=0,035$  и  $p=0,015$  для 16000 мкг, 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно плацебо при визите 5;

$P=0,023$ ,  $p=0,014$  и  $p=0,001$  для 16000 мкг, 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при визите 6;

$P=0,047$ ,  $p=0,020$  и  $p=0,014$  для 16000 мкг, 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно плацебо при визите 6;

$P=0,012$ ,  $p=0,014$  и  $p < 0,001$  для 16000 мкг, 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно плацебо при визите 7;

$P=0,032$  и  $p=0,021$  для 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно плацебо при визите 7;

$P=0,014$  и  $p=0,005$  для 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при визите 8;

$P=0,047$ ,  $p=0,007$  и  $p=0,007$  для 16000 мкг, 24000 мкг и всех активных доз

соответственно относительно плацебо при визите 8; Область 4. Физические ограничения:

$P=0,018$  и  $p=0,005$  для 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при визите 6;

$P=0,012$ ,  $p=0,018$  и  $p=0,001$  для 16000 мкг, 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при визите 7;

$P=0,012$ ,  $p=0,047$  и  $P=0,003$  для 16000 мкг, 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при визите 8.

Область 5. Социальные ограничения:

$P=0,032$  и  $p=0,22$  для 24000 мкг относительно исходного уровня и плацебо соответственно при визите 6;

$P=0,002$  и  $p=0,004$  для 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при 7 визите;

$P=0,008$  и  $p=0,043$  для 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно плацебо при 7 визите;

$P=0,002$  и  $p=0,014$  для 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при визите 8;

P=0,006 для 24000 мкг относительно плацебо при визите 8.

Область 8. Сон и энергия:

P=0,047, p=0,007 и p=0,001 для 16000 мкг, 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при 5 визите;

P=0,020 и p=0,015 для 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно плацебо при 5 визите;

P=0,005 и p=0,006 для 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при визите 6;

P=0,001 и p=0,006 для 24000 мкг и всех активных доз соответственно относительно исходного уровня при 7 визите;

P=0,012 для 24000 мкг относительно плацебо при 7 визите.

72-часовой тест с прокладкой (табл. 12) показал некоторые статистически достоверные изменения при визитах 3-6 и визите 8 для активных доз hMaxi-K относительно исходного уровня, однако были также статистически достоверные изменения для плацебо при визитах 3-5 и визите 8. В целом, группа плацебо, по-видимому, характеризовалась менее тяжелой степенью заболевания, чем группы активного лечения, при этом значения исходного (V2) веса прокладок в группе активного лечения почти в 2 раза превышали таковое для группы плацебо. Кроме того, средний вес прокладки при VIA для плацебо составлял всего 29 грамм, тогда как вес при V2 для этой группы составлял 259 грамм (почти в 9 раз больше, чем при VIA). Это было связано с тем фактом, что участница 002-001 выбросила свои прокладки до VIA (поэтому она не была включена в подсчет среднего значения для VIA), и у нее, по-видимому, была более тяжелая степень заболевания, чем у других 3 участников, получавших плацебо (ее 3-дневный средний вес прокладки при V2 составлял 295 г по сравнению с 3,3-36 г для остальных 3 участников).

Таблица 1

Обобщенные данные в отношении влияния обработки на средние параметры мочеиспускания у самок крыс с 6-недельной обструкцией и ложноперирированных контролей

	WT (мг)	MP	THP	BP	BC	MV	RV	MIP (IP-BP)
<b>Контроль: без обструкции (n=17)</b>	171 ± 15,0	73,9 ± 4,99	22,3 ± 2,1	12,6 ± 1,09	1,2 ± 0,1	1,13 ± 0,10	0,13± 0,04	3,49 ± 0,79
<b><sup>a</sup>С обструкцией: подвергнутые введению pVAX/hSlo (n=12)</b>	*547,6 ± 55,4	*128,9 ± 16,1	*36,3 ± 4,30	*22,1 ± 43,9	*3,44 ± 0,41	*3,22 ± 0,39	**0,3 ± 0,10	**5,59 ± 1,05
<b><sup>b</sup>С обструкцией: без обработки (n=10)</b>	*473,1 ± 56,6	*132,7 ± 17,9	*39,3 ± 3,6	*18,8 ± 1,9	*2,91 ± 0,62	*2,94 ± 0,65	0,09 ± 0,05	9,37 ± 1,79

<sup>a</sup>100 мкг pVAX/hSlo в 200 мкл 20% сахарозы в PBS

<sup>b</sup>3 из этих крыс получали 1000 мкг pcDNA в 20% сахарозе в PBS

Контроль: ложноперирированные контрольные животные одной возрастной группы без обструкции, WT: масса мочевого пузыря (мг), MP: давление при мочеиспускании (см H<sub>2</sub>O), THP: пороговое давление (см H<sub>2</sub>O), BP: базальное давление (см H<sub>2</sub>O), BC: емкость мочевого пузыря (мл), MV: объем мочеиспускания (мл), RV: остаточный объем (мл), MIP: среднее давление между мочеиспусканиями ((см H<sub>2</sub>O; среднее давление за весь интервал между мочеиспусканиями минус базальное давление для одного и того же животного)

\*Достоверно отличается от ложноперирированных; p<0,05

\*\*Достоверно отличается от контроля (с обструкцией, но без обработки); p<0,05, односторонний ANOVA, с апостериорными парными сравнениями Ньюмена-Кейлса

Таблица 2

Обобщенные данные в отношении влияния обработки на средние параметры мочеиспускания у самцов крыс с 2-недельной обструкцией и ложноперирированных контролей

	Vcap	MV	RV	BP	TP	MP	IMP	SA	Bcom	BW
<b>pVAX</b>	2,36 ±	1,84	0,53 ±	18,65 ±	47,21 ±	91,28 ±	32,49 ±	13,84 ±	0,12 ±	348,3 ±
<b>(n = 8)<sup>b</sup></b>	0,48	±0,31	0,21	5,38	8,61 <sup>c</sup>	18,52 <sup>c</sup>	7,5 <sup>c</sup>	2,57 <sup>c</sup>	0,04	105,3
<b>hSlo</b>	2,48 ±	2,22 ±	0,27	7,66 ±	27,26 ±	54,05 ±	18,13 ±	10,47 ±	0,17 ±	352,3 ±
<b>(n = 16)<sup>b</sup></b>	0,30 <sup>c</sup>	0,26 <sup>c</sup>	±0,12	1,35 <sup>d</sup>	3,7 <sup>d</sup>	6,28 <sup>d</sup>	2,8 <sup>d</sup>	1,89 <sup>c</sup>	0,03	42,99
<b>Ложноперирированные</b>	1,35 ±	1,32 ±	0,03	10,6	18,47 ±	46,58 ±	13,96 ±	3,39 ±	0,18 ±	274,4 ±
<b>(n = 10)<sup>a</sup></b>	0,14	0,12	±0,02	±0,81	0,79	3,34	1,09	0,61	0,018	24,5

Vcap: емкость мочевого пузыря (мл); MV: объем мочеиспускания (мл); RV: остаточный объем (мл); BP: базальное давление (см H<sub>2</sub>O); TP: пороговое давление (см H<sub>2</sub>O); MP: давление при мочеиспускании (см H<sub>2</sub>O); IMP: среднее давление между мочеиспусканиями (см H<sub>2</sub>O; среднее давление

на протяжении всего интервала между мочеиспусканиями минус базальное давление для одного и того же животного); SA: спонтанная активность (см H<sub>2</sub>O); Vcom: растяжимость мочевого пузыря (мл/см H<sub>2</sub>O); BW: масса мочевого пузыря (мг)

<sup>a</sup>5 из этих животных являются 2-недельными ложнооперированными контролями, а остальные 5 на 1 месяц старше (или 6-недельными ложнооперированными контролями). Однако статистический анализ показал, что не присутствовало каких-либо достоверных различий в отношении какого-либо из параметров мочеиспускания, и, таким образом, эти 2 популяции считались однородными для целей данного анализа

<sup>b</sup> Всем получающим обработку крысам вводили 1000 мкг только pVAX или 100 мкг hSlo/pVAX в 1 мл 20% сахарозы в PBS. Все данные представлены в виде среднего значения  $\pm$ S.E.M. и анализировали с использованием одностороннего дисперсионного анализа с использованием апостериорного критерия Тьюки для всех парных (множественных) сравнений

<sup>c</sup> Достоверное отличие от соответствующего значения для ложнооперированного контроля

<sup>d</sup> Достоверное отличие от соответствующего значения для pVAX

Таблица 3

Результаты влияния обработки на средние параметры мочеиспускания у самок крыс с 2-недельной обструкцией

