

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046740**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.17**
- (21) Номер заявки  
**202193185**
- (22) Дата подачи заявки  
**2020.07.17**
- (51) Int. Cl. **A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 38/55** (2006.01)

(54) **ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ СЕРДЦА С ПРИМЕНЕНИЕМ AAV ДЛЯ КАРДИОМИОПАТИИ У ЛЮДЕЙ**

- (31) **62/876,540**
- (32) **2019.07.19**
- (33) **US**
- (43) **2022.05.17**
- (86) **PCT/US2020/042663**
- (87) **WO 2021/016126 2021.01.28**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ФЛОРИДА  
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШН,  
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)**
- (56) **US-A1-20100190840**  
**WO-A2-2017191274**  
**WO-A2-0202148**  
**US-A1-20130012455**  
**DONATH et al.: "Apoptosis Repressor With  
Caspase Recruitment Domain Is Required for  
Cardioprotection in Response to Biomechanical and  
Ischemic Stress," Circulation, 27 February 2006  
(27.02.2006), Vol. 113, Iss. 9, Pgs. 1203-1212, entire  
document**  
**WO-A1-2019237067**
- (72) Изобретатель:  
**Суини Хью Ли (US)**
- (74) Представитель:  
**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Христофоров А.А.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова  
М.Ю., Парамонова К.В., Прищепный  
С.В., Джермакян Р.В. (RU)**

- (57) Изобретение относится к композициям и способам, полезным в лечении болезней сердца. Раскрытые композиции и способы основаны на средствах для генной терапии, содержащих вектор на основе рекомбинантного AAV для доставки двух или больше трансгенов в сердце субъекта-человека, причем трансгены содержат белок S100A1 и ингибитор апоптоза в виде сердечного репрессора апоптоза с доменом рекрутинга каспазы (сARC). В соответствии с различными вариантами осуществления композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, содержат векторы, содержащие последовательности кДНК S100A1 и/или сARC, которые являются оптимизированными по кодону для экспрессии у людей. В соответствии с некоторыми аспектами целенаправленное воздействие на несколько источников одной или нескольких болезней сердца может обеспечивать синергические благоприятные воздействия во время исследования.

**046740**  
**B1**

**046740**  
**B1**

### **Родственные заявки**

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с параграфом 119(e) раздела 35 Кодекса законов США по дате подачи предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/876540, поданной 19 июля 2019 г., имеющей название "Генная терапия сердца с применением AAV для кардиомиопатии у людей", полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Кардиомиопатия является второй по распространенности причиной заболеваний сердца у субъектов, и медицинский контроль вторичных проявлений является единственным возможным методом лечения. Прогноз для пораженных субъектов зависит от стадии заболевания и наследственных факторов. Сердечная деятельность критически зависит от кальций-зависимой передачи сигнала. При заболевании сердца нарушение функционирования кальциевых каналов внутри клеток сердца способствует аномалиям циклического изменения уровней ионов кальция, что дополнительно подавляет сердечную деятельность. Было показано, что стратегии переноса генов для снижения аномалий циклического изменения уровней ионов кальция ослабляют заболевание сердца в моделях на мелких и крупных животных, а также в клинических испытаниях на людях.

Дилатационная кардиомиопатия (DCM) является наиболее распространенным типом кардиомиопатии у человека, возникающим преимущественно у взрослых в возрасте 20-60 лет. DCM поражает желудочки и предсердия сердца, нижние и верхние камеры сердца, соответственно. Большинство форм DCM представляют собой приобретенные формы в результате ряда причин, которые включают в себя ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда, высокое кровяное давление, сахарный диабет, заболевание щитовидной железы, вирусный гепатит и вирусные инфекции, которые вызывают воспаление сердечной мышцы. К DCM также приводит злоупотребление алкоголем и определенными наркотическими средствами, такими как кокаин и амфетамины, а также по меньшей мере два лекарственных средства, применяемых для лечения рака (доксорубин и даунорубин). Кроме того, существует ряд генетических форм DCM, в том числе, без ограничения, DCM, ассоциированная с мышечными дистрофиями Дюшенна и Беккера. В случае определенных форм мышечной дистрофии Беккера, а также в большинстве случаев мышечной дистрофии Дюшенна кардиомиопатия может в конечном счете ограничивать время дожития у пациента.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

У людей дилатационная кардиомиопатия является наиболее распространенным типом кардиомиопатии и может являться следствием ряда приобретенных, а также унаследованных состояний. Как у собак, так и у других модельных животных, несмотря на то, что истоки заболевания коренятся в дисфункции транспорта кальция, конечное развитие заболевания обусловлено митохондриальной дисфункцией и/или индуцируемым растяжением апоптозом кардиомиоцитов. В то время как воздействие только на транспорт кальция может быть эффективным на ранних стадиях заболевания, воздействие на комбинацию транспорта кальция, митохондриальной дисфункции и апоптоза будет необходимо для лечения всех форм DCM и на всех стадиях развития заболевания.

В настоящем документе раскрыты подходы к доставке генов для лечения субъектов-людей с кардиомиопатией и застойной сердечной недостаточностью. Эти подходы предусматривают экспрессию S100A1 для воздействия на транспорт кальция и экспрессию ARC (репрессор апоптоза с доменом рекрутинга каспазы) для блокирования всех источников апоптоза и нормализации митохондриальной дисфункции. Экспрессия трансгенов S100A1 и ARC с помощью раскрытого подхода с применением самокомплементарного вектора на основе AAV происходит быстро (т.е. в течение нескольких часов), что является критически важным в противодействии эффектам сердечной недостаточности на конечной стадии, и ограничена сердцем. Таким образом, эти подходы воздействуют на все три фактора, стимулирующих возникновение и развитие DCM, и, следовательно, будут применимы к любой форме DCM на любой стадии развития заболевания.

Кроме того, в настоящем документе раскрыт ряд трансгенов для доставки генов, которые кодируют происходящие из человека ARC и S100A1. Эти трансгены могут содержать последовательности кДНК, и эти последовательности можно доставлять и экспрессировать с применением векторной системы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV). Раскрытые последовательности кДНК можно доставлять с использованием любого типа вектора для доставки генов, в том числе, без ограничения, всех форм AAV, лентивирусов, липосом и экзосом.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления эти последовательности могут экспрессироваться с применением самокомплементарного варианта ДНК вектора на основе AAV, который содержит i) ДНК дикого типа или оптимизированную кДНК кодирующую человеческий ARC, и ii) ДНК дикого типа или оптимизированную кДНК, кодирующую человеческий S100A1. Последовательности кДНК ARC и S100A1 могут быть расположены таким образом, чтобы ARC содержал первую кДНК, и S100A1 содержал вторую кДНК в направлении от 5' к 3' или наоборот. В соответствии с другими вариантами осуществления эти последовательности кДНК можно экспрессировать с применением двух промоторов, а не промотора и IRES.

Экспрессия этих последовательностей кДНК может функционально управляться промотором сердечного тропонина Т (сTnT), расположенным со стороны 5'-конца относительно первой кДНК, и/или участком внутренней посадки рибосомы (IRES), расположенным со стороны 5'-конца относительно второй кДНК. Промотор сTnT ограничивает экспрессию двух трансгенов кардиомиоцитами, когда AAV вводят через кровоток в сердце и другие ткани или с помощью непосредственной инъекции. Обеспечиваемая в результате экспрессия ARC предотвращает апоптоз, когда он экспрессируется в кардиомиоцитах, и помогает нормализовать потенциал митохондриальной мембраны, снижая образование свободных радикалов и улучшая функцию митохондрий. Экспрессия S100A1 приводит к улучшенной перекачке кальция в саркоплазматический ретикулум (SR) кардиомиоцитов под действием насоса  $Ca^{2+}$ -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA) (например, изоформы 2a насоса SERCA или SERCA2a) и пониженной утечке кальция из SR через канал рианодинового рецептора. Комбинация обеспечивает возможность нормализации транспорта кальция в кардиомиоцитах и улучшенной систолической и диастолической функции в сердце.

Сочетанные эффекты в виде отсутствия апоптотических эффектов, улучшенной митохондриальной функции и улучшенного транспорта кальция замедляют развитие сердечной недостаточности и улучшают сердечную деятельность. Раскрытые векторы на основе гAAV могут быть эффективными при всех формах кардиомиопатии и сердечной недостаточности у человека. Соответственно, раскрытые векторы на основе гAAV можно доставлять субъекту, например, субъекту-человеку, страдающему от заболевания, нарушения или состояния, включающего слабую сердечную деятельность, например, от кардиомиопатии и сердечной недостаточности у человека.

Соответственно, некоторые аспекты настоящего раскрытия обеспечивают векторы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для доставки трансгенов в сердце субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие векторы на основе гAAV включают в себя по меньшей мере два трансгена, причем один кодирует белок семейства S100, и один кодирует ингибитор апоптоза. Такие векторы на основе гAAV могут включать в себя, в порядке от 5'- к 3'-концу, последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), промотор, функционально связанный с трансгенами, и вторую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления два трансгена являются функционально связанными с одним и тем же промотором. В соответствии с другими вариантами осуществления каждый трансген является функционально связанным с отдельным промотором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV также включает в себя по меньшей мере один сигнал полиаденилирования (например, расположенный со стороны 3'-конца относительно двух трансгенов, экспрессируемых с одного промотора, или со стороны 3'-конца относительно одного или обоих трансгенов, экспрессируемых с отличающихся промоторов). Аспекты настоящего раскрытия обеспечивают вектор на основе нуклеиновой кислоты рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для доставки двух или больше трансгенов в сердце субъекта, причем указанный вектор содержит от 5'- к 3'-концу, последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), два или больше трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или больше трансгенами, сигнал полиаденилирования и последовательность второго инвертированного концевой повтора (ITR) AAV, причем два или больше трансгенов содержат белок семейства S100 и ингибитор апоптоза.

Трансгены согласно настоящему раскрытию могут содержать белок семейства S100 и ингибитор апоптоза. Например, белок семейства S100 может содержать сердечный кальций-связывающий белок S100 A1 (сS100A1) или его вариант. В еще одном примере ингибитор апоптоза может содержать сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутинга каспазы (сARC) или его вариант.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько из трансгенов согласно настоящему раскрытию представляют собой встречающиеся в естественных условиях последовательности или последовательности дикого типа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько трансгенов (например, трансген сARC) являются оптимизированными по кодону для экспрессии у людей.

В соответствии с различными вариантами осуществления в настоящем документе представлены векторы на основе гAAV, содержащие промотор, сигнал полиаденилирования (полиА) и полинуклеотид, содержащий два или больше трансгенов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый трансген кодирует белок семейства S100 (например, сS100A1 или его вариант) и второй трансген кодирует сARC. В соответствии с конкретными вариантами осуществления трансгены белка семейства S100 и сARC происходят из людей.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый трансген (кодирующий белок семейства S100) в полинуклеотиде содержит нуклеотидную последовательность, изложенную в виде SEQ ID NO: 5. В качестве альтернативы, первый трансген может содержать нуклеотидную последовательность, изложенную в виде SEQ ID NO: 8.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый трансген (кодирующий белок семейства S100) может содержать нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере

на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичной любой из SEQ ID NO: 19-21. Первый трансген может содержать нуклеотидную последовательность с любым из SEQ ID NO: 19-21. В соответствии с конкретными вариантами осуществления первый трансген может содержать нуклеотидную последовательность, изложенную в виде SEQ ID NO: 21.

Второй трансген в полинуклеотиде может содержать нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичной SEQ ID NO: 6. В качестве альтернативы, второй трансген может содержать нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичной SEQ ID NO: 7. Второй трансген может содержать любую из последовательностей с SEQ ID NO: 6 и 7.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй трансген (кодирующий белок сARC) может содержать нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичной любой из SEQ ID NO: 15-18. Первый трансген может содержать любую из нуклеотидных последовательностей, изложенных в виде SEQ ID NO: 15-18. В соответствии с конкретными вариантами осуществления первый трансген содержит последовательность с SEQ ID NO: 16.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления участок внутренней посадки рибосомы (IRES) присутствует между двумя или больше трансгенами (например, между трансгеном cS100A1 и трансгеном сARC). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген, кодирующий белок семейства S100 находится со стороны 5'-конца относительно трансгена, кодирующего ингибитор апоптоза. В соответствии с другими вариантами осуществления трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, находится со стороны 5'-конца относительно трансгена, кодирующего белок семейства S100.

В настоящем документе дополнительно представлены частицы gAAV, содержащие векторы на основе gAAV, раскрытые в настоящем документе, заключены в капсиды AAV. Другие аспекты настоящего раскрытия включают в себя композиции, содержащие частицы gAAV, описанные в настоящем документе. Такие композиции можно вводить субъекту для генной терапии заболевания сердца. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание сердца вызывает сердечную недостаточность у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание сердца представляет собой кардиомиопатию. В соответствии с другими вариантами осуществления заболевание сердца представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию или дилатационную кардиомиопатию. В соответствии с другими вариантами осуществления заболевание сердца представляет собой острую ишемию.

Композиции согласно настоящему раскрытию можно вводить субъекту посредством отличающихся путей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию вводят посредством инъекции в сердце субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение композиции приводит в результате к экспрессии трансгенов (например, двух или больше трансгенов) в сердце субъекта. В соответствии с различными вариантами осуществления стадия введения композиции приводит в результате к улучшенной сердечной деятельности у субъекта, как например, к улучшенной сердечной деятельности у субъекта в течение более чем 10 месяцев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение приводит в результате к улучшенной сердечной деятельности в течение более чем 12 месяцев, более чем 14 месяцев, более чем 16 месяцев, более чем 17 месяцев, более чем 20 месяцев, более чем 22 месяцев или более чем 24 месяцев.

#### **Краткое описание чертежей**

Следующие чертежи составляют часть данного описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего раскрытия. Настоящее раскрытие можно будет лучше понять, исходя из следующего описания, рассматриваемого совместно с прилагаемыми чертежами, на которых подобные позиционные обозначения идентифицируют подобные элементы.

На фиг. 1 представлена схема иллюстративной конструкции на основе AAV. За первым инвертированным концевым повтором (ITR) AAV следует промотор сердечного тропонина Т (сTnT), затем последовательность, кодирующая кальций-связывающий белок S100 A1 (сS100A1), за которой следует участок внутренней посадки рибосомы (IRES), за которым следует последовательность, кодирующая репрессор апоптоза с доменом рекрутинга каспазы (сARC), за которой следует последовательность полиаденилирования (РА) и второй ITR AAV.

На фиг. 2 представлено полученное с помощью МРТ изображение в диастоле у получавшей лечение мышечной дистрофии собаки в исходный момент времени и спустя несколько недель после доставки генов. Данные подтверждают стабильное или несколько улучшенное ремоделирование с незначительным уменьшением диастолического объема левого желудочка.

На фиг. 3 представлено полученное с помощью МРТ изображение в систоле у получавшей лечение мышечной дистрофии собаки в исходный момент времени и спустя несколько недель после доставки генов. Данные подтверждают стабильную или несколько улучшенную систолическую функцию левого желудочка после обработки, причем слабое снижение систолического объема говорит об улучшенной сократительной способности и увеличении минутного объема кровообращения в левом желудочке.

На фиг. 4 представлены фракция выброса, пиковая деформация и минутный объем кровообращения

у D2.mdx мышей после обработки AAVrh.10-S100A1/ARC. В течение 24-недельного периода у мышей, которым вводили инъекцией терапевтический AAV, лучше сохранялись фракции выброса, развитие деформации и минутный объем кровообращения по сравнению с мышами, получавшими инъекции плацебо.

На фиг. 5 представлены уровни экспрессии S100A1 и ARC у мышей, получавших обработку вектором на основе рекомбинантного AAVrh.10-S100A1/ARC, и контрольных мышей. Анализ белков (вес-терн-блоттинг) подтверждал, что уровни S100A1, и ARC повышались в обработанных тканях по сравнению с контролями (получавшими инъекцию плацебо).

На фиг. 6 представлены кардиомиоциты контрольных и получавших обработку мышей с 10- и 20-кратным увеличением. Данные гистологического анализа тканей сердца указывают на то, что получавшие обработку мыши демонстрировали менее выраженную патологию DMD по сравнению с контрольными сердцами.

На фиг. 7 показано, что первая (из двух) собак, имеющих недостаточность дистрофина (собаки с GRMD), которая имела кличку Келвин, демонстрировала улучшенную сердечную деятельность (измеряемую по фракции выброса) после обработки рекомбинантным AAVrh.10-S100A1/ARC. Обе получавшие инъекции собаки демонстрировали улучшения фракции выброса и других сердечных параметров после обработки, которые измеряли с помощью MPT сердца, и это подтверждалось данными эхокардиографии.

На фиг. 8 представлены данные того, что вторая собака с GRMD, имеющая кличку Себастьян, демонстрировала улучшенную сердечную деятельность после обработки AAVrh.10-S100A1/ARC.

На фиг. 9A-9C показано, что обработка AAV-S100A1/ARC снижала уровни креатинкиназы (СК) в сыворотке крови и предотвращала мышечную атрофию у собак с GRMD согласно результатам измерения мышечной массы мышц конечностей с помощью MPT, которую измеряли по площади обеих лап (фиг. 9A), максимальной площади поперечного сечения (CSA) (фиг. 9B) и объему обеих лап (фиг. 9C). Результаты демонстрируют, что масса скелетных мышц либо увеличивалась, либо оставалась неизменной после обработки сердца.

На фиг. 10 продемонстрировано, что уровни циркулирующей креатинкиназы (СК) в скелетных мышцах у субъектов с GRMD снижались после инъекции AAVrh.10-S100A1/ARC, что указывает на снижение существующего повреждения мышц.

На фиг. 11 проиллюстрированы результаты выравнивания последовательности между последовательностью кДНК оптимизированного по кодону ARC собаки и последовательностью кДНК оптимизированного по кодону человеческого ARC. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 15, 16 и 6 сверху вниз.

На фиг. 12 проиллюстрированы результаты выравнивания последовательности между последовательностями кДНК оптимизированного по кодону и нативного человеческого ARC. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 17, 18 и 6 сверху вниз.

На фиг. 13 проиллюстрированы результаты выравнивания последовательности между последовательностями кДНК оптимизированного по кодону и нативного человеческого S100A1. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 19, 5 и 8 сверху вниз.

На фиг. 14 проиллюстрированы результаты выравнивания последовательности между последовательностью кДНК оптимизированного по кодону S100A1 собаки и последовательностью кДНК оптимизированного по кодону человеческого S100A1. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 20, 8 и 21 сверху вниз.

На фиг. 15 представлена фракция укорочения и фракция выброса у D2.mdx мышей (n=12) в возрасте 10 месяцев после обработки AAVrh.10-S100A1/ARC в возрасте 1 месяц. Как фракция укорочения, так и фракция выброса не отличались значимо от D2 мышей дикого типа у мышей, получавших обработку AAVrh.10-S100A1/ARC, тогда как не получавшие обработку D2.mdx мыши имели значимые уменьшения функции.

На фиг. 16 представлены значения объема и диаметра левого желудочка у D2.mdx мышей (n=12) в возрасте 10 после обработки AAVrh.10-S100A1/ARC в возрасте 1 месяц. Увеличенные значения объема и диаметра в течение как диастолы, так и систолы указывают на дилатационную кардиомиопатию. Как объем, так и диаметр не отличались значимо от D2 мышей дикого типа у мышей, получавших обработку AAVrh.10-S100A1/ARC, тогда как не получавшие обработку D2.mdx мыши имели значимые повышения обоих параметров.

На фиг. 17 представлена продолжительность жизни у 50% D2.mdx.sk\_trophin мышей (n=12 на группу в начале исследования), которым позволяли начинать получать физическую нагрузку в возрасте 6 недель, но которые не получали обработку до возраста 6 месяцев. В контрольной группе, которая не получала обработку, медианная продолжительность жизни составляла 10 месяцев. Группа, получавшая AAVrh.10-ARC, имела медианную продолжительность жизни, составляющую 14 месяцев, группа, получавшая AAVrh.10-S100A1, имела медианную продолжительность жизни, составляющую 16 месяцев, и группа, получавшая AAVrh.10-S100A1/ARC, имела медианную продолжительность жизни, составляющую 20 месяцев.

На фиг. 18 представлены изменения фракции выброса с возрастом у не получавших обработку колонией собак с GRMD (n=10) и изменения фракции выброса у отдельных собак с GRMD, которые получали обработку вектором AAVrh.10-S100A1/ARC в возрасте, который показан красными стрелками (возраст от 3 до 7 месяцев). У всех четырех из получавших обработку собак фракция выброса улучшалась после обработки и была стабильной после этого.

На фиг. 19 представлено изображение результатов гистологического анализа левого желудочка (краситель H&E) у нормального золотистого ретривера возрастом 1 год (крайняя левая секция) и собаки с GRMD (WnM3/Келвин), которая получала обработку вектором AAVrh.10-S100A1/ARC в возрасте 7 месяцев (крайняя правая секция). Получавшая обработку собака умерла в возрасте 34 месяцев вследствие аспирационной пневмонии, хотя ее сердечная деятельность все еще оставалась в нормальном диапазоне (Фиг. 18). На средних трех секциях представлены результаты гистологического анализа левого желудочка у не получавших обработку собак с GRMD в возрасте 8, 24 и 30 месяцев. Имеет место выраженный и прогрессирующий фиброз, который замещает мышечную ткань (розового цвета). Следует отметить, что на крайних правых секциях от получавших обработку собак результаты гистологического анализа не отличаются заметно от результатов у нормальной собаки и говорят о значительном меньшем фиброзе и более интактном состоянии, чем у не получавшей обработку собаки с GRMD.

#### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Настоящее раскрытие относится к композициям и способам генной терапии для заболеваний сердца, например, кардиомиопатии, у субъекта-человека. Способы согласно настоящему раскрытию относятся к применению частиц рекомбинантного AAV (rAAV) для одновременной доставки и экспрессии двух или больше трансгенов. Трансгены согласно настоящему раскрытию содержат по меньшей мере два класса белков, каждый из которых имеет конкретную функцию, воздействующую на разные аспекты заболеваний сердца. Один класс трансгенов регулирует передачу сигнала с участием кальция в кардиомиоцитах, например, белки семейства S100. Другой класс трансгенов содержит репрессоры апоптоза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансгены могут представлять собой сердечный кальций-связывающий белок S100 A1 (cS100A1) или его вариант и сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутинга каспазы (cARC) или его вариант.

Композиции и способы согласно настоящему раскрытию основываются, по меньшей мере частично, на синергических эффектах двух трансгенов, например, S100A1 и ARC, когда они доставляются и экспрессируются одновременно в сердце субъекта. Белок S100A1 улучшает аспекты транспорта кальция, включающие в себя нормализацию кальциевых транзиентов саркоплазматического ретикулума, приводящую к нормализации сократительной функции. Белок ARC блокирует апоптоз, инициируемый посредством митохондриальных и немитохондриальных механизмов (таких как индуцируемый растяжением апоптоз), и улучшает митохондриальную функцию. Иначе говоря, S100A1 и ARC воздействуют на две отдельных составляющих сердечной недостаточности (дисфункция транспорта кальция и апоптоз) с синергическими благоприятными воздействиями, приводящими к лучшим долгосрочным результатам лечения. Кроме того, композиции и способы согласно настоящему раскрытию являются эффективными на любой стадии заболевания при сердечной недостаточности.

В настоящем документе также представлены способы получения частиц rAAV, подходящих для доставки трансгенов, например, S100A1 и ARC или их вариант, в сердце субъекта. Такие частицы rAAV могут содержать геном рекомбинантного AAV, содержащий молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие трансгены, причем указанные молекулы нуклеиновой кислоты заключены в капсид белками капсида AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частицы rAAV включают в себя вектор на основе нуклеиновой кислоты рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV). Геном рекомбинантного AAV представляет собой одноцепочечную ДНК, которая может дополнительно содержать элементы последовательности, которые способствуют интеграции генома AAV в геном хозяина и экспрессии трансгенов. Например, геном рекомбинантного AAV могут содержать тканеспецифические промоторы для обеспечения экспрессии трансгенов в тканях- или органах-мишенях. Такие частицы rAAV можно применять в композиции для лечения болезней сердца.

Следовательно, настоящим раскрытием также предусмотрены векторы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) для доставки трансгенов в сердце субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытые векторы на основе rAAV включают в себя по меньшей мере два трансгена, причем один кодирует белок семейства S100, и один кодирует ингибитор апоптоза. Эти векторы на основе rAAV могут включать в себя, в порядке от 5'-к 3'-концу, последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), промотор, функционально связанный с трансгенами, и вторую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления два трансгена являются функционально связанными с одним и тем же промотором. В соответствии с другими вариантами осуществления каждый трансген является функционально связанным с отдельным промотором. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе rAAV также включает в себя по меньшей мере один сигнал полиаденилирования (например, расположенный со стороны 3'-конца относительно двух трансгенов, экспрессируемых с одного промотора, или со стороны 3'-конца относительно одного или обоих

трансгенов, экспрессируемых с отличающихся промоторов).

Настоящим раскрытием также предусмотрен вектор на основе нуклеиновой кислоты рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для доставки двух или больше трансгенов в сердце субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV содержит именно два трансгена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV содержит три трансгена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления указанный вектор содержит, от 5'- к 3'-концу, последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), два или больше трансгенов и промотор, функционально связанный с двумя или больше трансгенами, сигнал полиаденилирования и последовательность второго инвертированного концевой повтора (ITR) AAV. В соответствии с конкретными вариантами осуществления два или больше трансгенов содержат первый трансген, содержащий белок семейства S100, и второй трансген, содержащий ингибитор апоптоза.

Термин "трансген", используемый в контексте настоящего документа, относится к гену или генетическому материалу, который был перенесен естественным образом или с помощью любого количества методик генной инженерии из одного организма в другой. Трансген может представлять собой представляющий интерес белок или полипептид (например, S100A1, ARC) или представляющую интерес РНК (например, siRNA или микроРНК). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один вектор на основе гAAV может содержать кодирующую последовательность для одного или нескольких трансгенов. Например, один вектор на основе гAAV может содержать кодирующую последовательность для 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 трансгенов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы на основе гAAV согласно настоящему раскрытию содержат кодирующую последовательность для обоих из S100A1 и ARC или их вариантов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV дополнительно содержит участок, кодирующий белок Rep. Трансгены согласно настоящему раскрытию содержат два класса белков, каждый из которых имеет конкретную функцию, воздействуя на разные аспекты одной или нескольких болезней сердца. Один класс трансгенов может регулировать передачу сигнала с участием кальция в кардиомиоцитах, например, белки семейства S100. Другой класс трансгенов может содержать репрессоры апоптоза.

При использовании в контексте настоящего документа термин "вариант" относится к нуклеиновой кислоте, имеющей характеристики, которые отличаются от характеристик нуклеиновых кислот, встречающихся в природе, например, "вариант" является по меньшей мере приблизительно на 70% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичным, по меньшей мере на приблизительно 96% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичным, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичным или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичным нуклеиновой кислоте дикого типа. Например, вариант трансгена представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую одну или несколько замен нуклеотидов в трансгене по сравнению с его последовательностью дикого типа. Эти замены могут быть "молчащими", т.е. они не модифицируют аминокислотную последовательность любого кодируемого белка (или иным образом приводят в результате к варианту аминокислотной последовательности). В качестве альтернативы, эти замены могут приводить в результате к модификациям в аминокислотной последовательности кодируемого белка, приводящим в результате к кодируемому белку, имеющему одну или несколько аминокислотных замен (например, имеющему 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15 или 15-20 аминокислотных замен) по сравнению с последовательностью белка дикого типа. Эти замены включают в себя химические модификации, а также усечения. Этот термин дополнительно включает функциональные фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа. Эти модификации в эталонной последовательности могут встречаться на 5'- или 3'-концах эталонной последовательности или в любом месте между этими положениями, при этом они расположены либо отдельно между нуклеотидами в эталонной последовательности, либо в одной или нескольких смежных группах в пределах эталонной последовательности.

При практической реализации определить то, является ли любая конкретная молекула нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной, например, нуклеотидной последовательности трансгена, можно обычным путем с применением известных компьютерных программ. Предпочтительный способ определения наилучшего общего совпадения между последовательностью запроса (например, последовательностью согласно настоящему раскрытию) и рассматриваемой последовательностью, также называемый глобальным выравниванием последовательностей, можно осуществлять с применением компьютерной программы FASTDB или blastn, основанной на алгоритме из Brutlag et al. (Cotr. App. Biosci. 6:237-245 (1990)). При выравнивании последовательностей обе из последовательности запроса и рассматриваемой последовательности представляют собой либо нуклеотидные последовательности, либо аминокислотные последовательности. Результат указанного глобального выравнивания последовательностей выражен в виде процентной идентичности. Предпочтительные параметры, применяемые при выравнивании аминокислотных последовательностей с помощью FASTDB, представляют собой: матрица(Matrix)=PAM 0, k-tuple=2, штраф за несоответствие(Mismatch

Penalty)=1, штраф за присоединение(Joining Penalty)=20, длина группы рандомизации(Randomization Group Length)=0, граница отсечения(Cutoff Score)=1, размер ОКНа(Window Size)=длина последовательности, штраф за открытие гэпа(Gap Penalty)=5, штраф за размер гэпа(Gap Size Penalty)=0,05, размер окна(Window Size)=500 или длина рассматриваемой аминокислотной последовательности в зависимости от того, что будет короче. Является ли нуклеотид соответствующим/выравниваемым, определяют по результатам выравнивания последовательностей в FASTDB. Это процентное значение затем вычитают из процентной идентичности, которую рассчитывают с помощью вышеуказанной программы FASTDB с применением определенных параметров, с получением конечной оценки процентной идентичности. Эту конечную оценку процентной идентичности применяют в контексте настоящего раскрытия. В случае рассматриваемых последовательностей, усеченных на 5'- и/или 3'-концах относительно последовательности запроса процентную идентичность корректируют посредством расчета количества нуклеотидов в последовательности запроса, которые расположены со стороны 5'- или 3'-конца относительно последовательности запроса, которые не являются совпадающими/выравниваемыми с соответствующим рассматриваемым нуклеотидом, в виде процента от общего количества оснований в последовательности запроса.

Белки семейства S100, которые можно применять в соответствии с настоящим раскрытием, включают в себя, без ограничения, S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A5, S100A6, S100A7 (например, псориазин), S100A8 (например, кальгранулин А), S100A9 (например, кальгранулин В), S100A10, S100A11, S100A12 (например, кальгранулин С), S100A13, S100A14, S100A15 (например, кобнеризин), S100A16, S100B, S100P и S100Z или их варианты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок семейства S100 может представлять собой кальций-связывающий белок S100 A1 (S100A1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления S100A1 представляет собой сердечный S100A1 (cS100A1) или его вариант. Белок cS100A1 представляет собой регулятор сократительной способности миокарда. Уровни белка cS100A1 снижаются в гипертрофированной ткани правого желудочка в модели легочной гипертензии. Кроме того, S100A1 представляет собой регулятор генетической программы, лежащей в основе гипертрофии сердца, поскольку S100A1 ингибирует альфа1-адренергическую стимуляцию связанных с гипертрофией генов, в том числе MYH7, ACTA1 и S100B.

В кардиомиоцитах S100A1 регулирует управляемую кальцием сеть SR, саркомерную и митохондриальную функцию посредством модуляции активности рианодинового рецептора 2 (RYR2), Ca<sup>2+</sup>-АТФазы сарко/эндоплазматического ретикула (SERCA), титина и митохондриальной F1-АТФазы. В результате этого кардиомиоциты и сердца с повышенной экспрессией S100A1 демонстрируют улучшенные характеристики в систоле и диастоле, результат улучшенных амплитуд Ca<sup>2+</sup> транзиентов, являющийся результатом усиленной загрузки Ca<sup>2+</sup> в SR и последующего систолического высвобождения Ca<sup>2+</sup> вместе с уменьшенной диастолической утечкой Ca<sup>2+</sup> из SR и усиленной повторной секвестрацией Ca<sup>2+</sup>. Одновременно, S100A1 повышает выработку высокоэнергетического фосфата митохондриями и, следовательно, координирует обеспечение энергией с повышенной потребностью в аденозин-5'-трифосфате (АТФ) посредством усиленного оборота Ca<sup>2+</sup> в кардиомиоцитах. Пониженная экспрессия S100A1 в кардиомиоцитах ассоциирована с пониженной сократительной функцией, что подтверждает патофизиологическую значимость этого белка.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность кДНК S100A1 (трансген) в полинуклеотидах любого из раскрытых векторов на основе гAAV является на 100% идентичной встречающейся в естественных условиях последовательности полученного от человека S100A1. В соответствии с другими вариантами осуществления последовательность кДНК S100A1 является по меньшей мере приблизительно на 70% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичной или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичной встречающейся в естественных условиях последовательности S100A1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность кДНК S100A1 является оптимизированной по кодону для экспрессии в человеческих клетках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность кДНК S100A1 (трансген) содержит последовательность, на 100% идентичную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 8. В соответствии с другими вариантами осуществления последовательность кДНК S100A1 является по меньшей мере приблизительно на 70% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичной или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичной SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 8.

В соответствии с другими вариантами осуществления последовательность кДНК S100A1 является

оптимизированной по кодону для экспрессии в клетках собаки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV содержит последовательность кДНК S100A1, которая является по меньшей мере приблизительно на 70% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичной или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичной SEQ ID NO: 21. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV содержит SEQ ID NO: 21.

Неограничивающие примеры последовательностей кДНК S100A1 описаны ниже.

Нативный S100A1 (homo sapiens)

ATGGGCTCTGAGCTGGAGACGGCGATGGAGACCCTCATCAACGTGTTCCACGCCCA  
CTCGGGCAAAGAGGGGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAAGAGCTG  
CTGCAGACGGAGCTCTCTGGCTTCTGGATGCCCAGAAGGATGTGGATGCTGTGGAC  
AAGGTGATGAAGGAGCTAGACGAGAATGGAGACGGGGAGGTGGACTTCCAGGAGT  
ATGTGGTGTCTGTGGCTGCTCTACAGTGGCCTGTAACAATTTCTTCTGGGAGAACA  
GTTGA (SEQ ID NO: 5)

Оптимизированный S100A1 (homo sapiens)

ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCTGATCAACGTGTTCCACGCCCA  
CAGCGCAAAGGAGGGCGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGAGCTG  
CTGCAGACCGAGCTGAGCGGCTTCTGGACGCCCAGAAGGACGTGGACGCCGTGGA  
CAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAACGGCGACGGCGAGGTGGACTTCCAGGAG  
TACGTGGTGTGGTGGCCGCCCTGACCCTGGCCTGCAACAACCTTCTTCTGGGAGAAC  
AGCTGA (SEQ ID NO: 8)

Результаты выравнивания нуклеотидной последовательности между оптимизированной по кодону последовательностью кДНК человеческого S100A1 и последовательностью кДНК нативного человеческого S100A1 (SEQ ID NO: 8 и 5 соответственно) представлены на фиг. 13.

Для сравнения определенные неограничивающие примеры полученных от животных последовательностей кДНК S100A1 описаны ниже. Результаты выравнивания нуклеотидной последовательности между оптимизированной по кодону последовательностью кДНК S100A1 собаки и оптимизированной по кодону последовательностью кДНК человеческого S100A1 (SEQ ID NO: 21 и 8, соответственно) представлены на фиг. 14.