	MP	TP	BP	BC	MV	RV	MIP (IP-BP)	MF	SA	BCOM
<b>Контроль: pVAX (n=10)</b>	68,1 $\pm$ 8,1	34,2 $\pm$ 4,9	9,1 $\pm$ 1,9	2,3 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,0	24,0 $\pm$ 4,6	4,6 $\pm$ 0,5	14,9 $\pm$ 3,4	0,1 $\pm$ 0,02
<sup>a</sup> C <b>обструкцией: подвергнутые введению 10 мкг pVAX/hSlo (n=7)</b>	65,3 $\pm$ 10,5	30,3 $\pm$ 3,6	7,2 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1	20,0 $\pm$ 3,5	4,4 $\pm$ 0,5	12,8 $\pm$ 3,0	0,1 $\pm$ 0,02
<sup>b</sup> C <b>обструкцией: подвергнутые введению 30 мкг pVAX/hSlo (n=9)</b>	81,1 $\pm$ 7,3	36,6 $\pm$ 4,4	11,8 $\pm$ 2,6	3,2 $\pm$ 1,0	2,7 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,2	27,1 $\pm$ 3,5	4,3 $\pm$ 0,4	15,3 $\pm$ 1,5	0,1 $\pm$ 0,02
<sup>b</sup> C <b>обструкцией: подвергнутые введению 300 мкг pVAX/hSlo (n=10)</b>	47,8 $\pm$ 3,7	17,7*,** $\pm$ 1,6	6,3 $\pm$ 1,1	2,3 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2	10,3*,** $\pm$ 1,2	5,3 $\pm$ 0,6	4,1*,** $\pm$ 0,4	0,2*,** $\pm$ 0,02
<sup>b</sup> C <b>обструкцией: подвергнутые введению 1000 мкг pVAX/hSlo (n=12)</b>	57,2 $\pm$ 6,2	21,4*,** $\pm$ 1,8	5,7 $\pm$ 1,1	2,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,04	11,6*,** $\pm$ 1,3	5,2 $\pm$ 0,3	5,9*,** $\pm$ 0,5	0,1*,** $\pm$ 0,01

<sup>a</sup>10, 30, 300, 1000 мкг pVAX/hSlo в 200 мкл 20% сахарозы в PBS;

Контроль: Контрольные животные одной возрастной группы с обструкцией, которые получали 1000 мкг только pVAX, WT: масса мочевого пузыря (мг), MP: давление при мочеиспускании (см H<sub>2</sub>O);

TP: пороговое давление (см H<sub>2</sub>O), BP: базальное давление (см H<sub>2</sub>O), BC: емкость мочевого пузыря (мл), MV: объем мочеиспускания (мл), RV: остаточный объем (мл);

MIP: среднее давление между мочеиспусканиями ((см H<sub>2</sub>O; среднее давление на протяжении всего интервала между мочеиспусканиями минус базальное давление для одного и того же животного); SA: спонтанная активность (MIP-BP); BCOM: растяжимость мочевого пузыря (емкость мочевого пузыря/TP-BP);

\* Достоверно отличается от контроля; p<0,05

Все парные множественные процедуры сравнения (метод Холма-Сидака).

Достоверно отличается от контроля; p<0,05, односторонний ANOVA.

Таблица 4

Протокол внутривезикулярной инъекции кроликам

N = 12 кроликов	50-50 смесь p- VAXhslo (мл)	участки/кр олик	участки/кр олик	участки/кр олик
	0,05	4	8	10
	0,1	4	8	10
	0,15	4	8	10

Таблица 5

Конечная доза hMaxi-k				
Доза hMaxi-K	16000 мкг	20% сахараза в PBS	24000 мкг	20% сахараза в PBS
Объем	4 мл		6 мл	
Количество пробирок	2		3	
Конечный объем	4 мл		6 мл	
Количество внутримышечных инъекций	20 инъекций по 0,2 мл в указанные участки в стенке мочевого пузыря, расположенные примерно на расстоянии 1 см друг от друга (фигура 5)		30 инъекций по 0,2 мл в указанные участки в стенке мочевого пузыря, расположенные примерно на расстоянии 1 см друг от друга (фигура 5)	

Примечание: В каждой дозовой когорте 6 участников получают hMaxi-K и 3 получают 20% сахаразы в PBS (плацебо)

Таблица 6

## Обобщенные результаты тестов в соответствии с лабораторными визитами

Фаза	Скинниговая фаза			Последующие визиты после получения лечения						
	Визит 1	Визит 1A <sup>n</sup>	Визит 2	Последующий контакт по телефону <sup>j</sup>	Визит 3	Визит 4	Визит 5	Визит 6	Визит 7	Визит 8
День	-14	От -14 до -8	0 (исходный уровень)	Дни 1 и 3	8	15	29	57	85	169 (заключительный)
Неделя	-2		0	0	1	2	4	8	12	24
Окно визитов (дни)		+2	+2	День 3±1	+2	+2	±2	±3	±5	±5
Подписанное информированное согласие	▲									
Оценка критериев включения/исключения	▲	▲	▲ <sup>f</sup>							
Демография и история болезни/хирургическая история	▲									
Физический осмотр	▲		▲ <sup>f</sup>		▲	▲	▲	▲	▲	▲
ЭКГ	▲		▲ <sup>a</sup>		▲		▲			▲
Оценка предыдущих/сопутствующих лекарственных препаратов	▲	▲	▲ <sup>f</sup>		▲	▲	▲	▲	▲	▲
Жизненные показатели <sup>h</sup>	▲		▲ <sup>f,1</sup>		▲	▲	▲	▲	▲	▲
Объективная оценка ОАВ/ДО (шстометрия) <sup>b</sup>		▲ <sup>d</sup>					▲			▲
Сканирование мочевого пузыря <sup>c</sup>	▲					▲		▲		▲
Выдача дневника ежедневных мочеиспусканий/анкеты urgency <sup>i</sup>	▲	▲	▲ <sup>f</sup>		▲	▲	▲	▲	▲	
Тест с прокладкой <sup>m</sup>		▲	▲		▲	▲	▲	▲	▲	▲
QoL (опросник о состоянии здоровья больницы Королевского колледжа) и SF-12			▲ <sup>f</sup>				▲	▲	▲	▲
Субъективная оценка состояния заболевания <sup>k</sup>			▲ <sup>f</sup>		▲	▲	▲	▲	▲	▲
Субъективная оценка ответа на лечение <sup>k</sup>					▲	▲	▲	▲	▲	▲
ICIQ-SF			▲ <sup>f</sup>				▲	▲	▲	▲
Анализ мочи и посев мочи <sup>d</sup>	▲	▲	▲ <sup>f</sup>	▲	▲	▲	▲		▲	▲
Гематологические лабораторные тесты <sup>e</sup>	▲		▲	▲	▲	▲	▲		▲	▲
Химические лабораторные тесты <sup>e</sup>	▲		▲	▲	▲	▲	▲		▲	▲
Фармакокинетическая оценка (кДНК hSto в моче и крови)			▲ <sup>f,g</sup>		▲	▲	▲	▲	▲	▲ <sup>g</sup>
Оценка нежелательных явлений		▲	▲ <sup>f</sup>	▲ <sup>j</sup>	▲	▲	▲	▲	▲	▲
Введение исследуемого лекарственного средства			▲							

<sup>a</sup>ЭКГ будет проводиться до введения исследуемого лекарственного средства и через 2 ч после введения дозы.

<sup>b</sup> Цистометрия включает: объем при первом позыве к мочеиспусканию, давление детрузора, внутрибрюшное давление, давление детрузора в начале мочеиспускания, давление детрузора при максимальном потоке, максимальное давление детрузора, объем при сильном позыве к опорожнению, пиковую скорость потока при мочеиспускании, объем мочеиспускания, объем при DO, остаточный объем после мочеиспускания, общий объем мочевого пузыря (объем мочеиспускания + остаточный объем), количество сокращений детрузора во время процедуры и продолжительность DO.

<sup>c</sup> Критерии включения предусматривают остаточный объем  $\leq 200$  мл. Сканирование мочевого пузыря при V1 и V8, которое подлежит выполнению до катетеризации

<sup>d</sup> Общий анализ мочи в отношении эритроцитов и лейкоцитов, определяемых микроскопированием, белка, глюкозы, нитритов, pH и удельного веса при визитах V1, 3-5 и V7 и V8. При V1A и V2 будет проведен анализ мочи с помощью тест-полоски. Посевы мочи при V1 (путем катетеризации уродинамическим катетером), V3 (бактериологический анализ); при V1A, V2, V5 и V8 до цистометрии или цистоскопии (путем катетеризации уродинамическим катетером) и перед выпиской путем бактериологического анализа (при V2 использование полученной первой мочи после введения препарата).