S100A1 (*canis lupus familiaris*)

(эталонная последовательность в NCBI: XM\_005622816.2)

ATGGGCTCTGAGCTGGAGACAGCGATGGAGACTCTCATCAATGTGTTCCATGCCAC  
TCGGGCAAGGAGGGAAACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTAAAGGAGCTGC  
TGCAGACTGAGCTCTCCGGCTTCTGGACGCCCAGAAGGATGCGGATGCTGTGGAC  
AAGGTGATGAAAGAGCTAGATGAGAATGGAGATGGGGAGGTGGACTTCCAGGAGT  
ATGTGGTGTGGTGGCTGCCCTACAGTGGCCTGTAACAACCTTCTTCTGGGAAAACA  
GTTGA (SEQ ID NO: 1)

S100A1 (*felis catus*)

(эталонная последовательность в NCBI: XM\_003999773.3)

ATGGGCTCAGAGCTGGAGACGGCGATGGAGACTCTCATCAACGTGTTCCACGCCCA  
CTCGGGCAAGGAGGGAGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTAAAAGAGCTG  
CTGCAGACCGAGCTCTCTGGCTTCTGGACGCCCAGAAGGATGCCGACGCTGTGGA  
CAAGGTGATGAAAGAGCTAGACGAGAATGGAGATGGGGAGGTGGACTTCCAAGAG  
TATGTGGTGTGGTGGCTGCCCTACAGTGGCCTGTAACAACCTTTTCTGGGAGAAC  
AGTTGA (SEQ ID NO: 2)

Аспекты настоящего раскрытия обеспечивают композиции и способы, которые включают в себя доставку трансгена, кодирующего ингибитор апоптоза (например, антиапоптотическое средство). Иллюстративные примеры ингибиторов апоптоза включают в себя белки *flnk*, *p35*, *ctmA*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Mcl-1*, *E1B-19K* из аденовируса, а также антагонисты проапоптотических средств (например, антисмысловые последовательности, рибозимы, антитела и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибитор апоптоза представляет собой сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутинга каспазы (ARC) или его вариант. В соответствии с другими вариантами осуществления ингибитор апоптоза

представляет собой сердечный ARC или его вариант. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления желательной может быть отдельная доставка белка семейства S100 и ингибитора апоптоза. В соответствии с определенными вариантами осуществления трансген, кодирующий белок семейства S100, доставляют одновременно или последовательно с одним или несколькими малыми молекулами-ингибиторами апоптоза. Другие иллюстративные малые молекулы-ингибиторы апоптоза включают в себя ингибиторы с-Мус, ингибиторы Вах, ингибиторы р53, ингибиторы tBid, ингибиторы каспазы и ингибиторы проапоптотических членов семейства BCL-2.

cARC представляет собой апоптотический регуляторный белок, экспрессирующийся почти исключительно в миогенных клетках. Он содержит домен рекрутинга каспазы (CARD), с помощью которого он блокирует активацию некоторых инициаторных каспаз. ARC также блокирует независимые от каспаз явления, ассоциированные с апоптозом. Апоптоз, вызванный острой ишемией и последующим ремоделированием желудочков, рассматривают как медиатор сердечной недостаточности. Несмотря на то что постишемическая сердечная недостаточность может иметь несколько причин, в последнее время внимание было направлено на изучение влияния апоптоза или программируемой гибели клеток. Апоптоз характеризуется сохранением митохондриальной и сарколеммной мембран, конденсацией ядерного хроматина и фагоцитозом макрофагами или соседними клетками без запуска воспалительного ответа. Известно, что активация апоптоза происходит посредством механизмов, включающий каспазы, семейство цистеиновых протеаз, которые синтезируются в виде неактивных предшественников и превращающихся вследствие протеолитического расщепления в свою активную форму. ARC способен блокировать активацию апоптоза посредством блокирования каспаз.

Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем документе представлены векторы на основе gAAV (или векторы на основе нуклеиновой кислоты gAAV), содержащие полинуклеотид, который содержит последовательность, являющуюся по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичной любой из нуклеотидных последовательностей с SEQ ID NO: 6-8, 16 и 21. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность полинуклеотида отличается от последовательности с любым из SEQ ID NO: 6-8, 16 и 21 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более чем на 12 нуклеотидов. В соответствии с конкретными вариантами осуществления любые из раскрытых векторов на основе gAAV содержат полинуклеотид, который содержит любые из SEQ ID NO: 6-8, 16 и 21.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытые последовательности трансгенов cARC и S100 содержат усечения на 5'- или 3'-конце по сравнению с последовательностями дикого типа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытые последовательности трансгена содержат усечения на 5'- или 3'-конце по сравнению с SEQ ID NO: 5-8 и 15-21. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая отличается от последовательности с любым из SEQ ID NO: 5-8 и 15-21 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более чем на 12 нуклеотидов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность кДНК сердечного ARC (или трансгена) в полинуклеотидах раскрытых векторов на основе gAAV является на 100% идентичной встречающейся в естественных условиях последовательности полученного от человека cARC. В соответствии с другими вариантами осуществления последовательность кДНК cARC является по меньшей мере приблизительно на 70% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичной или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичной встречающейся в естественных условиях последовательности полученного от человека cARC.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления последовательность кДНК cARC является оптимизированной по кодону для экспрессии в человеческих клетках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность кДНК cARC (трансген) содержит последовательность, на 100% идентичную SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7. В соответствии с другими вариантами осуществления последовательность кДНК cARC является по меньшей мере приблизительно на 70% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичной или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичной SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В соответствии с другими вариантами осуществления последовательность кДНК cARC является оптимизированной по кодону для экспрессии в клетках собаки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе gAAV содержит последовательность кДНК cARC, которая является по меньшей мере приблизительно на 70% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 80% иден-

тичной, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичной, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичной или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичной SEQ ID NO: 16. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV содержит SEQ ID NO: 16.

Неограничивающие примеры последовательностей кДНК сARC описаны ниже.

Оптимизированный ARC (homo sapiens)

```
ATGGGCAACGCCAGGAGCGGCCAGCGAGACCATCGACCGGGAGCGGAAGCGGC
TGGTGGAGACCCTGCAGGCCGACAGCGGCCTGTGCTGGACGCCTGTGGCCCGG
GGCGTGTGACCGGCCCGAGTACGAGGCCCTGGACGCCCTGCCGACCCGAGCG
GCGGGTGC GGCGGCTGTGCTGCTGGTGCAGGGCAAGGGCGAGGCCGCTGCCAGG
AGCTGTGCGGTGCGCCAGCGGACCGCCGGCGCCCCGACCCCGCTGGGACTGG
CAGCACGTGGGCCCGGCTACCGGGACCGGAGCTACGACCCCCCTGCCCGGCCA
CTGGACCCCGAGGCCCGCGCAGCGGCACCACCTGCCCGGCTGCCCGGGCCA
GCGACCCGACGAGGCCGGCGGCCCGAGGGCAGCGAGGCCGTGCAGAGCGGCAC
CCCCGAGGAGCCCGAGCCCGAGCTGGAGGCCGAGGCCAGCAAGGAGGCCGAGCCC
GAGCCCGAGCCCGAGCCCGAGCTGGAGCCCGAGGCCGAGGCCGAGCCCGAGCCCG
AGCTGGAGCCCGAGCCCGACCCGAGCCCGAGCCCGACTTCGAGGAGCGGGACGAG
AGCGAGGACAGCTGA (SEQ ID NO: 6)
```

Оптимизированный ARC (homo sapiens)

```
ATGGGGAATGCCAAGAAAGGCCTTCTGAGACTATAGACCGCGAGCGCAAGAGGCT
TG TAGAAACCTTGCAGGCCGACTCTGGTCTTTGCTGGACGCTCTGCTTGC CGGGG
TGTTCTGACTGGACCGGAGTACGAAGCATTGGATGCCCTTCTGTATGCAGAGAC
GAGTTAGACGCTGTTGCTTCTGTGCAAGGCAAGGGTGAAGCCGCTGTCAAGAG
CTCTGAGGTGTGCTCAACGAACCGCCGGGGGCCAGATCCGGCATGGGATTGGCA
ACATGTGGGGCCCGGCTATCGGGACCGGAGCTACGATCCACCATGCCCGGGTCATT
GGACGCCGAGGCTCCAGGATCTGGTACAACATGCCAGGACTCCCAAGAGCCAGT
GACCCCGATGAAGCTGGAGGCCCGAGGGCAGTGAAGCCGTACAGAGCGGTACCCC
AGAAGAACCAGAACCGGAGCTGGAGGCTGAAGCTAGTAAAGAGCGGAACCTGAA
CCCGAACCGGAGCCTGAGCTCGAGCCAGAGGCTGAGGCCGAGCCAGAGCCTGAACT
CGAACCCGAACCTGATCCAGAACCAGAGCCCGACTTCGAGGAACGGGATGAGTCAG
AGGATTCTTGA (SEQ ID NO: 7)
```

Результаты выравнивания нуклеотидной последовательности между оптимизированной по кодону последовательностью кДНК человеческого ARC и последовательностью кДНК нативного человеческого ARC (SEQ ID NO: 6 и 18 соответственно) представлены на фиг. 12.

Для сравнения определенные неограничивающие примеры полученных от животных последовательностей кДНК ARC описаны ниже. Результаты выравнивания нуклеотидной последовательности между оптимизированной по кодону последовательностью кДНК ARC собаки и оптимизированной по кодону последовательностью кДНК человеческого ARC (SEQ ID NO: 16 и 6 соответственно) представлены на фиг. 11. ARC (canis lupus familiar is) (эталонная последовательность в NCBI: NM\_001048121.1)

ATGCAGGAAGCGCCAGCCGCGCTGCCACGGAGCCGGGCCCCAGCCCCGTGCCTGC  
 CTTCCTCGGCAAGCTGTGGGCGCTGGTGGGCGACCCGGGACCGACCACCTCATCC  
 GCTGGAGCCCCGAGCGGGACCAGTTTCCTCGTCAGCGACCAGAGCCGCTTCGCCAAG  
 GAAGTGCTGCCCCAGTACTTCAAGCACAGCAACATGGCGAGCTTCGTGCGGCAGCT  
 CAACATGTACGGTTTTTCGGAAGGTGGTGAAGCATCGAGCAGGGCGGCCTGCTCAGGC  
 CGGAGCGCGACCACGTTCGAGTTCCAGCACCCGAGCTTCGTCCGCGGCCGAGAGCAA  
 CTCTGGAGCGCGTGCAGCGCAAGGTGCCCGCGCTGCGCAGCGACGACGGCCGCTG  
 GCGCCCCGAGGACCTGGGCCGGCTGCTGGGCGAGGTGCAGGCTTTGCGGGGAGTGC  
 AGGAGATCACCGAGGCGCGGCTGCGGGAGCTCAGGCAGCAGAACGAGATCTTATGG  
 AGGGAGGTGGTACTCTGCGGCAGAGCCACGGTCAGCAGCATCGCGTCATTGGCAA  
 GCTGATCCAGTGCTCTTTGGGCCACTTCAGACAGGGTCCAGCGGCGCAGGAGCTA  
 AGAGAAAGCTGTCTCTGATGCTGGATGAGGGGAGCTCATGCCAACACCGGCCAAA  
 TTCAACACCTGTCTTTACCTGGTGCCCTCTTGAGGATCCCTACTTTATCCAGTTCG  
 CCTCCAGAGACCACCTTGGGCCCTCAGCAGCTCTCATAGACCAGGGGCCCTATCA  
 TCTCTGACATCCATGAAGACTCTCCCTCCCTGATGGGACCAGGCTTTCTCTTCCAG  
 TGGTGGCAGGAGGGAGAAGGGCCTGGCACTGCTCAAAGAAGAGCCGGCCAGCCCA  
 GGGGGGAAGGCGAGGCCGGGCTGGCCCTGGCCCCAACGAGTGTGACTTCTGCGT  
 GACAGCCCCCCCCACTGTCCGTGGCTGTGGTGCAGGCCATCCTGGAAGGGAAGG  
 GAACTTCAGCCCCGAGGGGCCAGGAATGCCAACAGCCTGAACCAAGGGGTCCC  
 AGGGAGGTACCTGACAGGGGACTCTGGGCCTGGACAGGGGGGCACGAAGCCAG  
 AGAATCTGCTGCCTCCATGCTGCTTCGGGCCCCCTGAAAGTGTGGAGCCTGCAG  
 GGCCCTGGATGTGCTGGGCCCCAGCCATCAAGGGCGAGAATGGACCCTGATGGAC  
 TTGGACATGGAGCTGTCCCTGATGCAGCCCTTGGGTCCAGAGAGGAGTGAGACTGA  
 GCTGGCGGTCAAGGGTTAAATCTCCGGGGCCAGGGAAGGACTCCACACTTGGGG  
 CACCACTCCTGCTCGATGTCCAAGCGGCTTTGGGAGGCCAGCTCTCAGCCTCCTG  
 GAGCTTTAACCATTTACAGCACCCCTGAGAGCCGAGCCAACTACCTAGGCCAGGG  
 GCCAATCCCTCCCCCTGA (SEQ ID NO: 3)

ARC (felis catus) (эталонная последовательность в NCBI: XM\_006941587.2)

ATGGGCAATGCGCAGGAGCGGCCCTCAGAGACGATCGATCGCGAGCGGAAACGCCT  
 AGTGGAGACGCTGCAGGACGACTCCGGGCTGCTGCTGGATGCACTGCTGGCGCGCG  
 GCGTGCTCACCGGGCCTGAGTATGAGGCGTTGGACGCGCTGCCTGATGCCGAGCGC  
 AGGGTGCCTGCGCTGCTGCTGCTGGTACAAAGCAAGGGCGAGGCCGCTGCCAGGA  
 GCTGCTGCACTGCGCCAGCGTACTACGCGCGCCAGACCCGGCCTGGGACTGGC  
 AGCACGTGGGCACTGGCTACCGGAACGCAGCTACGACTCTCCATGCCCTGGCCAC  
 TGGACGCTGAGGCACCTGACTTGAGGACCGCTTGCCCCGAAACGCCAGAGCTTC  
 AGACTGCGACGAGGCTGGGGTTTCAGGGGGCTCGGAGGCAGTATCCGGAACCCCTG  
 AGGAACTCGATCCGGAAGTGAAGCTGAAGTCTCTGAAGGGCTGAGCCAGAGCCA  
 GAGCCAGAGCCGACTTTGAGGCGGGTATGAGTCTGAAGATTCC (SEQ ID NO: 4)

В других аспектах два или больше трансгенов в любом из раскрытых векторов на основе гAAV содержат трансген, содержащий доминантно-негативную форму фосфоламбана (или dn-PLN). Фосфоламбан (PLN) представляет собой эндогенный ингибитор насоса  $Ca^{2+}$  АТФазы 2а сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA2а), который опосредует повторное поглощение ионов кальция в саркоплазматический ретикулум (SR) кардиомиоцитов. Доминантно-негативная форма представляет собой псевдофосфорилированную форму, которая конкурирует за связывание с SERCA2а с нативным фосфоламбаном и тем самым уменьшает ингибирующий эффект в отношении SERCA2а (см. Bish, et al. Hum Gene Ther. 2011; 22(8): 969-977, включен в настоящий документ посредством ссылки). Соответственно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй трансген в раскрытых векторах на основе гAAV содержит dn-PLN. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытые векторы на основе гAAV могут содержать любой из раскрытых трансгенов S100A1 (например, последовательность оптимизированного по кодону человеческого S100A1) и трансгена dn-PLN. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытые векторы гAAV могут кодировать и, таким образом, доставлять в клетку белок S100A1 и белок dn-PLN.

В соответствии с дополнительными аспектами любой из раскрытых векторов на основе гAAV может содержать три или больше трансгенов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы на основе гAAV кодируют три трансгена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществ-

ления третий трансген представляет собой последовательность dp-PLN. Указанные три трансгена могут содержать первый трансген, кодирующий S100A1 (например, последовательность оптимизированного по кодону человеческого S100A1), второй трансген, кодирующий cARC (например, последовательность оптимизированного по кодону человеческого cARC), и третий трансген, кодирующий dn-PLN.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытые векторы на основе гAAV не кодируют белок, полученный от собаки или кошки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любой из раскрытых векторов не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую нативный S100A1 или кодирующую нативный ARC собаки или кошки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытые векторы на основе гAAV не содержат SEQ ID NO: 1 или 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытые векторы на основе гAAV не содержат SEQ ID NO: 3 или 4 или любую из SEQ ID NO: 1-4.

#### **Векторы на основе рекомбинантного AAV (гAAV)**

Аспекты настоящего раскрытия относятся к рекомбинантным векторам на основе AAV, которые можно применять для генной терапии заболеваний сердца. При использовании в контексте настоящего документа термин "вектор" может относиться к вектору на основе нуклеиновой кислоты (например, плазмиде или рекомбинантный вирусный геном), геному AAV дикого типа или вирусу, который содержит вирусный геном. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления термин "вектор" может относиться к вирусной частице, такой как вирусная частица AAV.

Геном AAV дикого типа представляет собой одноцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ssDNA) в виде либо положительной, либо отрицательной цепи. Геном содержит два инвертированных повтора (ITR), по одному на каждом конце цепи ДНК, и две открытые рамки считывания (ORF): гер и сар между ITR. ORF гер содержит четыре перекрывающихся гена, кодирующих белки Rep, требующиеся для жизненного цикла AAV. ORF сар содержит перекрывающиеся гены, кодирующие белки капсида: VP1, VP2 и VP3, которые взаимодействуют между собой, образуя вирусный капсид. VP1, VP2 и VP3 транслируются с одного транскрипта мРНК, который может подвергаться сплайсингу двумя разными способами. Может вырезаться либо более длинный, либо более короткий интрон, что приводит в результате к образованию двух изоформ мРНК: изоформа мРНК с длиной ~2,3 т.н. и ~2,6 т.н. Капсид образует надмолекулярный ансамбль примерно из 60 отдельных субъединиц из белков капсида в виде лишенной оболочки икосаэдрической пространственной решетки T-1, способной защищать геном AAV. Зрелый капсид AAV состоит из VP1, VP2 и VP3 (молекулярные массы составляют примерно 87, 73 и 62 кДа, соответственно) в соотношении, составляющем приблизительно 1:1:10.

Частицы рекомбинантного AAV (гAAV) могут содержать вектор на основе рекомбинантной нуклеиновой кислоты (называемый далее "вектором на основе гAAV"), которые могут содержать, как минимум: (а) один или несколько участков гетерологичной нуклеиновой кислоты, содержащих последовательность, кодирующую трансген; и (б) один или несколько участков, содержащих последовательности, которые облегчают интеграцию участка гетерологичной нуклеиновой кислоты (необязательно, с одним или несколькими участками нуклеиновой кислоты, содержащими последовательность, которая облегчает экспрессию) в геном субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности, облегчающие интеграцию участка гетерологичной нуклеиновой кислоты (необязательно, с одним или несколькими участками нуклеиновой кислоты, содержащими последовательность, которая облегчает экспрессию) в геном субъекта, представляют собой последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) (например, последовательности ITR дикого типа или модифицированные с помощью методов генной инженерии последовательности ITR), фланкирующие один или несколько участков нуклеиновой кислоты (например, участков гетерологичной нуклеиновой кислоты).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе нуклеиновой кислоты гAAV содержит один или несколько трансгенов, содержащих последовательность, кодирующую представляющий интерес белок или полипептид, функционально связанную с промотором, причем один или несколько трансгенов фланкированы с каждой стороны последовательностью ITR. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе нуклеиновой кислоты дополнительно содержит участок, кодирующий белок Rep, который описан в настоящем документе, содержащийся либо в пределах участка, фланкированного ITR, либо за пределами участка или нуклеиновой кислоты, функционально связанной с промотором. Последовательности ITR можно получать из любого серотипа AAV (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10), или их можно получать более чем из одного серотипа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности ITR получены из серотипов AAV2 или AAV6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый серотип, представленный в настоящем документе, не представляет собой серотип AAV2 или AAV8. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности ITR первого серотипа происходят из AAV3, AAV5 или AAV6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности ITR происходят из AAV2, AAV3, AAV5 или AAV6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности ITR относятся к тому же серотипу, что и капсид (например, последовательности ITR AAV6 и капсид AAV6 и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности ITR происходят из серотипа AAVrh.10.

Последовательности ITR и плазмиды, содержащие последовательности ITR, являются известными в уровне техники и коммерчески доступны (см., например, продукты и услуги, доступные от Vector Biolabs, Филадельфия, Пенсильвания, США; Cellbiolabs, Сан-Диего, Калифорния, США; Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США; и Addgene, Кембридж, Массачусетс, США; и из Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. Kessler PD, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1996 Nov 26;93(24):14082-7; и Curtis A. Machida. Methods in Molecular Medicine™. Viral Vectors for Gene Therapy Methods and Protocols. 10.1385/1-59259-304-6:201© Humana Press Inc. 2003. Chapter 10. Targeted Integration by Adeno-Associated Virus. Matthew D. Weitzman, Samuel M. Young Jr., Toni Cathomen and Richard Jude Samulski; патенты США № 5139941 и № 5962313, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления gAAV содержит остов плазмиды pTR-UF-11, который представляет собой плазмиду, содержащую ITR AAV2. Эта плаزمида является коммерчески доступной от Американской коллекции типовых культур (ATCC MBA-331).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы на основе gAAV согласно настоящему раскрытию содержат и трансген cS100A1, и трансген cARC для их одновременной доставки и экспрессии у субъекта. Трансген, кодирующий белок семейства S100 (например, cS100A1), может быть расположен со стороны 5'-конца относительно трансгена, кодирующего ингибитор апоптоза (например, cARC), в описанных в настоящем документе векторах на основе нуклеиновой кислоты gAAV. В качестве альтернативы, трансген, кодирующий ингибитор апоптоза, может быть расположен со стороны 5'-конца относительно трансгена, кодирующего белок семейства S100, в описанных векторах на основе нуклеиновой кислоты gAAV.

Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе gAAV содержит один или несколько участков, содержащих последовательность, которая облегчает экспрессию трансгена (например, гетерологичной нуклеиновой кислоты), например, последовательности для управления экспрессией, функционально связанные с нуклеиновой кислотой. Такие последовательности известны в уровне техники. Неограничивающие примеры последовательностей для управления экспрессией включают в себя промоторы, инсуляторы, сайленсеры, чувствительные элементы, интроны, энхансеры, сайты инициации, участки внутренней посадки рибосомы (IRES), сигналы терминации и поли(A) сигналы. В настоящем документе предусмотрена любая комбинация таких управляющих последовательностей (например, промотор и поли(A) сигнал). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы на основе gAAV содержат промотор, который является функционально связанным с кодирующей последовательностью трансгенов и облегчает экспрессию трансгенов.

Термин "промотор", используемый в контексте настоящего документа, относится к управляющему участку нуклеиновой кислоты, который контролирует инициацию и скорость транскрипции остальной части последовательности нуклеиновой кислоты. Промотор управляет транскрипцией последовательности нуклеиновой кислоты, которую он регулирует, следовательно, как правило, он располагается в сайте начала транскрипции гена или вблизи него. Например, промотор может иметь длину от 100 до 1000 нуклеотидов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор является функционально связанным с нуклеиновой кислотой или последовательностью нуклеиновой кислоты (нуклеотидной последовательностью). Промотор считается "функционально связанным" с последовательностью нуклеиновой кислоты, которую он регулирует, когда промотор присутствует в корректном функциональном местоположении и ориентации относительно последовательности, благодаря чему промотор регулирует (например, контролирует ("управляет") инициацию транскрипции и/или экспрессию) этой последовательности.

Промоторы, которые можно применять в соответствии с настоящим раскрытием, могут включать любой промотор, который управляет экспрессией трансгенов в сердце субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор может представлять собой тканеспецифичный промотор. Используемый в контексте настоящего документа термин "тканеспецифичный промотор" относится к промоторам, которые могут функционировать только в конкретном типе ткани, например, в сердце. Следовательно, "тканеспецифичный промотор" не способен управлять экспрессией трансгенов в других типах тканей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор, который можно применять в соответствии с настоящим раскрытием, представляет собой ограниченный тканями сердца промотор. Например, промотор представляет собой ограниченный тканями сердца промотор, выбранный из промотора сердечного тропонина С, сердечного тропонина I и сердечного тропонина Т (сTnT).

В качестве альтернативы, промотор может представлять собой, без ограничения, промотор из одного из следующих генов: ген тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина, ген тяжелой цепи  $\beta$ -миозина, ген 2v легкой цепи миозина (MLC-2v), ген 2a легкой цепи миозина, ген CARP, ген сердечного  $\alpha$ -актина, ген сердечного мускаринового ацетилхолинового рецептора m2, ANF, ген сердечного тропонина С, ген сердечного тропонина I, ген сердечного тропонина Т (сTnT), ген сердечной Са-АТФазы саркоплазматического ретикулула, ген скелетного а-актина; или искусственный сердечный промотор, полученный из гена MLC-2v.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления раскрытых векторов на основе gAAV два

или больше трансгенов функционально управляются одним промотором. В соответствии с другими вариантами осуществления каждый из двух или больше трансгенов функционально управляется отдельным промотором.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы на основе gAAV согласно настоящему раскрытию дополнительно содержат участок внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES представляет собой нуклеотидную последовательность, которая обеспечивает возможность инициации трансляции в середине последовательности матричной РНК (мРНК) в рамках большего процесса синтеза белка. Обычно у эукариот трансляция может иницироваться только на 5'-конце молекулы мРНК, поскольку распознавание 5'-кэп группы требуется для сборки иницирующего комплекса. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления IRES располагается между трансгенами. В соответствии с такими вариантами осуществления белки, кодируемые различными трансгенами, транслируются отдельно (т.е. в сравнении с транслируемым в виде гибридного белка).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы на основе gAAV согласно настоящему раскрытию дополнительно содержат сигнал полиаденилирования (pA). Эукариотические мРНК, как правило, транскрибируются в виде предшественника мРНК. Предшественник мРНК подвергается процессингу с образованием зрелой мРНК, включающему в себя процесс полиаденилирования. Процесс полиаденилирования начинается, когда транскрипция гена завершается. Ближайший к 3'-концу сегмент новообразованного предшественника мРНК вначале отщепляется набором белков. Эти белки затем синтезируют поли(А)-хвост на 3'-конце РНК. Сайт расщепления, как правило, содержит сигнал полиаденилирования, например, AAUAAA. Поли(А)-хвост является важным для экспорта из ядра, трансляции и стабильности мРНК.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы на основе gAAV согласно настоящему раскрытию содержат, в порядке от 5'- к 3'-концу, по меньшей мере последовательность первого инвертированного концевой повтора (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV), промотор, функционально связанный с первым трансгеном, IRES, функционально связанный со вторым трансгеном, сигнал полиаденилирования и последовательность второго инвертированного концевой повтора (ITR) AAV.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления gAAV является кольцевым. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе gAAV является линейным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе gAAV является одноцепочечным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе gAAV является двухцепочечным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV. Любой вектор на основе gAAV, описанный в настоящем документе, может быть заключен в вирусный капсид, такой как капсид AAV6 или любого другого серотипа (например, серотипа, который относится к тому же серотипу, что и последовательности ITR).

Ниже описаны иллюстративные векторы на основе gAAV согласно настоящему раскрытию. Векторы, проиллюстрированные ниже, содержат линейаризованные последовательности плазмид, изложенных в виде SEQ ID NO: 9-12. Векторы согласно настоящему раскрытию могут содержать нуклеотидные последовательности, которые являются по меньшей мере на 70% идентичными, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичными, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичными, по меньшей мере приблизительно на 95% идентичными, по меньшей мере приблизительно на 96% идентичными, по меньшей мере приблизительно на 97% идентичными, по меньшей мере приблизительно на 98% идентичными, по меньшей мере приблизительно на 99% идентичными, по меньшей мере приблизительно на 99,5% идентичными или по меньшей мере приблизительно на 99,9% идентичными последовательностями, изложенным в виде SEQ ID NO: 9-12. Эти последовательности снабжены примечаниями в виде следующих обозначений.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из раскрытых последовательностей векторов на основе нуклеиновой кислоты gAAV содержат усечения на 5'- или 3'-конце относительно последовательностей с любым из SEQ ID NO: 9-12. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из векторов на основе gAAV содержат нуклеотидную последовательность, которая отличается от последовательности с любым из SEQ ID NO: 9-12 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или более чем на 18 нуклеотидов.

pAAVsc.cTnT.Opt.hARC\_Opt.hS100A1 (SEQ ID NO: 9)

ctggcgctcgtcgtcactgagccgcccgggcaagccggcgctggcgacclttggcgcggcctcagtgagcgagcg  
agcgcgagaggggaggtgtagccatgctctaggaagatcaattcaattcacgctggaattgcccttaacggccccccctcgaagtc  
gggataaaagcagctcggcctttcacatgacagcatctgggctcggcagagggctcgggccaagcctcccttatcagctccccag  
ccctggagagtgacagctgctgctgtgtcagcccctgggcactcacgtatctccctccgacgggtttaaaatagcaaaactctgag  
ccacacaatagcttggccttatatggctccttggggaaaggggagcacggagggggccggcctcctccaaaatagcagct  
cacaagtgttcattcctctcgtggcggggcacattcctcctgctgctgcccggccggggggggcgccggggggacctaagcctt  
gcccccaaggagcccttcccagacagccggccgacccaccctccctgggagcgtcccgaagccttagaggaatccagcttaagg  
ctagagtacttaatacgactactataggctagcgccaccATGGGGAATGCCAAGAAAGGCCTTCTGAGACT  
ATAGACCGCGAGCGCAAGAGGCTTGTAGAACTTGCAGGCGGACTCTGGTCTCTTG  
CTGGACGCTCTGCTTGCAGGGGGTGTCTGACTGGACCGGAGTACGAAGCATTGGAT  
GCCCTTCTGATGCAGAGACGAGTTAGACGCCTGTTGCTTCTTGTGCAAGGCAAGG  
GTGAAGCCGCCTGTCAAGAGCTCCTGAGGTGTGCTCAACGAACCCGCCGGGGCCAG  
ATCCGGCATGGGATTGGCAACATGTGGGGCCCGGTATCGGGACCGGAGCTACGATC  
CACCATGCCCGGGTCAATTGGACGCCGGAGGCTCCAGGATCTGGTACAACATGCCAG  
GACTCCCAAGAGCCAGTGACCCCGATGAAGCTGGAGGCCCGGAGGGCAGTGAAGCCG  
TACAGAGCCGTACCCAGAAGAACCAGAACCCGGAGCTGGAGGCTGAAGCTAGTAAAG  
AGGCGGAACCTGAACCCGAACCCGAGCCTGAGCTCGAGCCAGAGGCTGAGGCCGAGC  
CAGAGCCTGAATCGAACCCGAACCTGATCCAGAACCAGAGCCGACTTCGAGGAAC  
GGGATGAGTCAGAGGATTCTTGAactagtgcgtaccaggtcccctcctccccccttaacgttactgcccgaa  
gcccgttggataagcccgtatgctgttctctatatgtttttccacatattgccctcttttggcaatgtgaggcccggaaacctggccct  
gtctcttgcagcagcattcctaggggtcttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaagcaagcagttcctctggaag  
cttcttgaagacaaaacacgtctgtagcgacctttgcaaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgctctcggccaaaagccac  
gtgtataagatacacctgcataagggcgacacacccagtgccacgttggatgttgatgttggaaaagtgcaaatggctcctcaagc  
gtattcaacaagggcctgaaggatgcccaagaagtaaccattgtatggatctgatctggggcctcgtgcacatgctttacatgtgtttagt  
cgaggttaaaaaactgtcaggccccgaaccacgggacgtggtttcttftgaaaaacacgatataagcttgcacacactgggcca  
ccATGGGCAGCGAGCTGGAGACCCGCATGGAGACCTGATCAACGNTTCCACG  
CCCACAGCGGCAAGGAGGGCGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAA  
GGAGCTGCTGCAGACCGAGCTGAGCGGCTTCTGGACGCCCAGAAGGACGTN  
GACGCCGTNGACAAGGTNATGAAGGAGCTGGACGAGAACGGCGACGGCGAGG  
TNGACTTCCAGGAGTACGTNGTNGTGGTNGCCCGCCTGACCGTNGCCTGCAAC  
AACTTCTTCTGGGAGAACAGCTGAgcggccgcatgataccgtgactagagctcgtgatcagcctgactgt  
gccttctagttgccaccatctgttttggcccctccccctgctctcttgaccctggaagtgccactcccactgtccttcttaataaaatga  
ggaaattgcatcgacttctgtagtaggtgtcattctattctgggggtggggcaggacagcaaggggaggtgggagacaa  
tagcaggcgataaggatctctagagcatggctacgtatagataaagatagcagcgggttaatacattacaaggaacccctagtgatgga  
gttggccactcctctctcgcctcctcctcactgagccggcgaccaaaggtcggccgacggcgcttggccggcgccct  
cagtgaacgaagcagcgcag

- Обозначение:
- ITR
- Промотор cTnT
- hARC\_Opt
- IRES hS100A1 Opt

pAAVsc.cTnT.Opt.hS100A1\_Opt.hARC (SEQ ID NO: 10)

ctggcgctcgtcgtcactgagccgcccgggcaagccggcgctggcgacclttggcgcggcctcagtgagcgagcg  
agcgcgagaggggaggtgtagccatgctctaggaagatcaattcaattcacgctggaattgcccttaacggccccccctcgaagtc  
gggataaaagcagctcggcctttcacatgacagcatctgggctcggcagagggctcgggccaagcctcccttatcagctccccag  
ccctggagagtgacagctcgtgctgtgtcagcccctgggcactcacgtatctccctccgacgggtttaaaatagcaaaactctgag  
ccacacaatagcttggccttatatggctccttggggaaaggggagcacggagggggccggcctcctccaaaatagcagct



Обозначение:

ITR

Промотор cTnT

hS100A1

IRES

hARC\_Opt

полиА сигнал BGH

pAAVsc.cTnT.hARC\_Opt.hS100A1 (SEQ ID NO: 12)

ctggcgctcctcgtcactcagggccgcccgggcaagcccgggctggcgacctttggctcccggcctcagtgagcgagcg  
agcgcgagagggagtgtagccatgctctaggaagatcaattcaattcacgctggaattcgccctaacgggccccctgaggtc  
ggataaaaagcagctcggctttcacatgacagcatctgggctcggcagaggtcgggtccgaagcctccttatcagcgtcccag  
ccctggaggtgacagctggctgcttctcagcccctcggcactcagctatcctccgacgggtttaaataagcaaaactctgag  
ccacacaatagcttggcttatatggctcctgctggggaaggggagcagcggggggccggcctcctcgcacaaatagcagct  
cacaagtgttcattcctcctcggcggcggcaccattcctcctcctcctcggcggcggggtggcggcgggggaccttaagcctc  
gcccccaaggaccctcccagacagcccggcaccaccgctccgtggagcagctcccgaagctcgaagatccagccttaagg  
ctagagtacttaatagactactataggctagcggcaccATGGGGAATGCCAAGAAAGGCCTTCTGAGACT  
ATAGACCGCGAGCGCAAGAGGCTTGTAGAAAACCTTGCAGGGCGACTCTGGTCTCTTG  
CTGGACGCTCTGCTTGCAGGGGTGTTCTGACTGGACCGGAGTACGAAGCATTGGAT  
GCCCTTCTGATGCAGAGAGACGAGTTAGACGCCTGTTGCTTCTGTGCAAGGCAAGG  
GTGAAGCCGCTGTCAAGAGCTCCTGAGGTGTGCTCAACGAACCGCCGGGGCCAG  
ATCCGCGATGGGATTGGCAACATGTGGGGCCCGGCTATCGGGACCGGAGCTACGATC  
CACCATGCCCGGGTCATTGGACGCCGGAGGCTCCAGGATCTGGTACAACATGCCAG  
GACTCCCAAGAGCCAGTGACCCCGATGAAGCTGGAGGCCCGAGGGCAGTGAAGCCG  
TACAGAGCGGTACCCAGAAGAACCAGAACCGGAGCTGGAGGCTGAAGCTAGTAAAG  
AGGCGGAACCTGAACCCGAACCGGAGCCTGAGCTCGAGCCAGAGGCTGAGGCCGAGC  
CAGAGCCTGAACTCGAACCCGAACCTGATCCAGAACCAGAGCCCGACTTCGAGGAAC  
GGATGAGTCAGAGGATTCTTGAactagtgcgtaccaggtcccctcctccccccccctaacgttactggccgaa  
cccgttggataaagcccggtgctgtttgtctatatgttattttccacatattcccttttggcaatgtgagggcccgaacctggccct  
gtctcttgacgagcctctaggggtcttccctctcgcacaaggaatgcaagctctgtggaatgtcgtgaaagcagctcctctggaag  
cttcttgaagacaacaacgtctgtagcagcccttgcaggcagcggaaacccccacctggcagacaggtgcctctcggcccaaaagccac  
gtgtataagatacacctgcaaaagcggcacaaccccagtgccacgttctgagttggatgttggaaaagatcaaatggctcctcaagc  
gtattcaacaaggggctgaaggatgcccaagaagtacccattatgggatctgatctgggcccctggctcacatgctttacatgttttagt  
cgaggttaaaaaacgtctagggccccgaaccacggggacgtggtttccttgaaaaaacgatgataagcttgcacaaacctgggcca  
ccatgggtctctgagctggagacggcagtgagacccctcatcaactgttccacgcccactcgggcaaaaggggggacaagtaca  
agctgagcaagaaggagctgaaagagctgctgcagacggagctcctcctctggatgccagaaggatgtggatgctgtgga  
caagggtagaaggagctagcagagaatggagacggggaggtggactccaggagtatgtggtctgtggtcctcctcacagt  
gctgttaaacatttcttctgggagaacagttgacggccgcatcgataccgtcgactagagctcgtgatcagcctcagctgctccttcta  
gttccagccatctgtgttggcccctccccgtccttcttgaccctggaaggtgccactcccactgctccttctaataaaatgaggaaatt  
gcatcgattgtctgtaggtgtcattctctgggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaaacacaatagcag  
gcgataagatcttctagatgctacgtagataagtagcatggcgggttaacttaactacaaggaaccctagtgatgaggtggc  
ctcctcctcctcgcgctcctcactgagggccggcgaccaaaagctcggcggcggcggccttggccggcgccctcagtgag  
cgagccgagccgag