Анализ мочи при визите 2 с помощью тест-полоски будет проводиться до введения дозы, а посев мочи будет проводиться как до введения исследуемого лекарственного средства, так и до выписки

<sup>e</sup> Лабораторные тесты, которые будут проведены при V1, V2 - 5, V7 и V8, включают: гематологию - общий анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, количество тромбоцитов, скорость оседания, PTT, PT (без PT и PTT при V2 и V4), CRP, антиядерное антитело; биохимию - BUN, креатинин,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{CO}_2$ , СГ, альбумин, щелочная фосфатаза, ALT, AST, GGT, общий билирубин, общий белок, СРК, LDH, глюкоза); серологический тест на беременность с определением бета-НСГ, являющийся обязательным для женщин детородного возраста, которые не подвергались гистерэктомии на момент скрининга при V1 и далее по мере необходимости. Кроме того, FSH > 40 МЕ/л, если последний менструальный цикл имел место не > 12 месяцев до включения в исследование. HbA1c будет проводиться только при скрининге в ходе визита 1. При 2 (неделя 0) биохимия проводиться не будет. При V4 биохимия будет включать только BUN, креатинин, электролиты ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), CRP, глюкозу и ANA. При визите 1A или V6 лабораторные анализы проводиться не будут. Лабораторные анализы должны проводиться в одно и то же время суток при всех визитах в ходе исследования

<sup>f</sup> Анализ или процедура будет проведена до введения исследуемого лекарственного средства при визите 2

<sup>g</sup> Предварительное введение при V2. Если образец остается положительным на 24 неделе, участник должен возвращаться ежемесячно до тех пор, пока два последовательных образца не станут отрицательными в отношении ДНК hSlo

<sup>h</sup> Жизненные показатели будут включать высоту только при V1; вес при V1 и V8; пероральную температуру тела при всех визитах (кроме V1A). Для всех измерений ВР необходимо использовать одну и ту же руку и указывать какую именно

<sup>i</sup> Дневники должны быть заполнены до V1A (для проверки на соответствие и критерии включения), за 7 дней до визита 2 и 7 дней до каждого визита в дальнейшем

<sup>j</sup> С участниками свяжутся по телефону на 1-й и 3-й дни исследования (1 день и 3 дня  $\pm 1$  после введения препарата при визите 2) для оценки нежелательных явлений

<sup>k</sup> Субъективные оценки основаны на следующих вопросах, приведенных в приложении С: "Насколько тягостной вы считаете свою проблему, связанную с мочевым пузырем?" и "Было ли лечение полезным для вас?"

<sup>l</sup> ВР будет измеряться каждые 15 мин в течение 2 ч после введения исследуемого лекарственного средства

<sup>m</sup> Участники принесут прокладки/подгузники, которые носили в течение 3 дней до визита 1A и 2 (в случае V1A после скрининга при V1) и 3 дней до всех последующих визитов (визит 3 - визит 8); также принесут чистые прокладку/подгузники для использования в качестве исходного уровня

<sup>n</sup> Визит 1A может состояться в тот же день, что и V1. В этом случае все необходимые процедуры для V1A, которые еще не выполнены при V1, должны быть завершены. Цистоскопию необходимо выполнять после всех других процедур V1, а посев мочи после цистоскопии с использованием мочи, полученной для бактериологического анализа. Если V1A совпадает с V1, то поскольку сбор прокладок и дневников не будет завершен до V1, они должны быть проверены на соответствие при V2

<sup>o</sup> ЭКГ будет выполнена до начала исследования

Среднее количество мочеиспусканий/24 ч и уменьшение с течением времени - популяция для оценки эффективности

Визит		Плацебо	hMaxi-K			
			16000 мкг	24000 мкг	Все дозы	
Визит 1А (скрининг)	n	4	6	3	9	
	Среднее количество мочеиспусканий (SD)	10,46 (3,48)	11,99 (3,65)	17,39 (5,22)	13,79 (4,73)	
Визит 2 (исходный уровень)	n	4	6	3	9	
	Среднее количество мочеиспусканий (SD)	10,18 (4,78)	11,26 (2,70)	17,19 (7,07)	13,24 (5,08)	
Визит 3 (неделя 1)	n	4	6	3	9	
	Среднее количество мочеиспусканий (SD)	11,59 (4,98)	9,10 (2,12)	14,46 (3,74)	10,89 (3,67)	
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	1,41 (0,78)	-2,16 (1,80)	-2,73 (7,29)	-2,35 (3,92)	
	SEM	0,39	0,73	4,21	1,31	
	Значение <i>p</i> [1]	0,251	0,052	0,074	0,018	
	Значение <i>p</i> [2]		0,044	0,047	0,027	
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо			-3,57	-4,14	-3,86
	95% CI			-7,01, -0,13	-8,22, -0,07	-7,12, -0,59
Визит 4 (неделя 2)	n	4	6	3	9	
	Среднее количество мочеиспусканий	10,68 (4,10)	8,35 (2,65)	13,52 (1,94)	10,07 (3,47)	

	(SD)				
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	0,51 (1,22)	-2,92 (2,04)	-3,67 (6,48)	-3,17 (3,64)
	SEM	0,61	0,83	3,74	1,21
	Значение <i>p</i> [1]	0,667	0,016	0,026	0,004
	Значение <i>p</i> [2]		0,051	0,046	0,029
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-3,42	-4,17	-3,80
	95% CI		-6,87, 0,02	-8,25, -0,10	-7,06, -0,53
<b>Визит 5 (неделя 4)</b>	<i>n</i>	4	6	3	9
	Среднее количество мочеиспусканий (SD)	11,40 (4,42)	8,87 (2,25)	13,48 (1,08)	10,40 (2,96)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	1,22 (0,69)	-2,40 (2,11)	-3,71 (7,27)	-2,84 (4,05)
	SEM	0,35	0,86	4,20	1,35
	Значение <i>p</i> [1]	0,315	0,035	0,025	0,006
	Значение <i>p</i> [2]		0,042	0,024	0,017
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-3,62	-4,93	-4,28
	95% CI		-7,06, -0,17	-9,01, -0,86	-7,54, -1,01
			<b>hMaxi-K</b>		
<b>Визит</b>		<b>Плацебо</b>	<b>16000 мкг</b>	<b>24000 мкг</b>	<b>Все дозы</b>
<b>Визит 6 (неделя 8)</b>	<i>n</i>	4	6	3	9
	Среднее количество мочеиспусканий (SD)	10,17 (3,89)	9,48 (2,73)	13,52 (2,19)	10,83 (3,15)
	Изменение среднего	-0,01 (1,20)	-1,79 (2,15)	-3,67 (7,75)	-2,41 (4,33)

	значения относительно исходного уровня (SD)				
	SEM	0,60	0,88	4,47	1,44
	Значение <i>p</i> [1]	0,996	0,094	0,026	0,011
	Значение <i>p</i> [2]		0,261	0,071	0,090
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-1,78	-3,66	-2,72
	95% CI		-5,22, 1,66	-7,74, 0,41	-5,99, 0,55
<b>Визит 7 (неделя 12)</b>	<i>n</i>	4	6	3	9
	Среднее количество мочеиспусканий (SD)	10,96 (4,30)	10,21 (4,11)	12,90 (2,35)	11,11 (3,71)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	0,79 (1,67)	-1,05 (2,90)	-4,29 (6,97)	-2,13 (4,47)
	SEM	0,84	1,18	4,02	1,49
	Значение <i>p</i> [1]	0,509	0,293	0,013	0,012
	Значение <i>p</i> [2]		0,248	0,022	0,041
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-1,83	-5,07	-3,45
	95% CI		-5,28, 1,61	-9,15, -1,00	-6,72, -0,19
<b>Визит 8 (окончательный визит – неделя 24)</b>	<i>n</i>	4	6	3	9
	Среднее количество мочеиспусканий (SD)	11,14 (4,81)	9,74 (3,04)	13,86 (3,02)	11,11 (3,51)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	0,96 (0,99)	-1,52 (2,55)	-3,33 (7,06)	-2,13 (4,16)
	SEM	0,50	1,04	4,08	1,39
	Значение <i>p</i> [1]	0,421	0,142	0,038	0,019
	Значение <i>p</i> [2]		0,131	0,041	0,044
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-2,49	-4,30	-3,39
	95% CI		-5,93, 0,96	-8,37, -0,22	-6,66, -0,13

[1]: Значение *p* для проверки наличия статистически достоверной разницы между значениями, измеренными в определенной временной точке, относительно измеренного значения исходного уровня для определенного лечения

[2]: Значение *p* для проверки наличия статистически достоверной разницы между изменениями

относительно исходного уровня по сравнению с плацебо

Все значения  $p$  и оценки получены с использованием линейной модели смешанных эффектов с количеством мочеиспусканий в качестве зависимых переменных, вариантов лечения (плацебо, 16000 мкг, 24000 мкг и общего hMaxi-K), временных точек и взаимозависимости времени и лечения. Все дозы=все дозы hMaxi-K.