Обозначение: ITR

Промотор cTnT hARC\_Opt

IRES hS100A1

полиА сигнал BGH

### Частицы рекомбинантного AAV (rAAV)

В настоящем документе также представлены вирусные частицы гAAV или препараты гAAV, содержащие такие частицы. Частицы гAAV содержат вирусный капсид и вектор на основе гAAV, который описан в настоящем документе, который заключен в вирусный капсид. Способы получения частиц гAAV являются известными в уровне техники и являются коммерчески доступными (см., например, Zolotukhin et al. Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. Methods 28 (2002) 158-167; и публикации заявок на патент США с номерами US 2007/0015238 и US 2012/0322861, которые включены в данный документ посредством ссылки; и плазмиды и наборы, доступные от ATCC и Cell Biolabs, Inc.). Например, плазмиду, содержащую вектор на основе гAAV, можно сочетать с одной или несколькими плазмидами-помощниками, например, которые содержат ген гер (например, кодирующий Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40) и ген сар (кодирующий VP1, VP2 и VP3, в том числе модифицированный участок VP3, который описан в настоящем документе), и трансфицировать в линию клеток-продуцентов таким образом, чтобы частица гAAV могла быть упакована и в дальнейшем очищена.

Частицы гAAV или частицы в препарате гAAV, раскрытом в настоящем документе, могут относиться к любому серотипу AAV, в том числе к любому производному или псевдотипу (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 2/1, 2/5, 2/8, 2/9, 3/1, 3/5, 3/8 или 3/9). При использовании в контексте настоящего документа серотип гAAV у частицы гAAV относится к серотипу белков капсида у рекомбинантного вируса. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица гAAV представляет собой гAAV6 или гAAV9. Неограничивающие примеры производных и псевдотипов включают в себя AAVrh.10, AAVrh.74,

AAV2/1, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/8, AAV2/9, гибрид AAV2-AAV3, AAVhu.14, AAV3a/3b, AAVrh32.33, AAV-HSC15, AAV-HSC17, AAVhu.37, AAVrh.8, CHt-P6, AAV2.5, AAV6.2, AAV2i8, AAV-HSC15/17, AAVM41, AAV9.45, AAV6(Y445F/Y731F), AAV2.5T, AAV-HAE1/2, клон 32/83 AAV, AAVShH10, AAV2 (Y->F), AAV8 (Y733F), AAV2.15, AAV2.4, AAVM41 и AAVr3.45. Такие серотипы и производные/псевдотипы AAV и способы получения таких производных/псевдотипов являются известными в уровне техники (см., например, Mol Ther. 2012 Apr;20(4):699-708. doi: 10.1038/mt.2011.287. Epub 2012 Jan 24. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. Asokan A1, Schaffer DV, Samulski RJ.). В соответствии с конкретными вариантами осуществления капсид у любой из раскрытых в настоящем документе частиц гAAV относится к серотипу AAVrh.10. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления капсид относится к серотипу AAV2/6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частица гAAV представляет собой частицу псевдотипированного гAAV, которая содержит (а) вектор на основе гAAV, содержащий ITR из одного серотипа (например, AAV2, AAV3), и (b) капсид, состоящий из белков капсида, полученных из другого серотипа (например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10). Способы получения и применения векторов на основе псевдотипированного гAAV являются известными в уровне техники (см., например, Duan et al., J. Virol., 75:7662-7671, 2001; Halbert et al., J. Virol., 74:1524-1532, 2000; Zolotukhin et al., Methods, 28:158-167, 2002; и Auricchio et al., Hum. Molec. Genet., 10:3075-3081, 2001).

### **Генная терапия с применением гAAV для заболеваний сердца**

Настоящее раскрытие также направлено на композиции, содержащие одну или несколько их раскрытых частиц гAAV или препаратов гAAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления препарат гAAV содержит частицу гAAV, содержащую вектор на основе гAAV, содержащий ITR первого серотипа (например, AAV3, AAV5, AAV6 или AAV9), и белки капсида, заключающие вектор на основе гAAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белки капсида относятся к первому серотипу (например, AAV3, AAV5, AAV6 или AAV9). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления препарат характеризуется по меньшей мере в четыре раза большей эффективностью трансдукции (например, в линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека, такой как Huh7) по сравнению с препаратом, полученным с применением вектора на основе гAAV, содержащего ITR AAV2.

Как описано в настоящем документе, такие композиции могут дополнительно содержать фармацевтическое вспомогательное вещество, буфер или разбавитель, и они могут быть составлены для введения в клетку-хозяин *ex vivo* или *in situ* животному и, в особенности, в организм человека. Кроме того, такие композиции могут необязательно содержать липосому, липид, липидный комплекс, микросферу, микро-частицу, наносферу или наночастицу, или они могут быть иным образом составлены для введения в клетки, ткани, органы или организм субъекта-человека, нуждающегося в этом. Такие композиции могут быть составлены для применения в ряде методов терапии, таких как, например, при ослаблении, предупреждении и/или лечения состояний, таких как недостаточность пептида, недостаточность полипептида, сверхэкспрессия пептида, сверхэкспрессия полипептида, в том числе, например, состояний, которые приводят в результате к заболеваниям или нарушениям, которые описаны в настоящем документе.

Векторы на основе гAAV, частицы гAAV или композицию, содержащую частицы гAAV согласно настоящему раскрытию, можно применять для генной терапии заболеваний сердца у субъекта-человека, нуждающегося в этом. Примеры заболевания сердца, лечение которых можно осуществлять с применением способов и композиций согласно настоящему изобретению, включают в себя, без ограничения, кардиомиопатию и острую ишемию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кардиомиопатия сердца представляет собой гипертрофическую кардиомиопатию или дилатационную кардиомиопатию. Сердечная недостаточность, вызванная кардиомиопатией или другими заболеваниями сердца, включает две составляющих: дисфункцию транспорта кальция и апоптоз. Векторы на основе гAAV, частицы гAAV и композиции, содержащие частицы гAAV, можно применять для лечения таких случаев сердечной недостаточности при введении субъекту, нуждающемуся в этом, например, посредством сосудистой доставки в коронарные артерии и/или непосредственной инъекции в сердце. Векторы на основе гAAV, частицы гAAV и композиции, содержащие частицы гAAV, управляют одновременной экспрессией белка cS100A1 и белков ARC в кардиомиоцитах субъекта. S100A1 улучшает аспекты транспорта кальция, включающие в себя нормализацию кальциевых транзиентов саркоплазматического ретикула, приводящую к нормализации сократительной функции. ARC будет блокировать апоптоз, инициируемый митохондриальными и немитохондриальными механизмами (такими как индуцируемый растяжением апоптоз), а также улучшать функцию митохондрий. Таким образом, синергические благоприятные воздействия двух белков, экспрессируемых трансгенами согласно настоящему раскрытию, могут приводить к лучшим долговременным результатам лечения вследствие целенаправленного воздействия на оба аспекта кардиомиопатии.

Аминокислотные последовательности полученных от человека белков S100A1 и ARC описаны ниже.

Человеческий ARC:

MGNAQERPSETIDRERKRLVETLQADSGLLLDALLARGVLTGPPEYEALDALPDA  
 ERRVRRLLLLVQGKGEAACQELLRCAQRTAGAPDPAWDWQHVGPGYRDRSYDPPCPG  
 HWTPEAPGSGTTCPLPRASDPDEAGGPEGSEAVQSGTPEEPEPELEAEASKEAEPEPEP  
 EPELEPEAEAEPEPEPEPEPDPEPEPDFEERDESEDS (SEQ ID NO: 13)

Человеческий S100A1:

MGSELETAMETLINVFHAHSGKEGDKYKLSKKELKELLQTELSGFLDAQKDVDA  
 VDKVMKELDENGDEGEVDFQEYVVLVAALTVACNNFFWENS (SEQ ID NO: 14)

В соответствии с некоторыми аспектами раскрытые векторы на основе гAAV кодируют белок, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 13 или 14. В соответствии с некоторыми аспектами раскрытые векторы на основе гAAV кодируют первый белок, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 13, и второй белок, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99,5% идентичную SEQ ID NO: 14. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV кодирует белок, который содержит SEQ ID NO: 13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV кодирует белок, который содержит SEQ ID NO: 14. В соответствии с конкретными вариантами осуществления вектор на основе гAAV кодирует первый белок, который содержит SEQ ID NO: 13, и второй белок, который содержит SEQ ID NO: 14.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из раскрытых векторов на основе гAAV кодируют последовательность первого белка, которая отличается от последовательности с одним из SEQ ID NO: 13 или 14 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более чем на 12 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любые из раскрытых векторов на основе гAAV кодируют белки, которые являются усеченными на 1, 2, 3 или более чем на 3 аминокислоты на N- или C-конце относительно любых из последовательностей с SEQ ID NO: 13 или 14.

Следовательно, другие аспекты настоящего раскрытия, связанные с введением субъекту, нуждающемуся в этом, частиц гAAV согласно настоящему раскрытию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления количество частиц гAAV, вводимых субъекту, может составлять величину порядка от приблизительно  $10^6$  до приблизительно  $10^{14}$  частиц/мл, или от приблизительно  $10^3$  до приблизительно  $10^{13}$  частиц/мл, или любые значения в пределах одного из этих диапазонов, такие как, например, приблизительно  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  или  $10^{14}$  частиц/мл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления количество частиц гAAV, вводимых субъекту, может составлять величину порядка от приблизительно  $10^6$  до приблизительно  $10^{14}$  геномов вектора (vgs)/мл, или от  $10^3$  до  $10^{15}$  vgs/мл, или любые значения в пределах одного из этих диапазонов, такие как, например, приблизительно  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  или  $10^{14}$  vgs/мл. Частицы гAAV можно вводить в виде однократной дозы или ее можно разделить на два или больше введений, которые могут требоваться для осуществления терапии конкретного заболевания или нарушения, подлежащего лечению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъекту доставляют дозы, находящиеся в диапазоне от приблизительно 0,0001 мл до приблизительно 10 мл.

Если это желательно, частицы гAAV и векторы на основе гAAV также можно вводить в комбинации с другими средствами, такими как, например, белки или полипептиды или различные фармацевтически активные средства, в том числе с одним или несколькими введениями терапевтических полипептидов, биологически активных фрагментов или их вариантов. В действительности, практически нет ограничений другими компонентами, которые также могут быть включены, при условии, что дополнительные средства не вызывают значительное неблагоприятное воздействие при контакте с клетками-хозяевами или тканями-хозяевами. Таким образом, частицы гAAV или препараты гAAV могут доставляться вместе с различными другими фармацевтически приемлемыми средствами, которые требуются в конкретном случае. Такие композиции можно очищать от клеток-хозяев или других биологических источников, или, в качестве альтернативы, они могут быть получены с помощью химического синтеза, как описано в настоящем документе.

Составы, содержащие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и/или растворы-носители, являются хорошо известными специалистам в данной области техники, как и разработка подходящих схем дозирования и лечения для применения конкретных композиций, описанных в настоящем документе, в ряде схем лечения, в том числе, например, для перорального, парентерального, внутривенного, интраназального, внутрисуставного и внутримышечного введения и получения составов.

Как правило, эти составы могут содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% терапевтического средства (например, частица гAAV, или препарат гAAV, и/или вектор на основе гAAV) или большее количество, хотя процентное содержание активного(активных) ингредиента(ингредиентов), конечно, может варьировать и может в подходящем случае составлять от приблизительно 1 или 2% до приблизительно 70 или 80% массы или объема всего состава или больше. Естественно, количество терапевтического(терапевтических) средства(средств) в каждой пригодной с терапевтической точки зрения компози-

ции может быть приготовлено таким образом, что подходящая дозировка будет получена при любой заданной стандартной дозе соединения. Такие факторы, как растворимость, биологическая доступность, биологический период полувыведения, путь введения, срок хранения продукта, а также другие фармакологические особенности, будут учитываться специалистом в данной области техники при приготовлении таких фармацевтических составов. Кроме того, желательными могут быть ряд дозировок и схем лечения.

В определенных обстоятельствах желательной будет доставка частиц гAAV, или препаратов гAAV, и/или векторов на основе гAAV в составленных подходящим образом фармацевтических композициях, раскрытых в настоящем документе; с помощью любого из подкожного, внутрисосудистого, внутрисердечного, внутриглазного, интравитреального, парентерального, подкожного, внутривенного, интрацеребровентрикулярного, внутримышечного, интратекального, перорального, внутрибрюшинного введения, с помощью пероральной или назальной ингаляции или с помощью непосредственной инъекции в одну или несколько клеток (например, в кардиомиоциты и/или другие клетки сердца), тканей или органов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частицы гAAV или композиции, содержащие частицы гAAV согласно настоящему изобретению, вводят посредством внутрисосудистого введения в коронарные артерии. В соответствии с другими вариантами осуществления раскрытые частицы гAAV или композиции вводят с помощью непосредственной инъекции в сердце субъекта. Непосредственная инъекция в сердце может включать инъекцию в одну или несколько из тканей миокарда, выстилки сердца или скелетной мышцы, окружающей сердце, например, с применением игольчатого катетера.

Фармацевтические составы композиций, подходящих для инъекционного применения, включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состав является стерильным и текучим настолько, насколько это обеспечивает возможность легкого введения с помощью шприца. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления форма является стабильной при условиях производства и хранения и защищена от контаминирующего воздействия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, солевой раствор, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси, растительные масла или другие фармацевтически приемлемые носители, такие как те, которые, в целом, признаны безопасными (Generally Recognized as Safe) (GRAS) Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств Соединенных Штатов Америки. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет применения покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет применения поверхностно-активных веществ.

Термин "носитель" относится к разбавителю, вспомогательному средству, вспомогательному веществу или среде, с которыми вводят частицу гAAV, или препарат гAAV, и/или векторы на основе гAAV. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе масла, происходящие из нефти, такие как минеральное масло, растительное масло, такие как арахисовое масло, соевое масло и минеральное масло, масло животного происхождения или масло синтетического происхождения. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей.

Например, в случае введения инъекционного водного раствора раствор может быть подходящим образом стабилизирован буфером, если необходимо, и жидкий разбавитель вначале делают изотоничным с использованием достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы являются особенно подходящими для внутривенного, внутримышечного, интравитреального, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим, стерильная водная среда, которую можно использовать, будут известны специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотоничного раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для подкожной инфузии, либо вводить инъекцией в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 и 1570-1580). Некоторое изменение дозировки обязательно будет происходить в зависимости от состояния субъекта, получающего лечение. В этом случае лицо, ответственное за введение, будет определять подходящую дозу для отдельного субъекта. Более того, в случае введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты, которые требуются, например, стандартами Отдела исследования биологических препаратов FDA.

Стерильные инъекционные растворы готовят посредством включения частиц гAAV или препаратов гAAV, белков Rep и/или векторов на основе гAAV в требуемом количестве в соответствующий растворитель с несколькими из других ингредиентов, перечисленных выше, если это требуется, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят посредством включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются методики вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые дают на выходе порошок активного ингредиента, а также любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, ранее подвергнутого стерилизации фильтрованием.

Количество композиций с частицами гААV, или препаратом гААV, и/или вектором на основе гААV и время введения таких композиций будут находиться в рамках компетенции квалифицированного специалиста в данной области техники с учетом преимуществ информации из настоящего документа. Тем не менее, вероятно, что введение терапевтически эффективных количеств композиций согласно настоящему раскрытию может быть достигнуто с помощью однократного введения, такого как, например, однократная инъекция достаточных количеств инфекционных частиц для обеспечения терапевтического благоприятного воздействия на пациента, подвергающегося такому лечению. В качестве альтернативы, в некоторых обстоятельствах желательным может быть обеспечение нескольких или последовательных введений композиций с частицей гААV, или препаратом гААV, и/или вектором на основе гААV либо в течение относительно короткого или относительно продолжительного периода времени, который может быть определен практикующим врачом, осуществляющим надзор за введением таких композиций.

Композиции согласно настоящему раскрытию могут включать в себя частицы гААV, или препараты гААV, и/или векторы на основе гААV либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными ингредиентами, которые могут быть получены из природных источников, или с помощью технологии рекомбинантной ДНК, или с помощью химического синтеза. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления частицы гААV или препараты гААV вводят в комбинации, либо в одной композиции, либо в составе одной схемы лечения, с ингибитором протеасомы, таким как бортезомиб, или гидроксимочевинной.

В случае использования в контексте настоящего документа термина "лечение" применительно к заболеванию он означает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного проявления или симптома заболевания или нарушения, воздействие которого испытывает субъект. Композиции, описанные выше, как правило, вводят субъекту в эффективном количестве, которое представляет собой количество, способное обеспечивать желаемый результат. Желаемый результат будет зависеть от вводимого активного средства. Например, эффективное количество частиц гААV может представлять собой количество частиц, которые способны переносить гетерологичную нуклеиновую кислоту в орган, ткань или клетку хозяина.

Токсичность и эффективность композиций, используемых в способах согласно настоящему раскрытию, могут быть определены с помощью стандартных фармацевтических процедур с применением либо клеток в культуре, либо экспериментальных животных для определения LD<sub>50</sub> (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение между токсичностью и эффективностью дозы представляет собой терапевтический индекс, и он может быть выражен в виде соотношения LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Предпочтительными являются те композиции, которые демонстрируют большие терапевтические индексы. Несмотря на то что можно применять композиции, которые проявляют токсичные побочные эффекты, следует уделить внимание созданию системы доставки, которая сводит к минимуму потенциальное повреждение от таких побочных эффектов. Дозировка композиций, которые описаны в настоящем документе, обычно находится в пределах диапазона, который включает в себя ED<sub>50</sub> с малой токсичностью или без токсичности. Дозировка может изменяться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой дозировки и пути введения.

Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к способам и препаратам для применения у субъекта, такого как субъекты-люди или отличные от людей субъекты, в клетке-хозяине *in situ* у субъекта или клетке-хозяине, полученной от субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой животное-компаньон. Используемый в контексте настоящего документа термин "животное-компаньон" относится к домашним любимцам и другим домашним животным. Неограничивающие примеры животных-компаньонов включают в себя собак и кошек; сельскохозяйственных животных, таких как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы и куры; а также других животных, таких как мыши, крысы, морские свинки и хомяки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой карликовую свинью или минипига. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой субъекта-человека.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет или предположительно имеет заболевание сердца, лечение которого можно осуществлять с помощью генной терапии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет сердечную недостаточность на любой из стадий. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сердечная недостаточность вызвана кардиомиопатией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сердечная недостаточность вызвана гипертрофической кардиомиопатией или дилатационной кардиомиопатией.

Предполагают, что следующие примеры являются иллюстративными для определенных вариантов осуществления настоящего раскрытия, и предполагают, что они являются неограничивающими. Полное содержание всех источников (в том числе литературные источники, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и патентные заявки, находящиеся на совместном рассмотрении), цитируемых в данной заявке, тем самым специально включено с помощью ссылки.

### Примеры

Пример 1. Целенаправленное терапевтическое воздействие на несколько аспектов сердечной недос-

таточности

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к композициям и способам, которые являются полезными в лечении одного или нескольких болезней сердца (например, кардиомиопатии, гипертрофической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, сердечной недостаточности, заболевания сердца и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции, представленные в настоящем раскрытии, вводят посредством внутрисосудистого введения в коронарные артерии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции можно вводить субъекту с помощью нескольких непосредственных инъекций в сердце. Иллюстративная конструкция на основе AAV, которую можно вводить субъекту, представлена на фиг. 1. В соответствии с определенными вариантами осуществления такая иллюстративная конструкция заключена в капсид рекомбинантного AAV (например, AAVrh.10 или AAV6) и содержит кодирующие последовательности кальций-связывающего белка S100A1 (S100A1) и репрессора апоптоза с доменом рекрутинга каспазы (ARC) для воздействия на два отдельных аспекта одной или нескольких болезней сердца (например, кардиомиопатии). Оба транскрипта в иллюстративной конструкции на фиг. 1 управляются промотором сердечного TnT и, следовательно, будут экспрессироваться только в кардиомиоцитах.

S100A1 улучшает аспекты транспорта кальция, включающие в себя нормализацию кальциевых транзиентов саркоплазматического ретикулума, приводящую к нормализации сократительной функции. ARC будет блокировать апоптоз, инициируемый митохондриальными и немитохондриальными механизмами (например, индуцируемый растяжением апоптоз), а также улучшать функцию митохондрий. На эти две отдельных составляющих сердечной недостаточности (дисфункция транспорта кальция и апоптоз) воздействовали по отдельности, но никогда совместно. В связи с этим синергические благоприятные воздействия такого подхода обеспечивают возможные методы лечения, которые могут приводить в результате к улучшенным долгосрочным результатам. Благодаря целенаправленному воздействию на оба аспекта кардиомиопатии, композиции и способы, представленные в настоящей заявке, можно применять для воздействия на несколько болезней сердца (например, гипертрофическую или дилатационную кардиомиопатию), и они будут благоприятными на любой стадии сердечной недостаточности.

Все публикации, патенты и записи в базах данных последовательностей, упомянутые в описании в настоящем документе, таким образом включены в настоящий документ во всей своей полноте, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация или патент были специально и отдельно включены посредством ссылки. В случае конфликта преимущественную силу будет иметь настоящая заявка, в том числе любые определения в настоящем документе.

Пример 2. Генная терапия дилатационной кардиомиопатии у собак

Дилатационная кардиомиопатия (DCM) является второй по распространенности причиной приобретенного заболевания сердца у собак, наиболее часто поражающей собак крупных пород, таких как доберман-пинчеры, датские доги и ирландские волкодавы. У людей, пораженных этим заболеванием, возможны хирургические методы лечения, такие как трансплантация сердца и желудочковые аппараты вспомогательного кровообращения в левом желудочке. Тем не менее, в ветеринарной медицине единственный возможный метод лечения представляет собой лечебный контроль проявлений, ассоциированных с сердечной недостаточностью. Прогноз для пораженной собаки зависит от стадии заболевания и породы. Например, большинство доберман-пинчеров живут менее чем 6 месяцев после развития застойной сердечной недостаточности (CHF). В отличие от этого, другие породы, такие как коккер-спаниели, как правило, продолжают жить дольше. По мере того как заболевание сердца прогрессирует, нарушение функционирования каналов, которые регулируют движение кальция внутри клеток сердца, способствует аномалиям циклического изменения уровней ионов кальция, дополнительно нарушая регуляцию сокращения и расслабления сердца. Примечательно, что аномалии транспорта кальция были обнаружены у собак с DCM5 природного происхождения, а также встречаются при сердечной недостаточности на фоне многих разных причин заболевания.

Стратегии переноса генов, предназначенные для нормализации аномалий циклического изменения уровней ионов кальция, ослабляют заболевание сердца в моделях на мелких и крупных животных с различными формами заболевания сердца. На самом деле уже проходят клинические испытания у людей для исследования этого терапевтического подхода к кардиомиопатии, и предварительные результаты воодушевляют. В пилотном исследовании оценивали эффективность доставки генов, предназначенной для нормализации транспорта кальция у доберман-пинчеров, пораженных DCM и демонстрирующих CHF. Доберман-пинчеров использовали, поскольку DCM является широко распространенным у этой породы, и заболевание, как правило, прогрессирует быстро и единообразно у этой породы после того, как развилась CHF. Новые методы борьбы с DCM будут оказывать значительное воздействие все породы собак, предрасположенные к этому идиопатическому заболеванию, в том числе на доберман-пинчеров, боксеров, датских догов, немецких овчарок, золотистых ретриверов и т.д. Примечательно, что в предыдущих исследованиях уровней миокардиальных белков в образцах от собак с наиболее распространенными формами заболевания сердца естественного происхождения (дегенеративное заболевание клапана у собак и DCM) обнаружили, что уровни нескольких белков (в том числе S100A1) являлись аномальными (уровень S100A1 был пониженным).

Эти данные говорят о том, что целенаправленное воздействие на S100A1 с помощью доставки генов может обеспечивать эффективное лечение DCM, а также миокардиальной недостаточности, развивающейся на фоне дегенеративного заболевания клапана. Кроме того, апоптоз (программируемая гибель клетки) является более распространенным в пораженном заболевании миокарде, а ARC является сильнодействующим и многофункциональным ингибитором апоптоза. В настоящее время стандартом лечения для сердечной недостаточности в ветеринарии является медицинский контроль перегрузки жидкостью и застойных явлений. Методики доставки генов, направленные на аномальные регуляторные молекулы в миокарде, предоставляют связанную с механизмом мишень, которая впервые может позволить ветеринарному врачу специфически бороться патологическим процессом в миокарде. Более того, затраты, связанные с современными методиками получения векторов и внутримыокардиальной доставки генов в векторе, делают стоимость этого метода терапии доступной для многих хозяев, причем ожидается, что затраты будут со временем снижаться.

Минимально инвазивный способ переноса генов с применением векторов на основе AAV 2/6 привел в результате к трансдукции >75% клеток миокарда у нормальных собак (см., Bish LT, Sleeper MM, Brainard B., et al. Percutaneous transendocardial delivery of self-complementary adeno-associated virus 6 achieves global cardiac gene transfer in canines. *Mol. Ther.* 16, 1953-9 (2008)). Шесть нормальных беспородных собак получали обработку либо вектором на основе AAV2, либо вектором на основе AAV6, кодирующим доминантно-негативную форму фосфоламбана (dn-PLN) (псевдофосфорилированная форма, которая конкурирует с нативным фосфоламбаном, тем самым снижая его ингибирующий эффект в отношении SERCA2a) (n=4) или AAV2/6 dn-PLN и S100A1 (n=2). Все собаки оставались здоровыми с нормальным функционированием сердечно-сосудистой системы в течение 2 лет после обработки, что указывает на то, что терапия не вызывала миокардит или значительно изменяла сердечную деятельность, таким образом подтверждая безопасность этого терапевтического подхода. Сердечную деятельность можно измерить с помощью фракции выброса или с помощью любого другого способа, известного в уровне техники.

В действительности, инъекцию получали более 40 нормальных и пораженных заболеванием собак (см. ниже), и результаты на настоящий момент указывают на то, что методика введения инъекцией хорошо переносится. Кроме того, в 20 случайно выбранных случаях у собак в ветеринарной клинике Matthew J. Ryan Veterinary Hospital при Пенсильванском университете собирали образцы для анализа на антитела к rAAV2/6, и обнаружили, что титры находились в пределах приемлемого диапазона для лечения у 19 из 20 собак, что указывает на то, что предшествующие иммунные реакции не будут исключать значительную долю терапевтических кандидатов. Для определения того, являлся ли терапевтический подход эффективным для лечения DCM, португальские водяные собаки с тяжелой формой быстро прогрессирующей ювенильной DCM получали обработку. Примечательно, что собаки, получавшие инъекции AAV2/6 dn-PLN, демонстрировали выраженное снижение уровня фосфорилированного PLN, подтверждая потенциальную способность этого подхода к нормализации циклического изменения уровней ионов кальция в этой модели заболевания. Более того, доставка генов с использованием вектора, содержащего как dn-PLN, так и S100A1, замедляла развитие СНФ на фоне DCM в большей степени, чем доставка вектора, содержащего только dn-PLN. Вектор с комбинацией задерживал появление СНФ в среднем на 4 недели по сравнению с терапией только dn-PLN. По этой причине подход с вектором с комбинацией использовали в пилотном исследовании для определения того, является ли генная терапия эффективной для продления жизни доберманов, пораженных возникшей во взрослом возрасте DCM и застойной сердечной недостаточностью.

Исследование имеет ослепленный, плацебо-контролируемый план. Исходя из последних 12 случаев DCM и СНФ у доберман-пинчеров, которые получили обработку, среднее значение время дожития составляло 148 суток (стандартное отклонение составляет 160 суток). При использовании мощности критерия, составляющей 0,8, уровня альфа (2-сторонний), составляющего 0,05, и отношения случаев к контролям, составляющего 1, размер выборки 13 собак в каждой группе требуется для выявления различия в выживаемости за 6 месяцев. Этот расчет определяли с применением параметрического теста размера выборки. Включали двадцать шесть доберман-пинчеров с DCM и контролируемой СНФ. Для того чтобы собака соответствовала критериям включения, она должна была иметь титр циркулирующих нейтрализующих антител к AAV2/6, составляющий менее 1:20, и не иметь заболеваний за пределами сердца. Кроме того, собак с сопутствующим врожденным заболеванием сердца или свидетельством первичного митрального порока сердца исключали. В исходный момент времени (момент времени включения) титр антител, СВС (клинический анализ крови) и развернутый биохимический анализ крови использовали для скрининга. От собак получали электрокардиограмму (ЭКГ) в течение 3 мин и полную эхокардиограмму (ЕЧНО), и хозяева заполняли ранее валидированный опросник относительно качества жизни. ЭКГ оценивали в отношении длительности интервала и наличия аритмий. ЕЧНО включало в себя исследования 2D эхокардиографию, эхокардиографию в М-режиме и доплеровскую эхокардиографию (в том числе доплеровский анализ тканей). Рентгенограммы грудной клетки применяли для определения стадии заболевания (у собак клинически компенсируется застойная сердечная недостаточность в анамнезе).

Собак, удовлетворяющих требованиям для включения, произвольно включали в группу, получаю-

щую плацебо (инъекция солевого раствора в сердце) или в группу генной терапии (инъекция AAV2/6-ARC-s100a1 в сердце). Стандартный медицинский контроль для DCM и застойной сердечной недостаточности продолжался в течение всего исследования у всех собак (пимобendan, терапия ингибиторами ангиотензина и диуретиками). Солевой раствор вместо пустого капсула применяли в качестве терапии с плацебо вследствие того, что контрольные собаки могли подвергаться доставке генов, если группа, получавшая обработку, демонстрировала значительное улучшение по сравнению с группой плацебо. Через 2, 4, 6, 9 и 12 месяцев после терапии ЭКГ, ЭСНО, заполнение опросника относительно качества жизни и лабораторные анализы повторяли. Статистический анализ осуществляли с двухмесячными интервалами.

На фиг. 2 и 3 представлены данные в диастоле (расслабление) и систоле (сокращение), соответственно, у получавшей лечение мышечной дистрофии собаки. Эндокардиальные и эпикардиальные контуры можно увидеть на каждой из фигур. Данные указывали на стабильное или немного улучшенное функционирование после обработки в течение нескольких недель, как видно в табл. 1. В табл. 1 ниже представлены результаты в виде массы миокарда левого желудочка (LVM [г]), конечно-диастолического объема (EDV [мл]), конечно-систолического объема (ESV [мл]), ударного объема (SV [мл]), фракции выброса (EF [%]) и минутного объема кровообращения (CO [л/мин.]) на основании данных, полученных в момент времени 1 (перед обработкой) и момент времени 2 (после обработки).

Таблица 1

Дата сбора данных	LVM[г]	EDV[мл]	ESV[мл]	SV[мл]	EF[%]	CO[л/мин.]
Момент времени 2	91,395035	54,22289	24,595001	29,627889	54,640926	3,940509
Момент времени 1	87,251524	57,471229	25,660014	31,811215	55,351548	3,117499

Пример 3. Оценка дистрофических фенотипов после доставки вектора мышцам и собакам

Доставку генов в сердце с помощью AAV с применением самокомплементарного вектора S100A1/ARC оценивали в моделях мышечной дистрофии Дюшенна (недостаточность дистрофина) на мышцах и на собаках. Ранее, серотипы AAV8 (в том числе несколько его вариантов), AAV9 и AAVrh.10 сравнивали в отношении их способности к инфицированию сердца собак, и AAVrh.10 оказался наиболее эффективным. По этой причине AAVrh.10 применяли для всех экспериментов, описанных в этом примере.

Mdx мыши (с недостаточностью дистрофина) на фоне DBA/2J ("D2.mdx") в возрасте 4 недель получали инъекцию рекомбинантного вектора AAVrh. 10-S100A1/ARC (называемого ниже "терапевтическим AAV"), и их умерщвляли спустя 24 недели. D2.mdx мыши повторяют несколько характеристик миопатии при мышечной дистрофии Дюшенна у человека, такие как уменьшенная мышечная масса у мышц нижних частей задних конечностей, атрофированные мышечные волокна, повышенный фиброз и воспаление и мышечная слабость. В течение этого 24-недельного периода у мышей, которым вводили инъекцией терапевтический AAV, лучше сохранялись фракции выброса, развитие деформации и минутный объем кровообращения по сравнению с мышцами, получавшими инъекции плацебо (см. фиг. 4) согласно результатам измерения с помощью МРТ сердца. Анализ белков (вестерн-блоттинг) подтверждал, что уровни и S100A1, и ARC повышались в обработанных тканях по сравнению с контролями (получавшими инъекцию плацебо) (см. фиг. 5). Более того, гистологический анализ сердца демонстрировал, что обработанные сердца демонстрировали гораздо менее выраженную патологию по сравнению с контрольными сердцами (см. фиг. 6).

Две собаки с GRMD (с недостаточностью дистрофина), модель мышечной дистрофии Дюшенна на собаках, получали инъекцию терапевтического вектора в момент первого снижения у них сердечных фракций выброса посредством доставки в коронарные артерии с помощью катетера. Сердечные фракции выброса представляют собой симптом, указывающий на возникновение кардиомиопатии. Более ранние данные из исследования естественного течения болезни у субъектов-собак указывали на то, что, как только фракции выброса начинают падать, они продолжают падать прогрессирующе в течение следующего года (фиг. 18). Собаки, как правило, не доживают дольше 8-12 месяцев после того, как фракция выброса начинает устойчиво снижаться.