SD=стандартное отклонение; SEM=стандартная ошибка среднего значения.

Таблица 8

Среднее количество эпизодов ургентности/24 ч и уменьшение с течением времени - популяция для оценки эффективности

Визит		hMaxi-K			
		Плацебо	16000 мкг	24000 мкг	Все дозы
Визит 1А (скрининг)	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентности (SD)	10,04 (3,80)	11,12 (4,08)	17,27 (5,33)	13,17 (5,19)
Визит 2 (исходный уровень)	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентности (SD)	9,82 (5,17)	10,21 (3,55)	17,19 (7,07)	12,53 (5,71)
Визит 3 (неделя 1)	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентности (SD)	11,27 (5,25)	7,89 (3,11)	14,46 (3,74)	10,08 (4,51)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	1,45 (0,83)	-2,31 (2,17)	-2,73 (7,29)	-2,45 (4,03)
	SEM	0,42	0,88	4,21	1,34
	Значение $p$ [1]	0,240	0,040	0,074	0,016
	Значение $p$ [2]		0,036	0,046	0,024
	Различия средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-3,76	-4,18	-3,97
	95% CI		-7,20, -0,32	-8,25, -0,11	-7,23, -0,71
Визит 4 (неделя 2)	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентности (SD)	10,22 (4,49)	7,17 (3,35)	13,52 (1,94)	9,29 (4,25)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	0,40 (1,03)	-3,04 (2,07)	-3,67 (6,48)	-3,25 (3,64)

	SEM	0,51	0,85	3,74	1,21
	Значение $p$ [1]	0,734	0,013	0,026	0,004
	Значение $p$ [2]		0,050	0,050	0,030
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-3,43	-4,07	-3,75
	95% CI		-6,87, 0,01	-8,14, 0,00	-7,01, -0,49
<b>Визит 5 (неделя 4)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентности (SD)	11,04 (4,75)	7,87 (3,92)	13,48 (1,08)	9,74 (4,22)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	1,22 (0,69)	-2,34 (2,07)	-3,71 (7,27)	-2,80 (4,04)
	SEM	0,35	0,84	4,20	1,35
	Значение $p$ [1]	0,315	0,038	0,025	0,007
	Значение $p$ [2]		0,044	0,024	0,018
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-3,56	-4,93	-4,25
	95% CI		-7,00, -0,12	-9,00, -0,86	-7,51, -0,98

<b>Визит 6 (неделя 8)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентности (SD)	9,60 (4,45)	8,32 (4,40)	13,52 (2,19)	10,05 (4,48)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	-0,22 (0,89)	-1,89 (2,07)	-3,67 (7,75)	-2,48 (4,30)
	SEM	0,45	0,85	4,47	1,43
	Значение <i>p</i> [1]	0,851	0,079	0,026	0,010
	Значение <i>p</i> [2]		0,289	0,085	0,106
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-1,67	-3,45	-2,56
	95% CI		-5,11, 1,77	-7,52, 0,62	-5,82, 0,71
<b>Визит 7 (неделя 12)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентности (SD)	10,86 (4,35)	10,00 (4,31)	12,86 (2,38)	10,95 (3,88)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	1,04 (2,15)	-0,21 (2,41)	-4,33 (7,05)	-1,58 (4,51)
	SEM	1,07	0,99	4,07	1,50
	Значение <i>p</i> [1]	0,389	0,829	0,013	0,025
	Значение <i>p</i> [2]		0,421	0,017	0,048
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-1,24	-5,37	-3,31
	95% CI		-4,68, 2,20	-9,44, -1,30	-6,57, -0,04
<b>Визит 8</b>	n	4	6	3	9

<b>(окончательный визит) (неделя 24)</b>	Среднее количество эпизодов ургентности (SD)	10,89 (4,99)	9,29 (3,53)	13,86 (3,02)	10,81 (3,91)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	1,07 (1,18)	-0,92 (2,27)	-3,33 (7,06)	-1,72 (4,14)
	SEM	0,59	0,92	4,08	1,38
	Значение <i>p</i> [1]	0,373	0,350	0,037	0,032
	Значение <i>p</i> [2]		0,213	0,038	0,054
	Различия средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-1,99	-4,40	-3,20
	95% CI		-5,43, 1,45	-8,47, -0,33	-6,46, 0,06

[1]: Значение *p* для проверки наличия статистически достоверной разницы между значениями, измеренными в определенной временной точке, относительно измеренного значения исходного уровня для определенного лечения

[2]: Значение *p* для проверки наличия статистически достоверной разницы между изменениями относительно исходного уровня по сравнению с плацебо

Все значения *p* и оценки получены с использованием линейной модели смешанных эффектов с количеством мочеиспусканий в качестве зависимых переменных, вариантов лечения (плацебо, 16000 мкг, 24000 мкг и общего hMaxi-K), временных точек и взаимозависимости времени и лечения

Все дозы=все дозы hMaxi-K

SD=стандартное отклонение; SEM=стандартная ошибка среднего значения

Таблица 9

Количество эпизодов ургентного недержания и уменьшение с течением времени - популяция для оценки эффективности

Визит		hMaxi-K			
		Плацебо	16000 мкг	24000 мкг	Все дозы
<b>Визит 1А (скрининг)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентного недержания/24 часа (SD)	1,88 (1,25)	2,08 (0,57)	8,69 (12,02)	4,29 (6,87)
<b>Визит 2 (исходный уровень)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентного недержания/24 часа (SD)	1,82 (1,52)	1,91 (0,83)	3,81 (3,30)	2,54 (2,01)

<b>Визит 3 (неделя 1)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентного недержания/24 часа (SD)	1,43 (1,32)	1,29 (1,08)	2,74 (0,25)	1,77 (1,13)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	-0,39 (0,22)	-0,63 (0,74)	-1,07 (3,15)	-0,78 (1,69)
	SEM	0,11	0,30	1,82	0,56
	Значение <i>p</i> [1]	0,460	0,164	0,103	0,045
	Значение <i>p</i> [2]		0,718	0,395	0,470
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-0,24	-0,68	-0,46
	95% CI		-1,75, 1,27	-2,47, 1,10	-1,89, 0,97
<b>Визит 4 (неделя 2)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентного недержания/24 часа (SD)	1,23 (1,27)	0,86 (1,09)	2,95 (1,35)	1,56 (1,51)
	Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)	-0,58 (0,81)	-1,05 (1,39)	-0,86 (2,60)	-0,99 (1,70)
	SEM	0,40	0,57	1,50	0,57
	Значение <i>p</i> [1]	0,277	0,035	0,177	0,029
	Значение <i>p</i> [2]		0,487	0,728	0,559
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-0,47	-0,27	-0,37
	95% CI		-1,98, 1,04	-2,06, 1,51	-1,80, 1,06

<b>Визит 5 (неделя 4)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентного	1,14 (0,95)	0,66 (0,81)	3,10 (2,08)	1,47 (1,72)
	Изменение среднего значения относительно	-0,67 (0,98)	-1,25 (1,16)	-0,71 (1,76)	-1,07 (1,30)
	SEM	0,49	0,48	1,01	0,43
	Значение <i>p</i>	0,216	0,017	0,251	0,026
	Значение <i>p</i>		0,393	0,958	0,623
	Различие средних значений,		-0,58	-0,04	-0,31
	95% CI		-2,09, 0,93	-1,83, 1,74	-1,74, 1,12
<b>Визит 6 (неделя 8)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентного	1,02 (1,15)	0,50 (0,92)	2,57 (2,13)	1,19 (1,66)
	Изменение среднего значения относительно	-0,79 (0,49)	-1,41 (1,21)	-1,24 (1,67)	-1,35 (1,27)
	SEM	0,25	0,49	0,97	0,42
	Значение <i>p</i>	0,153	0,010	0,067	0,007
	Значение <i>p</i>		0,363	0,573	0,407
	Различие средних значений,		-0,62	-0,45	-0,53
	95% CI		-2,13, 0,89	-2,23, 1,34	-1,97, 0,90
<b>Визит 7 (неделя 12)</b>	n	4	6	3	9
	Среднее количество эпизодов ургентного	1,25 (1,09)	0,64 (0,75)	3,29 (2,27)	1,52 (1,84)
	Изменение среднего значения относительно	-0,57 (0,71)	-1,27 (1,17)	-0,52 (1,57)	-1,02 (1,27)
	SEM	0,35	0,48	0,90	0,42
	Значение <i>p</i>	0,290	0,016	0,389	0,037
	Значение <i>p</i>		0,306	0,958	0,601
	Различие средних значений,		-0,70	0,04	-0,33
	95% CI		-2,21, 0,81	-1,74, 1,83	-1,76, 1,10