Как показано на фиг. 7 и 8, оба субъекта демонстрировали улучшения фракции выброса и других параметров сердца спустя несколько месяцев после обработки AAVrh.10-S100A1/ARC согласно результатам измерения с помощью МРТ сердца, и это подтверждалось данными эхокардиографии. Спустя почти 12 месяцев после обработки первый субъект демонстрировал устойчивую фракцию выброса в пределах нормального диапазона. Аналогично, спустя почти 7 месяцев после обработки второй субъект демонстрировал устойчивую нормальную фракцию выброса.

Улучшалась не только сердечная деятельность, но также присутствовало постоянное улучшение способности переносить физическую нагрузку у собак, что оценивали количественно с помощью съемки

субъектов во время физической нагрузки. В соответствии с этой улучшенной способностью переносить физическую нагрузку полученные с помощью MPT результаты измерений конечностей субъектов демонстрировали, что мышечная масса у скелетных мышц либо увеличивалась, либо не изменялась после обработки AAV (фиг. 9A-9C). Кроме того, уровни циркулирующей креатинкиназы (СК) в скелетных мышцах снижались после обработки (фиг. 10), что указывает на снижение существующего повреждения мышц.

#### Пример 4. Лечение субъектов-собак с DCM

Доберман-пинчеры имеют наиболее высокую частоту возникновения DCM из всех пород собак. Генетические основы этого известны только для подгруппы собак. Это обеспечивает модель DCM и сердечной недостаточности на крупных животных без каких-либо других генетических осложнений. Только собаки, которые имели сердечную недостаточность на поздней стадии, получали обработку таким же вектором AAV.S100A1.ARC, что и применяемый у собак с GRMD. Цель обработки заключалась как в улучшении сердечной деятельности, так и в продлении жизни.

На данный момент два субъекта породы доберман-пинчер получили обработку AAVrh.10-S100A1/ARC посредством доставки в коронарные артерии с помощью катетера, причем обе собаки испытывали сердечную недостаточность во время обработки. Обе собаки демонстрировали быстрое улучшение после обработки. Каждую собаку оценивали с помощью двух процедур эхокардиографии после обработки для оценки структурных и функциональных параметров сердца, в том числе (без ограничения) объемов желудочков, толщин стенок и диаметров камер в диастоле и систоле, а также фракции укорочения и фракции выброса.

Первая собака получала обработку при фракции выброса, составляющей только 10%, и, следовательно, она была близка к смерти на момент начала обработки. В течение 24 ч после лечения фракция выброса улучшалась до 25%. При первом контрольном посещении с собакой спустя 4 месяца после обработки фракция выброса устойчиво сохранялась на уровне 26%. При втором контрольном посещении через 6 месяцев фракция выброса у нее составляла 32%. Собака умерла от застойной сердечной недостаточности в возрасте 8 месяцев. Таким образом, оказалось, что обработка продлевает жизнь, но сердечная деятельность была уже слишком нарушена на момент обработки, чтобы обеспечить возможность длительного выживания.

Второй получавший обработку доберман-пинчер имел фракцию выброса, составляющую 32% перед обработкой, фракция, которая является низкой, но не представляющей непосредственную опасность смерти. Фракция выброса у собаки улучшалась до 49% в течение 24 ч после обработки, что находится в пределах нормального диапазона. При осмотре через 4 месяца после обработки фракция выброса собаки составляла 52%, а при осмотре через 8 месяцев фракция выброса составляла 50%. Перед возвращением для осмотра через год у собаки был диагностирован рак легкого, и она умерла два месяца спустя. Причина ее смерти не была связана с сердечной недостаточностью.

Исходя из этих данных, обработка AAVrh.10-S100A1/ARC способна восстанавливать сердечную деятельность у собак до нормального диапазона.

#### Пример 5. Оценка векторов, содержащих полученные от человека последовательности кДНК

Плазмиды, содержащие последовательности кДНК полученных от человека ARC ("hARC") и S100A1 ("hS100A1"), конструировали для оценки у мышей. Гены нативных человеческих cARC и S100A1 оптимизировали по кодону для экспрессии в клетках человека.

Эти плазмиды содержали нуклеотидные последовательности с SEQ ID NO: 9-12. Каждая из этих плазмид содержала последовательности кДНК cARC и S100A1, функционально управляемые промото-ром cTnT, а также IRES между этими двумя последовательностями. Все четыре плазмиды содержали оптимизированную по кодону последовательность человеческого cARC (hARC). Плазмиды, изложенные в SEQ ID NO: 9 и 10, дополнительно содержали оптимизированные по кодону последовательности hS100A1; и плазмиды, изложенные в SEQ ID NO: 11 и 12, дополнительно содержали последовательность hS100A1 дикого типа.

Каждую из этих четырех плазмид клонировали в самокомплементарный вектор на основе AAVrh.10, а затем он был заключен в капсид частицы gAAV. Частицы gAAVrh.10, содержащие эти векторы, вводили мышам.

Оценивали уровни экспрессии ARC и S100A1 у мышей. Отслеживали и оценивали дистрофические фенотипы и сердечную деятельность, в том числе сердечную фракцию выброса.

#### Пример 6. Долговременные исследования на мышцах и собаках

##### **Исследования на мышцах с дистрофией**

Доставка в сердце с применением AAV генов S100A1 и ARC приводит к сохранению сердечной деятельности

Дополнительно к исследованиям на мышцах, представленных ранее (фиг. 4-6), проводили два типа более долговременных исследований, результаты которых кратко изложены на фиг. 15-17. На фиг. 15 и 16 представлены данные от мышей с недостаточностью дистрофина на фоне тяжелого фиброза, DBA/2J (также называемые "D2") мышей, таким образом создавая то, что называют D2.mdx мышцами. Эти мыши получали обработку AAV, содержащим кассету с двумя трансгенами (S100A1 и ARC), функционально

управляемыми промотором сердечного тропонина Т (сТnТ), в возрасте 1 месяца. Мышей содержали в среде, приводящей к малоподвижному образу жизни, до возраста 10 месяцев, в этот момент времени оценивали состояние их сердца.

#### **Превосходство доставки в сердце с помощью AAV генов S100A1 и ARC по сравнению с любым из трансгенов отдельно**

Параллельно с этими исследованиями также проводили исследование выживаемости на D2.mdx мышцах, у которых восстановление под действием трансгена присутствовало только в скелетных мышцах вследствие экспрессии атрофина под контролем промотора альфа-актина скелетных мышц (см., Rafael JA, et al. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. Nat Genet. 19:79-82, 1998), и которых называют D2.mdx.sk\_utrophin мышцами. Цель заключалась в создании мыши, которая имела чистую дилатационную кардиомиопатию, приводящую к сердечной недостаточности и смерти, без какого-либо заболевания легочной мускулатуры или скелетной мускулатуры, в целом. Это позволяло мышцам подвергаться физической нагрузке вследствие их содержания по отдельности в клетках с беговыми колесами. Физическая активность создает дополнительную нагрузку и напряжение в сердцах, приводящее к ускорению развития кардиомиопатии и сердечной недостаточности. Для того чтобы лучше смоделировать клиническую ситуацию, при которой индивиды не будут получать лечение до возникновения заметного заболевания сердца, мыши получали обработку в возрасте 6 месяцев, при этом в этот момент времени фиброз присутствует и начинают проявляться аномалии функционирования сердца.

Для оценки потенциального превосходства доставки S100A1 + ARC вместе в одной конструкции в сравнении с доставкой ARC или S100A1 по отдельности трансген либо не доставляли (контроль), либо доставляли вектор на основе гAAV, содержащий такой же сердечный промотор, который применяют в конструкции с двумя трансгенами, но управляющий одной из тех же кДНК S100A1 или ARC, которые применяют в двойной кассете, но по отдельности, а не в комбинации. Таким образом, любой из ARC отдельно, S100A1 отдельно или комбинации S100A1 и ARC сравнивали в отношении способности продления жизни в этой модели сердечной недостаточности.

Как показано на фиг. 17, любой из трансгенов отдельно был способен значительно увеличивать продолжительность жизни: ARC на 4 месяца, а S100A1 на 5 месяцев. Тем не менее, комбинация трансгенов, S100A1 и ARC, увеличивала продолжительность жизни на 10 месяцев - до возраста 20 месяцев. D2 мыши дикого типа имели продолжительность жизни только ~23 месяца, поэтому этот результат отражает поразительно сильное восстановление сердца. Комбинация трансгенов в двойной конструкции на основе гAAV обеспечивала синергическую эффективность. Поскольку введение вектора увеличивало продолжительность жизни у D2 мышцей примерно до величины продолжительности жизни у дикого типа и увеличенную продолжительность жизни по сравнению с векторами с одним трансгеном на 4-5 месяцев, эти результаты отражают статистически значимое улучшение относительно методов терапии векторами с одним трансгеном.

#### **Исследования на собаках с дистрофией**

Затем проводили исследование для того, чтобы распространить результаты от получавших обработку мышцей на собак с GRMD. Проходящее в данное время исследование у собак с GRMD (четыре собаки на данный момент) включает обработку AAVrh.10-S100A1/ARC (последовательности трансгена для собак), когда сердечная деятельность, которую оценивали по фракции выброса, падала ниже уровней сердечной деятельности у не получавшей обработку собаки с естественным течением болезни. Частые процедуры эхокардиографии и/или МРТ для оценки структурных и функциональных параметров сердца применяли для отслеживания состояния сердца собак. За первой получавшей обработку собакой (WnM3/кличка Келвин) следили в течение более чем 2 лет, в течение которых сердечная деятельность у нее улучшалась и являлась стабильной. Эта собака умерла вследствие осложнений, ассоциированных с аспирационной пневмонией, в возрасте 34 месяца, но сердечная деятельность у нее оставалась стабильной и находилась в нормальном диапазоне до этого возраста. У всех остальных трех собак присутствовало улучшение после первоначальной обработки, и они демонстрировали стабильную сердечную деятельность в течение периода более чем год. Эти данные представлены на фиг. 18. Смерть собаки по кличке Келвин от пневмонии позволила провести гистологический анализ тканей его сердца, результаты которого представлены на фиг. 19. Примечательно, что гистологическая картина левого желудочка, который при отсутствии обработки имел высокий уровень фиброза в возрасте 8 месяцев (один месяц после получения обработки WnM3), оказалась практически неотличимой от нормальной собаки (фиг. 19). Это является свидетельством практически полного восстановления сердца в модели на крупных животных с ДСМ, которая развивается в сердечную недостаточность и смерть в возрасте от одного до двух лет. При этом отсутствовали не получавшие обработку собаки, которые доживали до возраста более 30 месяцев в этой группе (фиг. 18), и типичной причиной смерти являлась сердечная недостаточность.

Пример 7. Исследования иммунного ответа

Четыре карликовые свиньи массой 45-70 кг получали обработку векторами на основе гAAV согласно настоящему раскрытию. Две из свиней получали высокую дозу, составляющую  $2 \times 10^{14}$  копий генома,

а две другие получают более низкую дозу, составляющую  $2 \times 10^{13}$  копий генома. В каждом случае две трети вируса доставляли в левую половину сердца, а одну третью часть дозы доставляли в правую половину сердца. Свиней подвергали скринингу в отношении антител к AAV-rh10 перед включением в исследование. Кровь для этой цели собирали синхронно.

Кровь собирали в пробирку с красной крышкой, позволяя крови сворачиваться в течение примерно 30 мин, и ее осаждали центрифугированием при  $1000 \times G$  в течение 15 мин, и сыворотку крови разделяли на 200 мкл аликвоты и замораживали перед скринингом. Сыворотку крови применяли для анализа изначально существующих антител.

#### Схема иммуносупрессии

Начиная с момента за 1 сутки до переноса генов, субъекты получали 1 мг/кг глюкокортикоида (или эквивалента преднизона) ежедневно в течение 60 суток после инфузии. Через 60 суток после переноса генов использовали постепенное снижение дозы глюкокортикоида, и осуществляли мониторинг ферментов печени для определения иммунного ответа. В случае иммунного ответа введение глюкокортикоида в дозе и согласно схеме повторяли по усмотрению врача.

В течение всего периода введения глюкокортикоидов профилактические антибиотики вводили в качестве меры предосторожности.

#### Доставка частиц гAAV в сердца свиней

Интродуктор помещали в сонную артерию или бедренную артерию

Сосудистый катетер типа "свиной хвост" продвигали в левый желудочек для получения коронарограммы с целью картирования коронарных артерий по результатам цифровой флуороскопии

Коронарные катетеры (каждый) промывали гепаринизированным солевым раствором с  $1 \text{ см}^3$  крови субъекта и продвигали в корень аорты и устья левой и правой коронарных артерий (правый или левый катетеры типа Джадкинс с размером, зависящим от размера животного).

CRI (инфузия с постоянной скоростью) аденозина (1 мг/кг/мин.) начинали внутривенно. Вектор доставляли в коронарную артерию после 15 с CRI аденозина. Вектор вводили в течение 5-10 с и CRI продолжали 30 с после того, как доставку вектора завершали.

2/3 векторов доставляли в левую коронарную артерию и 1/3 векторов вводили в правую коронарную артерию.

Субъектов-свиней подвергали мониторингу посредством еженедельного забора крови (биохимические анализы сыворотки крови, CBC, антитела к AAVrh10 (выполнялся спонсором), анализ ответа методом Elispot) в течение 2 месяцев после доставки AAV. Спустя два месяца после доставки свиней умерщвляли и сердца, а также другие ткани (см. перечень ниже) препарировали (образцы собирали для фиксации в формалине и замораживали в свежем виде) и ткани делали доступными.

Необходимые образцы крови:

биохимические анализы сыворотки крови - 1 пробирка с красной крышкой

набор показателей для CBC - 1 пробирка с EDTA с фиолетовой крышкой

анализ антител к AAVrh10 с помощью ELISA - 1 пробирка с красной крышкой

анализ ELISPOT как минимум - 1 пробирка с EDTA с фиолетовой крышкой с объемом 10 мл

Посмертные процедуры

Специальные процедуры

Набор свежезамороженных тканей и зафиксированные в формалине и залитые в парафин ткани

Мышца/ орган	Сокращение	Левая/правая
Передняя большеберцовая	R/L TA	Обе
Длинный разгибатель пальцев	R/L EDL	Обе
Камбаловидная мышца	R/L SOL	Обе
Двуглавая мышца плеча	R/L BIC	Обе
Трехглавая мышца плеча	R/ L TRI	Обе
Сердце	HRT	-
Легкое	LUNG	-
Почка	KIDNEY	-
Печень	LIV	-
Селезенка	SPLN	-
Гонады	GND	-
Поджелудочная железа	PANC	-
Подколенный лимфатический узел	POPLN	-
Паховый лимфатический узел	ING LN	-
Мезентериальный лимфатический узел	MES LN	-

Бедренная артерия	R/L FEM ART	Обе
Икроножные артерии	R/LSUR ART	Обе
Мочевой пузырь	BLADDER	-
Диафрагма	DIA	-
Желудок	STMCH	-

Головной мозг	BRAIN	-
Спинальный мозг	SPN CORD	-
Нерв	NERVE	-
Икроножный нерв	SUR	L/R
Воротная вена	Portal Vein	-
Аорта	Aorta	-
Нижняя полая вена	IVC	-
Воротная вена печени	HPV	-

#### Эквиваленты

Несмотря на то что несколько вариантов осуществления настоящего изобретения были описаны и проиллюстрированы в настоящем документе, средние специалисты в данной области техники легко предвидят ряд других средств и/или структур для выполнения функции и/или получения результатов и/или одно или несколько из преимуществ, описанных в настоящем документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считают находящимися в рамках объема вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в настоящем документе. В более общем смысле, специалистам в данной области техники будет легко понятно, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящем документе предполагаются как иллюстративные, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которого/которых применяются идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники поймут или будут способны определить многие эквиваленты описанных в данном документе конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения с использованием не более, чем стандартного экспериментирования. Таким образом, следует понимать, что вышеизложенные варианты осуществления представлены только с целью иллюстрации, и что в рамках объема пунктов прилагаемой формулы изобретения и их эквивалентов варианты осуществления настоящего изобретения могут быть осуществлены на практике иначе, чем специально описано и заявлено. Несколько вариантов осуществления настоящего раскрытия направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанный в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация из двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов включена в объем настоящего раскрытия, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несовместимыми.

Следует понимать, что все определения, которые представлены и используются в настоящем документе, будут иметь преимущественную силу относительно определений из словарей, определений в документах, включенных посредством ссылки, и/или общепринятых значений определенных терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, раскрытые в настоящем документе, включены посредством ссылки на объект, применительно к которому цитируется каждый из них и который в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Используемые в контексте настоящего документа формы единственного числа в описании и в пунктах формулы изобретения, если явно не указано противоположное, следует понимать как означающие "по меньшей мере один".

Используемую в контексте настоящего документа фразу "и/или" в описании и в пунктах формулы изобретения, следует понимать как означающую "любой из или оба" элементов, соединенных таким образом, т.е. элементов, которые присутствуют совместно в некоторых случаях и присутствуют раздельно в других случаях. Несколько элементов, перечисленных с "и/или" следует толковать таким же образом, т.е. "один или несколько" из элементов, соединенных таким образом. Необязательно, могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, специально идентифицированных условием "и/или", независимо от того, связаны или не связаны они с этими специально идентифицированными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, ссылка на "А и/или В", при использовании совместно с открытым термином, таким как "содержащий", может относиться, в соответствии с одним вариантом осуществления, только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в соответствии с другим вариантом осуществления, только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в соответствии с еще одним вариантом осуществления, и к А, и к В (необязательно включая другие элементы); и т.д.

Следует понимать, что при использовании в контексте настоящего документа в описании и в пунктах формулы изобретения "или" имеет такое же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении пунктов в перечне "или" или "и/или" будут интерпретироваться как включительные, т.е. с включением по меньшей мере одного, но также включая более чем одно из числа или перечня элементов и, необязательно, дополнительные не включенных в перечень пункты. Только термины, явно ука-

зываются противоположное, такие как "только один из" или "строго один из" или, в случае использования в пунктах формулы изобретения, термин "состоящий из", будут относиться к включению строго одного элемента в виде числа или перечня элементов. В целом, термин "или", используемый в контексте настоящего документа, будет интерпретировать только как указывающий на исключительные альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), когда ему предшествуют термины исключительности, такие как "любой из", "один из", "только один из" или "строго один из". "Состоящий, по существу, из" при использовании в пунктах формулы изобретения будет иметь свое общепринятое значение, которое используют в области патентного права.