Визит 8 (окончательный визит) (неделя 24)	n	4	6	3	9
Среднее количество эпизодов ургентного недержания/24 часа (SD)		0,86 (0,76)	0,62 (0,84)	1,52 (1,39)	0,92 (1,06)
Изменение среднего значения относительно исходного уровня (SD)		-0,96 (0,94)	-1,29 (1,10)	-2,29 (2,72)	-1,62 (1,69)
SEM		0,47	0,45	1,57	0,56
Значение <i>p</i> [1]		0,094	0,015	0,005	0,001
Значение <i>p</i> [2]			0,616	0,122	0,212
Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо			-0,34	-1,33	-0,83
95% CI			-1,84, 1,17	-3,11, 0,46	-2,26, 0,60

[1]: Значение *p* для проверки наличия статистически достоверной разницы между значениями, измеренными в определенной временной точке, относительно измеренного значения исходного уровня для определенного лечения

[2]: Значение *p* для проверки наличия статистически достоверной разницы между изменениями относительно исходного уровня по сравнению с плацебо

Все значения *p* и оценки получены с использованием линейной модели смешанных эффектов с количеством мочеиспусканий в качестве зависимых переменных, вариантов лечения (плацебо, 16000 мкг, 24000 мкг и общего hMaxi-K), временных точек и взаимозависимости времени и лечения  
Все дозы = все дозы hMaxi-K

SD=стандартное отклонение; SEM=стандартная ошибка среднего значения

Таблица 10

Восприятие участниками ответа на лечение - популяция для оценки эффективности

		Плацибо, n (%)	hMaxi-K, n (%)		
		Плацибо	16000 мкг	24000 мкг	Все дозы
<b>V3 (N=13)</b>	Отсутствие положительного эффекта	3 (75,00)	1 (16,67)	0	1 (11,11)
	Имеется небольшой положительный эффект	1 (25,00)	1 (16,67)	3 (100,0)	4 (44,44)
	Имеется существенный положительный эффект	0	4 (66,67)	0	4 (44,44)
	Значение $p$		0,1429	0,1429	0,0190
	<b>V4 (N=13)</b>	Отсутствие положительного эффекта	3 (75,00)	1 (16,67)	0
	Имеется небольшой положительный эффект	1 (25,00)	1 (16,67)	2 (66,67)	3 (33,33)
	Имеется существенный положительный эффект	0	4 (66,67)	1 (33,33)	5 (55,56)
	Значение $p$		0,1429	0,2286	0,1202
<b>V5 (N=13)</b>	Отсутствие положительного эффекта	3 (75,00)	1 (16,67)	0	1 (11,11)
	Имеется небольшой положительный эффект	1 (25,00)	0	2 (66,67)	2 (22,22)
	Имеется существенный положительный эффект	0	5 (83,33)	1 (33,33)	6 (66,67)
	Значение $p$		0,0238	0,2286	0,0126
<b>V6 (N=13)</b>	Отсутствие положительного эффекта	3 (75,00)	1 (16,67)	0	1 (11,11)
	Имеется небольшой положительный эффект	1 (25,00)	2 (33,33)	2 (66,67)	4 (44,44)
	Имеется существенный положительный эффект	0	3 (50,00)	1 (33,33)	4 (44,44)
	Значение $p$		0,2286	0,2286	0,2727
<b>V7 (N=13)</b>	Отсутствие положительного эффекта	3 (75,00)	2 (33,33)	0	2 (22,22)
	Имеется небольшой положительный эффект	1 (25,00)	1 (16,67)	2 (66,67)	3 (33,33)
	Имеется существенный положительный эффект	0	3 (50,00)	1 (33,33)	4 (44,44)
	Значение $p$		0,2857	0,2286	0,2727
<b>V8 (N=13)</b>	Отсутствие положительного эффекта	3 (75,00)	2 (33,33)	0	2 (22,22)
	Имеется небольшой	1 (25,00)	1 (16,67)	2 (66,67)	3 (33,33)

	положительный эффект				
	Имеется существенный положительный эффект	0	3 (50,00)	1 (33,33)	4 (44,44)
	Значение $p$		0,2857	0,2286	0,2727

Примечание: значения  $p$  являются номинальными и относятся к тесту хи-квадрат для определения того, различается ли восприятие ответа на лечение у пациентов, получавших лечение, и пациентов, получавших плацебо

Все дозы = все дозы hMaxi-K

Таблица 11

Изменение среднего количества эпизодов ургентного недержания за 24 ч -популяция для оценки эффективности

Визит		Плацебо	hMaxi-K		
			16000 мкг	24000 мкг	Все дозы
Эпизоды ургентного недержания за 24 часа					
Визит 1А	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	1,88 (1,25)	2,08 (0,57)	8,69 (12,02)	4,29 (6,87)
Визит 2	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	1,82 (1,52)	1,91 (0,83)	3,81 (3,30)	2,54 (2,01)
Визит 3	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	1,43 (1,32)	1,29 (1,08)	2,74 (0,25)	1,77 (1,13)
Визит 4	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	1,23 (1,27)	0,86 (1,09)	2,95 (1,35)	1,56 (1,51)
Визит 5	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	1,14 (0,95)	0,66 (0,81)	3,10 (2,08)	1,47 (1,72)
Визит 6	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	1,02 (1,15)	0,50 (0,92)	2,57 (2,13)	1,19 (1,66)

Визит 7	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	1,25 (1,09)	0,64 (0,75)	3,29 (2,27)	1,52 (1,84)
Визит 8 (окончательный визит)	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	0,86 (0,76)	0,62 (0,84)	1,52 (1,39)	0,92 (1,06)
Изменение относительно исходного уровня V2					
Визит 3	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	-0,39 (0,22)	-0,63 (0,74)	-1,07 (3,15)	-0,78 (1,69)
	Значение p [1]	0,460	0,164	0,103	0,045
	Значение p [2]		0,718	0,395	0,470
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-0,24	-0,68	-0,46
	95% CI		-1,75, 1,27	-2,47, 1,10	-1,89, 0,97
	Значение p [3]			0,545	
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, для 24000 мкг относительно 16000 мкг			-0,44	
	95% CI			-2,10, 1,21	

Визит 4	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	-0,58 (0,81)	-1,05 (1,39)	-0,86 (2,60)	-0,99 (1,70)
	Значение p [1]	0,277	0,035	0,177	0,029
	Значение p [2]		0,487	0,728	0,559
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-0,47	-0,27	-0,37
	95% CI		-1,98, 1,04	-2,06, 1,51	-1,80, 1,06
	Значение p [3]			0,789	
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, для 24000 мкг относительно 16000 мкг			0,19	
	95% CI			-1,46, 1,85	
Визит 5	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	-0,67 (0,98)	-1,25 (1,16)	-0,71 (1,76)	-1,07 (1,30)
	Значение p [1]	0,216	0,017	0,251	0,026
	Значение p [2]		0,393	0,958	0,623
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-0,58	-0,04	-0,31

	95% CI		-2,09, 0,93	-1,83, 1,74	-1,74, 1,12
	Значение p [3]			0,465	
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, для 24000 мкг относительно 16000 мкг			0,54	
	95% CI			-1,11, 2,19	
Визит 6	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	-0,79 (0,49)	-1,41 (1,21)	-1,24 (1,67)	-1,35 (1,27)
	Значение p [1]	0,153	0,010	0,067	0,007
	Значение p [2]		0,363	0,573	0,407
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-0,62	-0,45	-0,53
	95% CI		-2,13, 0,89	-2,23, 1,34	-1,97, 0,90
	Значение p [3]			0,810	
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, для 24000 мкг относительно 16000 мкг			0,17	
95% CI			-1,48, 1,83		

Визит 7	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	-0,57 (0,71)	-1,27 (1,17)	-0,52 (1,57)	-1,02 (1,27)
	Значение p [1]	0,290	0,016	0,389	0,037
	Значение p [2]		0,306	0,958	0,601
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-0,70	0,04	-0,33
	95% CI		-2,21, 0,81	-1,74, 1,83	-1,76, 1,10
	Значение p [3]			0,321	
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, для 24000 мкг относительно 16000 мкг			0,75	
	95% CI			-0,91, 2,40	
Визит 8 (окончательный визит)	n	4	6	3	9
	Среднее значение (SD)	-0,96 (0,94)	-1,29 (1,10)	-2,29 (2,72)	-1,62 (1,69)
	Значение p [1]	0,094	0,015	0,005	0,001
	Значение p [2]		0,616	0,122	0,212
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, относительно плацебо		-0,34	-1,33	-0,83
	95% CI		-1,84, 1,17	-3,11, 0,46	-2,26, 0,60
	Значение p [3]			0,199	
	Различие средних значений, определенных методом наименьших квадратов, для 24000 мкг относительно 16000 мкг			-0,99	
	95% CI			-2,65, 0,66	

[1]: Значение p для проверки наличия статистически достоверной разницы между значениями, измеренными в определенной временной точке, относительно измеренного значения исходного уровня для определенного лечения

[2]: Значение p для проверки наличия статистически достоверной разницы между изменениями относительно исходного уровня по сравнению с плацебо

[3]: Значение p для проверки наличия разницы между группой, получавшей 24000 мкг, и груп-

пой, получавшей 16000 мкг

Все значения  $p$  и оценки получены с использованием линейной модели смешанных эффектов с количеством мочеиспусканий за 24 ч в качестве зависимых переменных, вариантов лечения (плацебо, 16000 мкг, 24000 мкг и общего hMaxi-K), временных точек и взаимозависимости времени и лечения

Таблица 12

Изменение веса (г) во время 72-часового теста с прокладкой -популяция  
для оценки безопасности

Визит		hMaxi-K			
		Плацебо	16000 мкг	24000 мкг	Все дозы
Визит 1А, скрининг	n	3	6	3	9
	Средний (SD) вес в 72-часовом	29,33 (20,03)	345,00 (726,50)	611,67 (703,53)	433,89 (686,58)
Визит 2, исходный	n	4	6	3	9
	Средний (SD) вес в 72-часовом	259,25 (417,95)	314,00 (663,23)	677,33 (643,96)	435,11 (641,56)
Визит 3 (неделя 1)	n	4	6	3	9
	Средний (SD) вес в 72-часовом	133,50 (206,99)	241,67 (541,39)	518,03 (499,37)	333,79 (514,42)
	Изменение среднего значения (SD) веса	-125,75 (211,14)	-72,33 (123,08)	-159,30 (144,90)	-101,32 (128,87)
	Значение $p$ [1]	0,044	0,127	0,024	0,013
	Значение $p$ [2]		0,446	0,598	0,937
	Различие средних значений,		53,42	-43,14	5,14
	95% CI		-102,87, 209,70	-228,08, 141,80	-143,13, 153,41
Визит 4 (неделя 2)	n	4	6	3	9
	Средний (SD) вес в 72-часовом	119,00 (177,72)	231,83 (509,77)	528,00 (501,86)	330,56 (497,30)
	Изменение среднего значения (SD) веса	-140,25 (242,66)	-82,17 (155,66)	-149,33 (142,12)	-104,56 (146,02)
	Значение $p$ [1]	0,029	0,090	0,031	0,013
	Значение $p$ [2]		0,409	0,818	0,762
	Различие средних значений,		58,08	-18,67	19,71
	95% CI		-98,20, 214,37	-203,61, 166,27	-128,57, 167,98
Визит 5 (неделя 4)	n	4	6	3	9
	Средний (SD) вес в 72-часовом	100,75 (84,24)	212,00 (485,13)	494,67 (508,22)	306,22 (481,29)
	Изменение среднего значения (SD) веса	-158,50 (345,31)	-102,00 (179,22)	-182,67 (153,16)	-128,89 (166,03)
	Значение $p$ [1]	0,017	0,045	0,014	0,005
	Значение $p$ [2]		0,421	0,679	0,861
	Различие средних значений,		56,50	-33,76	11,37
	95% CI		-99,79, 212,79	-218,69, 151,18	-136,90, 159,64
Визит 6 [3] (неделя 8)	n	4	6	3	9
	Средний (SD) вес в 72-часовом	164,00 (272,19)	186,33 (427,25)	489,33 (425,48)	287,33 (426,96)
	Изменение среднего значения (SD) веса	-95,25 (145,96)	-127,67 (236,90)	-188,00 (361,87)	-147,78 (262,15)
	Значение $p$ [1]	0,105	0,018	0,012	0,003
	Значение $p$ [2]		0,639	0,232	0,318
	Различие средних значений,		-32,42	-102,34	-67,38
	95% CI		-188,70, 123,87	-287,28, 82,60	-215,65, 80,89

<b>Визит 7 [3]</b> (неделя 12)	п	4	6	3	9
	Средний (SD) вес в 72-часовом тесте с	177,50 (307,75)	307,50 (709,54)	545,3 (621,50)	386,78 (652,19)
	Изменение среднего значения (SD) веса	-81,75 (110,34)	-6,50 (52,31)	-191,00 (159,81)	-52,63 (113,57)
	Значение <i>p</i> [1]	0,154	0,881	0,224	0,256
	Значение <i>p</i> [2]		0,292	0,860	0,671
	Различие средних значений,		75,25	-16,46	29,40
	95% CI		-81,04, 231,54	-228,54, 195,63	-127,70, 186,49
<b>Визит 8 [3]</b> (неделя 24)	п	4	6	3	9
	Средний (SD) вес в 72-часовом тесте с	85,00 (126,10)	225,00 (520,04)	596,67 (528,52)	348,89 (522,87)
	Изменение среднего значения (SD) веса	-174,25 (293,32)	-89,00 (145,01)	-80,67 (189,03)	-86,22 (148,64)
	Значение <i>p</i> [1]	0,011	0,071	0,171	0,042
	Значение <i>p</i> [2]		0,238	0,318	0,219
	Различие средних значений,		85,25	83,99	84,62
	95% CI		-71,04, 241,54	-100,94, 268,93	-63,65, 232,89

[1]: Значение *p* для проверки наличия статистически достоверной разницы между значениями, измеренными в определенной временной точке, относительно измеренного значения исходного уровня для определенного лечения

[2]: Значение *p* для проверки наличия статистически достоверной разницы между изменениями относительно исходного уровня по сравнению с плацебо

[3]: Результаты включают значение 0 для пациента 002019, результаты для которого были неправильно введены в базу данных. Результаты проверены исследовательским центром и CRA

Все значения *p* и оценки получены с использованием линейной модели смешанных эффектов со значениями веса, полученными в ходе 72-часового теста с прокладкой, в качестве зависимых переменных, вариантов лечения (плацебо, 16000 мкг, 24000 мкг и общего hMaxi-K), временных точек и взаимозависимости времени и лечения

Все дозы=все дозы hMaxi-K, SD=стандартное отклонение

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или уменьшения выраженности признака или симптома синдрома гиперактивного мочевого пузыря или гиперактивности детрузора у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту единичной стандартной дозы фармацевтической композиции, содержащей вектор, содержащий открытую рамку считывания (ORF), кодирующую белок hSlo в соответствии с SEQ ID NO: 8 или его мутант, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 8, в которой Т в положении 352 заменен на S, где единичная стандартная доза представляет собой внутримышечную стандартную дозу по меньшей мере 45000 мкг  $\pm$ 15% вектора, изготовленного для внутримышечного введения в мышцу детрузора субъекта.

2. Способ по п.1, где фармацевтическую композицию вводят в мышцу детрузора путем прямой инъекции.

3. Способ по п.1, где введение единичной стандартной дозы фармацевтической композиции, как она определена в п.1, субъекту значительно уменьшает число эпизодов мочеиспускания относительно плацебо или исходных уровней в течение по меньшей мере 6 месяцев после введения единичной стандартной дозы.

4. Способ по п.1, где введение единичной стандартной дозы фармацевтической композиции, как она определена в п.1, субъекту значительно уменьшает число эпизодов urgency относительно плацебо или исходных уровней в течение по меньшей мере 6 месяцев после введения единичной стандартной дозы.

5. Способ по п.1, где стандартная доза содержит 20-25% сахарозы в солевом растворе.

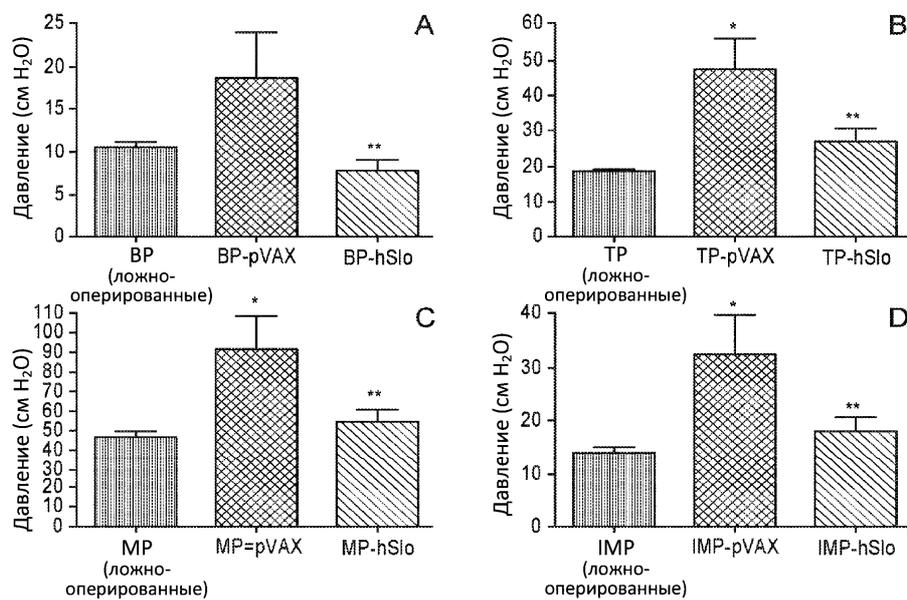
6. Способ по п.1, где стандартная доза содержит 10-30% (об./об.) сахарозы.

7. Способ по п.6, где сахароза составляет приблизительно 20% (об./об.).

8. Способ по п.2, где прямую инъекцию проводят в 20-30 участков инъекции, расположенных примерно на расстоянии 1 см друг от друга  $\pm$ 15%, и где признак или симптом синдрома гиперактивного мочевого пузыря представляет собой urgency недержание мочи.

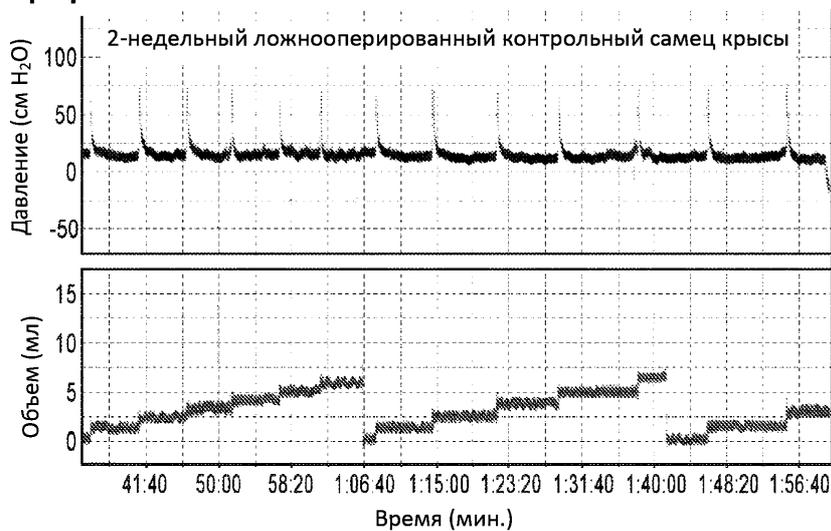
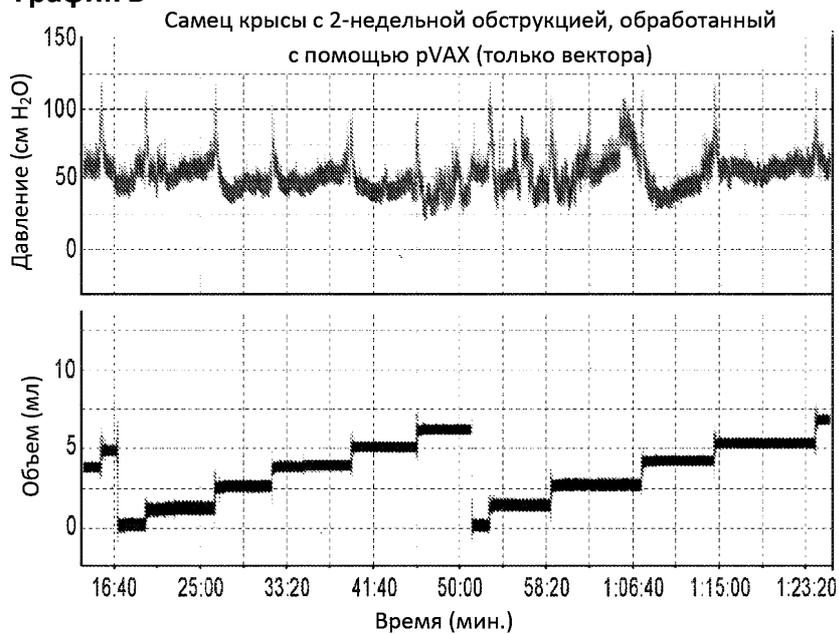
9. Способ по п.1, где вектор включает плазмиду, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусный вектор или липосому.

Графическое представление влияния 2-недельной обструкции на соответствующие параметры мочеиспускания в двух группах лечения относительно ложнооперированных контрольных крыс одной возрастной группы. На панелях А-Д представлены данные, обобщенные в табл. 3



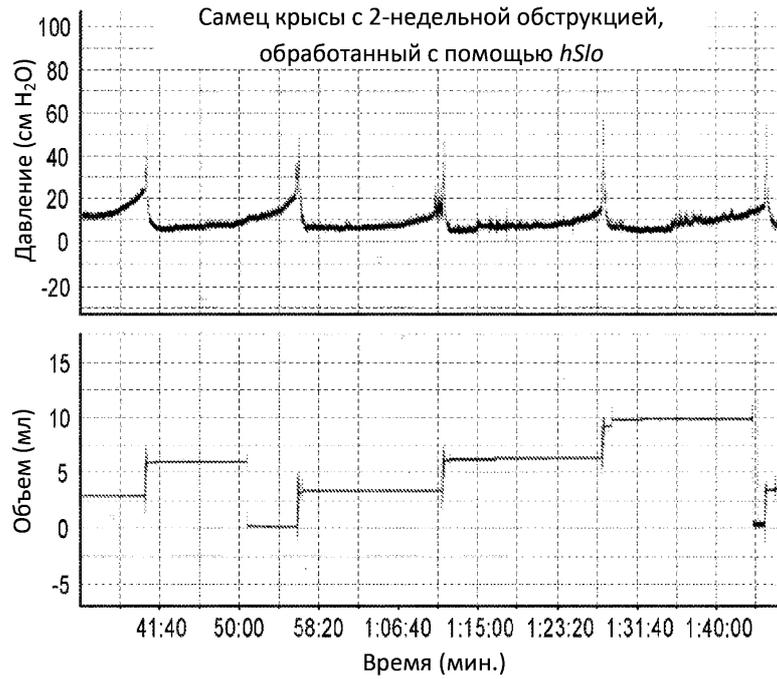
Фиг. 1

Репрезентативные примеры цистометрических показателей, которые регистрировали в течение примерно 1 ч, полученные от отдельных крыс в каждой группе лечения

**График А****График В**

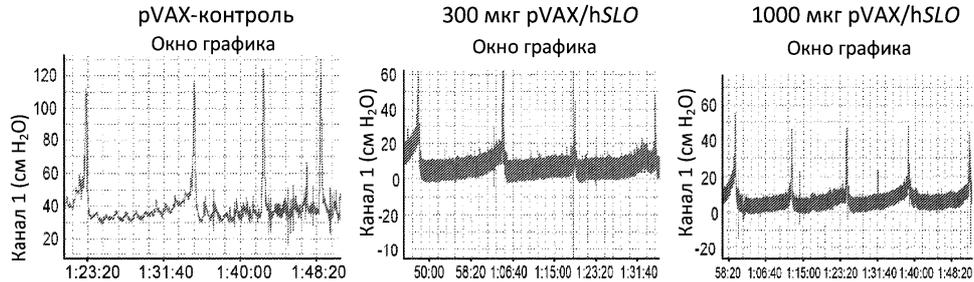
Фиг. 2 (А, В)

## График С



Фиг. 2 (С)

Репрезентативные графики регистрации данных цистометрии у крыс, получавших только вектор (pVAX) и 300 и 1000 мкг pVAX/hSLO

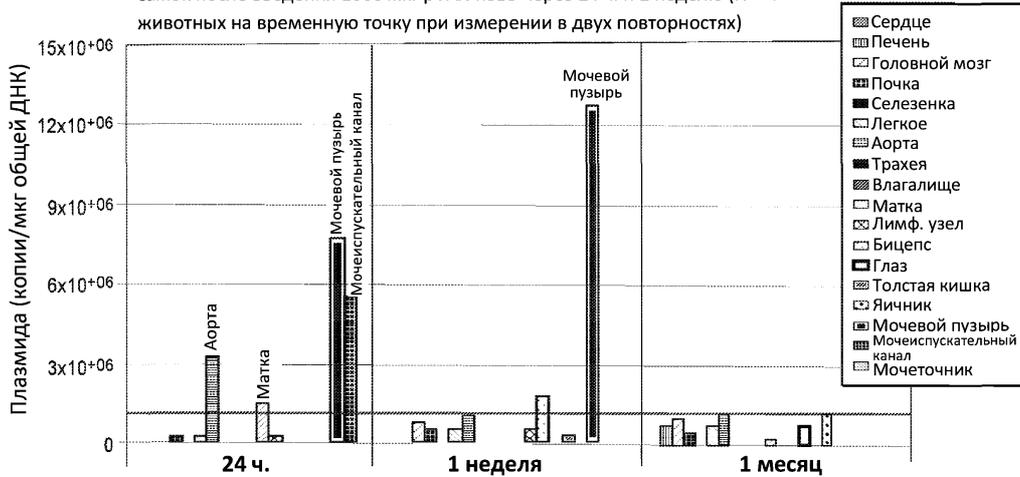


Следует обратить внимание на регулярное периодическое опорожнение и почти полное отсутствие флуктуаций давления между мочеиспусканиями у подвергнутых обработке животных.

Фиг. 3

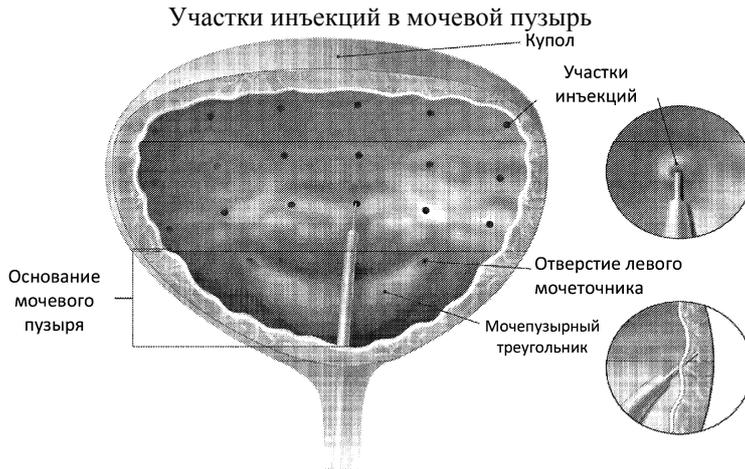
Биораспределение hMaxi-k

**Биораспределение:** среднее число копий плазмиды/мкг общей ДНК в тканях самок после введения 1000 мкг pVAX-hSLO через 24 ч. и 1 неделю (N = 4 животных на временную точку при измерении в двух повторностях)



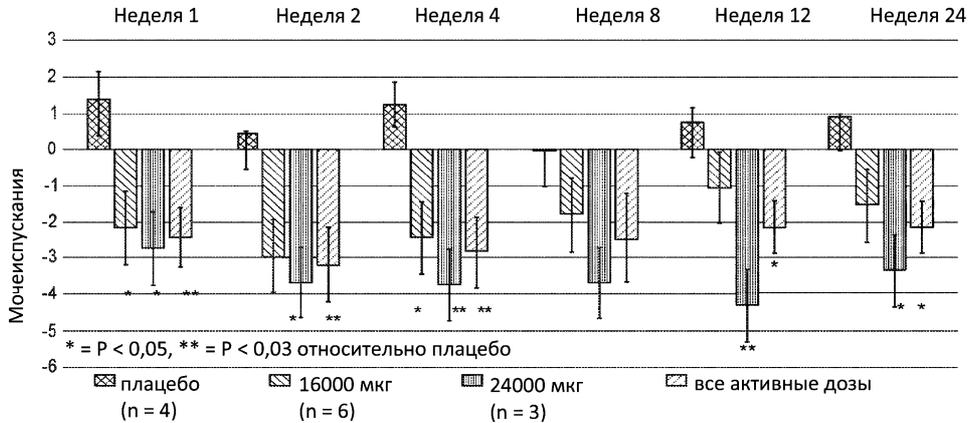
Примечание: фоновое значение для контрольной ткани (животные, которые не получали инъекцию pVAX-hSLO, среднее значение для 39 тканей) составляло  $8,9 \times 10^{-3}$  нг плазмиды/мкг общей ДНК при верхнем значении, составляющем  $8 \times 10^{-2}$  нг/мкг общей ДНК. Таким образом, только значения, превышающие  $9,6 \times 10^5$  копий/мкг общей ДНК, рассматривали как превышающие значения для контрольных животных (показаны с помощью красной линии)

Фиг. 4



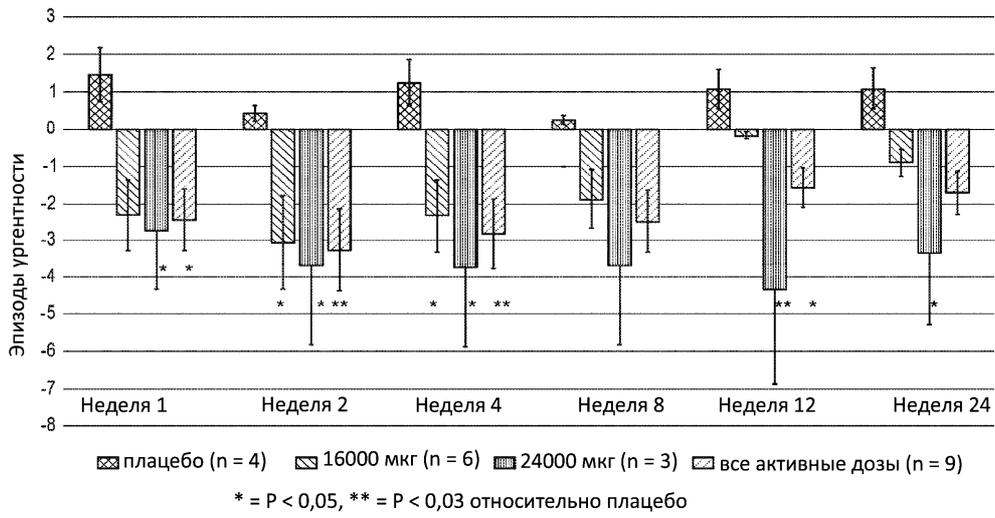
Фиг. 5

Обусловленное лечением изменение среднего числа мочеиспусканий в день с течением времени (популяция для оценки эффективности)

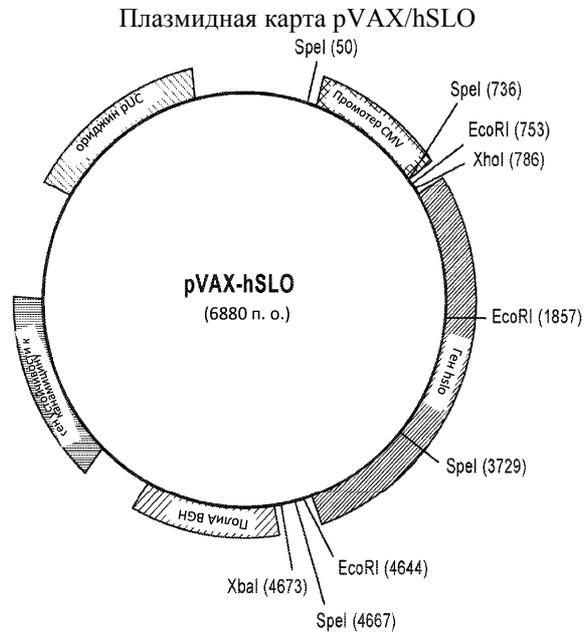


Фиг. 6

Обусловленное лечением изменение среднего числа эпизодов ургентности в день с течением времени (популяция для оценки эффективности)



Фиг. 7



Фиг. 8