Следует понимать, что при использовании в контексте настоящего документа в описании и в пунктах формулы изобретения фраза "по меньшей мере один" применительно к перечню из одного или нескольких элементов означает по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких из элементов в перечне элементов, но не обязательно включающий в себя по меньшей мере один из каждого и любого элемента, специально перечисленного в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Это определение также предполагает возможность того, что, необязательно, могут присутствовать элементы, отличные от элементов, специально идентифицированных в перечне элементов, к которому относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны ли они или не связаны с этими специально идентифицированными элементами. Следовательно, в качестве неограничивающего примера, "по меньшей мере один из А и В" (или, в качестве эквивалента, "по меньшей мере один из А или В", или, в качестве эквивалента, "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться, в соответствии с одним вариантом осуществления, по меньшей мере к одному, необязательно включая более чем один, А при отсутствии В (и, необязательно, включая элементы, отличные от В); в соответствии с другим вариантом осуществления, по меньшей мере к одному, необязательно включая более чем один, В при отсутствии А (и, необязательно, включая элементы, отличные от А); в соответствии с еще одним вариантом осуществления, по меньшей мере к одному, необязательно включая более чем один, А и по меньшей мере к одному, необязательно включая более чем один, В (и, необязательно, включая другие элементы); и т.д.

Также следует понимать, что, если явно не указано противоположное, во всех способах, заявленных в настоящем документе, которые включают в себя более чем одну стадию или действие, порядок стадий или действий в способе не обязательно ограничен порядком, в котором перечислены стадии или действия в способе.

В пунктах формулы изобретения, а также в представленном выше описании все переходные фразы, такие как "содержащий", "включающий в себя", "несущий", "имеющий", "который содержит", "включающий", "содержащий в себе", "состоящий из" и т.п. следует рассматривать как открытые, т.е. подразумевающие включение без ограничения. Только переходные фразы "состоящий из" и "состоящий, по существу, из" будут являться закрытыми или полузакрытыми переходными фразами, соответственно, как изложено в Руководстве по процедуре проведения экспертизы в отношении патентов Бюро по патентам и товарным знакам США (United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures), раздел 2111.03. Следует понимать, что варианты осуществления, описанные в настоящем документе с использованием открытой переходной фразы (например, "содержащий"), также рассматриваются в альтернативных вариантах осуществления как "состоящие из" и "состоящие, по существу, из" признака, описываемого открытой переходной фразой. Например, если в настоящем раскрытии описана "композиция, содержащая А и В", настоящее раскрытие также предполагает альтернативные варианты осуществления "композиция, состоящая из А и В" и "композиция, состоящая, по существу, из А и В".

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор на основе гAAV для доставки двух или больше трансгенов в сердце субъекта, причем указанный вектор содержит полинуклеотид, который содержит два или больше трансгенов, причем первый трансген кодирует белок семейства S100 и второй трансген кодирует сердечный репрессор апоптоза с доменом рекрутинга каспазы (сARC),

и при этом первый трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной любой из последовательностей, изложенных в виде SEQ ID NO: 5, 8 и 19-21, и второй трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной любой из последовательностей, изложенных в виде SEQ ID NO: 6, 7 и 15-18.

2. Вектор на основе гAAV по п.1, причем второй трансген содержит любую из последовательностей, изложенных в виде SEQ ID NO: 6 и 7.

3. Вектор на основе гAAV по п.1 или 2, причем белок семейства S100 представляет собой сердечный кальций-связывающий белок S100 A1 (сS100A1) или его вариант.

4. Вектор на основе гAAV по п.1, причем первый трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 95% идентичной любой из последовательностей, изложенных в виде SEQ ID NO: 5, 8 и 19-21.

5. Вектор на основе гAAV по п.1, причем первый трансген содержит нуклеотидную последователь-

ность, которая является по меньшей мере на 99,5% идентичной любой из последовательностей, изложенных в виде SEQ ID NO: 5, 8 и 19-21.

6. Вектор на основе gAAV по п.1, причем второй трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 95% идентичной любой из последовательностей, изложенных в виде SEQ ID NO: 6, 7 и 15-18.

7. Вектор на основе gAAV по п.1, причем второй трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 99,5% идентичной любой из последовательностей, изложенных в виде SEQ ID NO: 6, 7 и 15-18.

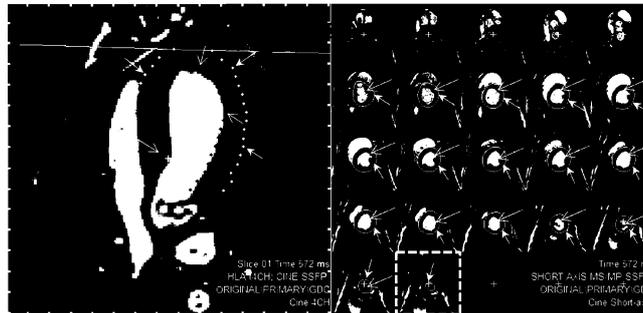


Фиг. 1

Келвин WnM3

Диастола

Момент времени 1



Момент времени 2

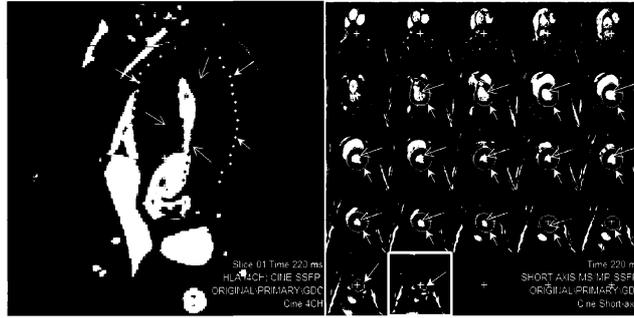


Фиг. 2

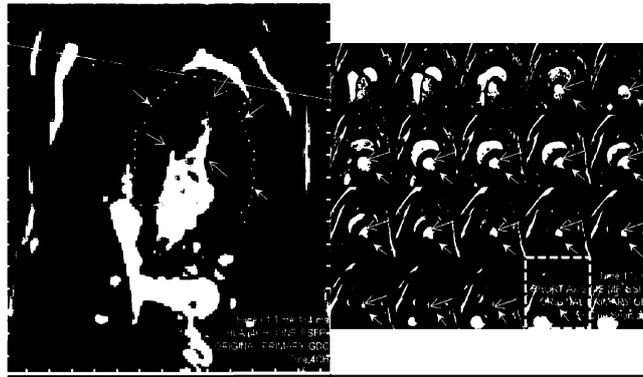
Келвин WnM3

Систола

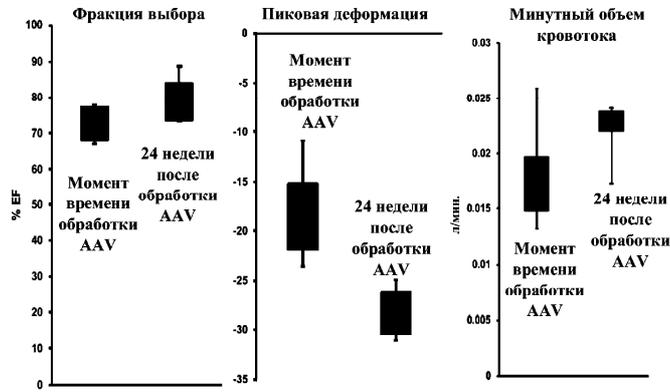
Момент времени 1



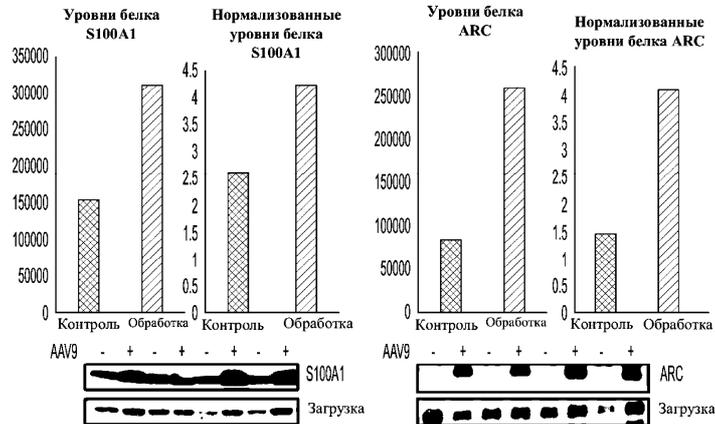
Момент времени 2



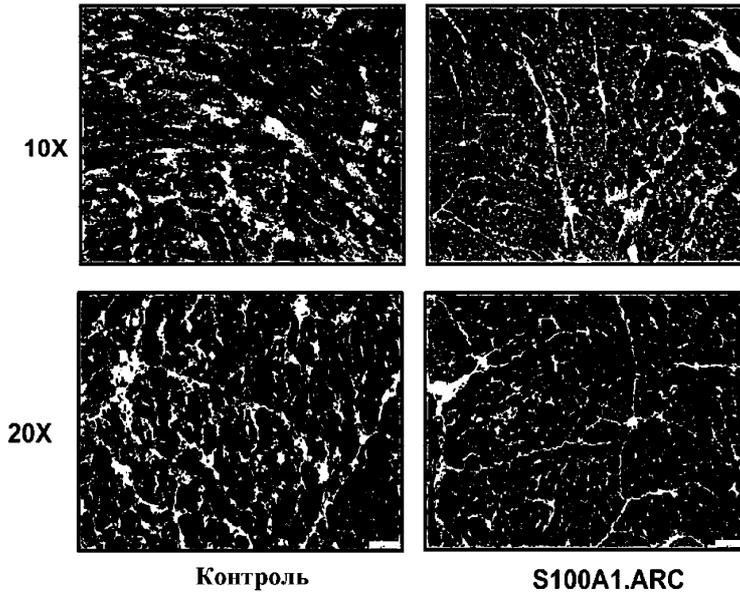
Фиг. 3



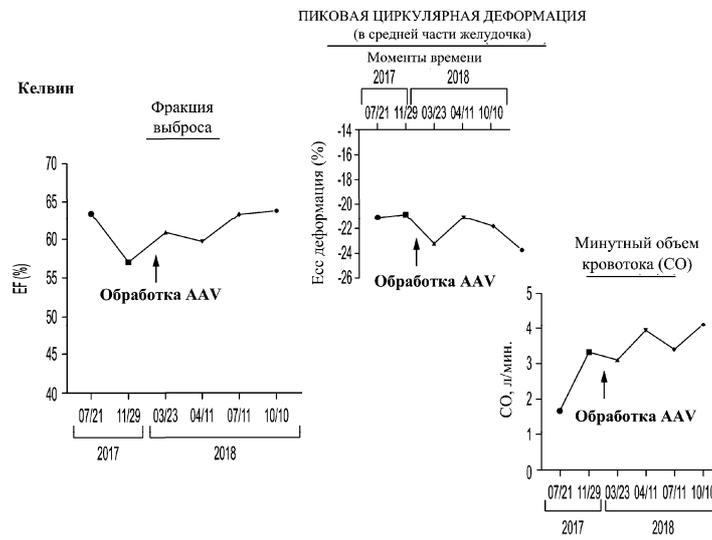
Фиг. 4



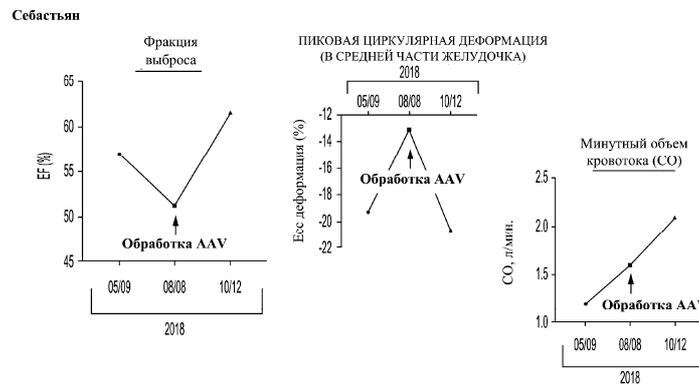
Фиг. 5



Фиг. 6

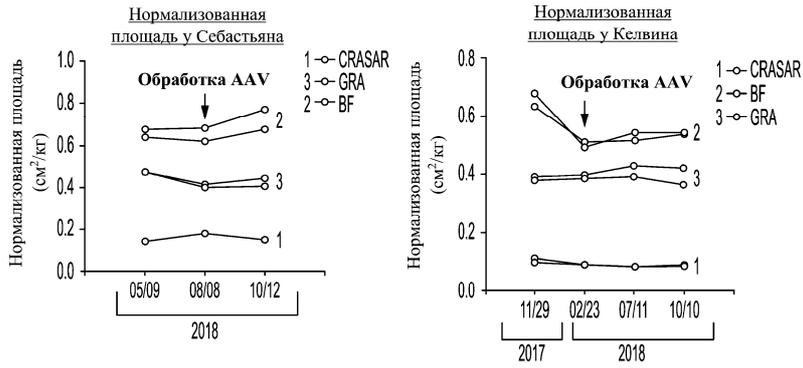


Фиг. 7



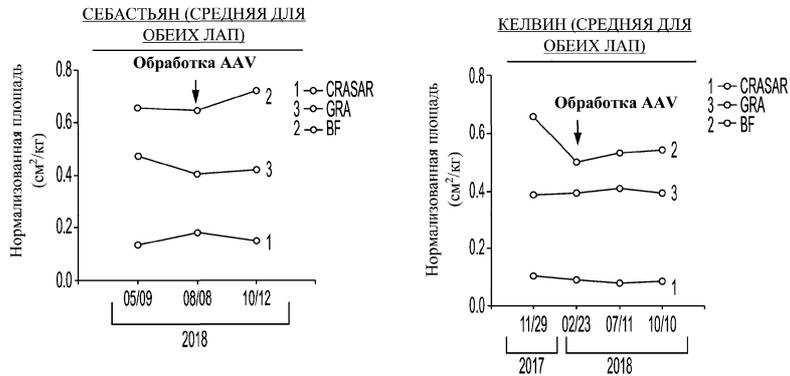
Фиг. 8

**Площадь обеих лап**



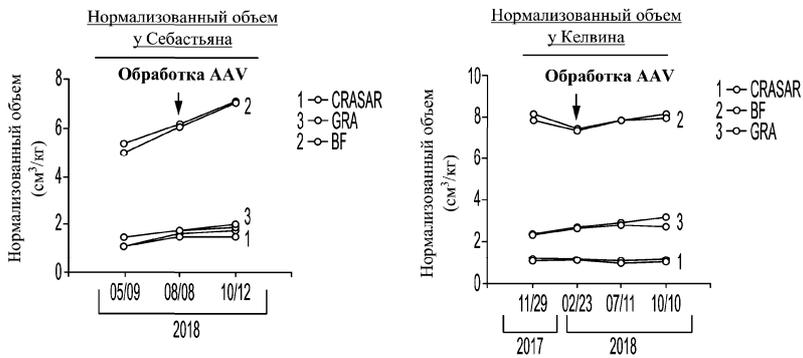
Фиг. 9А

**Площадь (макс. CSA)**



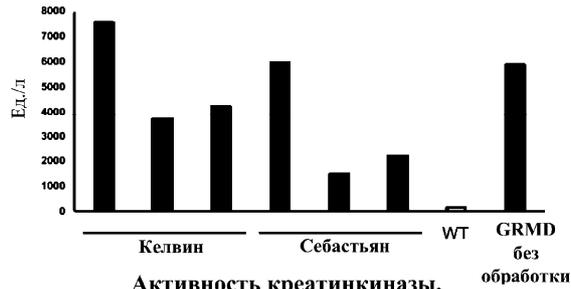
Фиг. 9В

**Объем обеих лап**

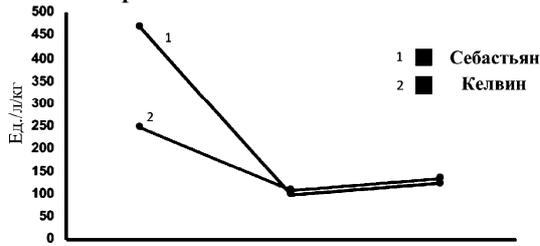


Фиг. 9С

Активность креатинкиназы

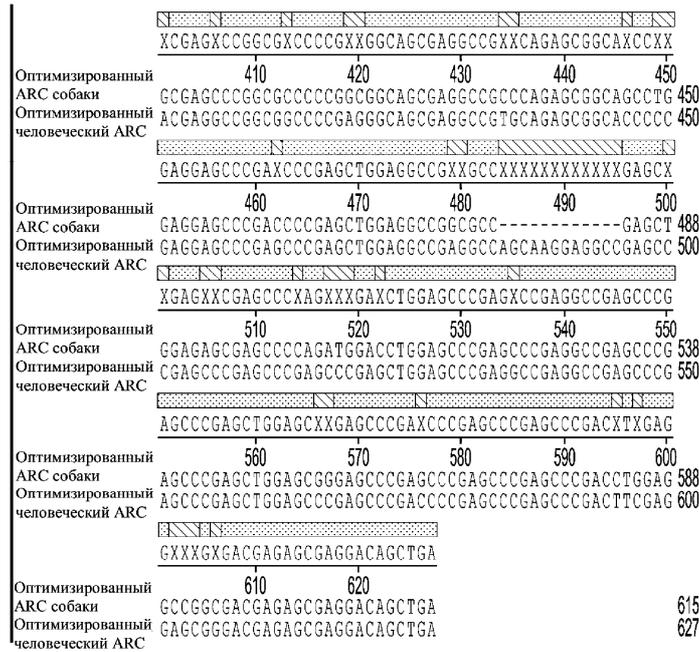


Активность креатинкиназы, нормализованная к массе тела

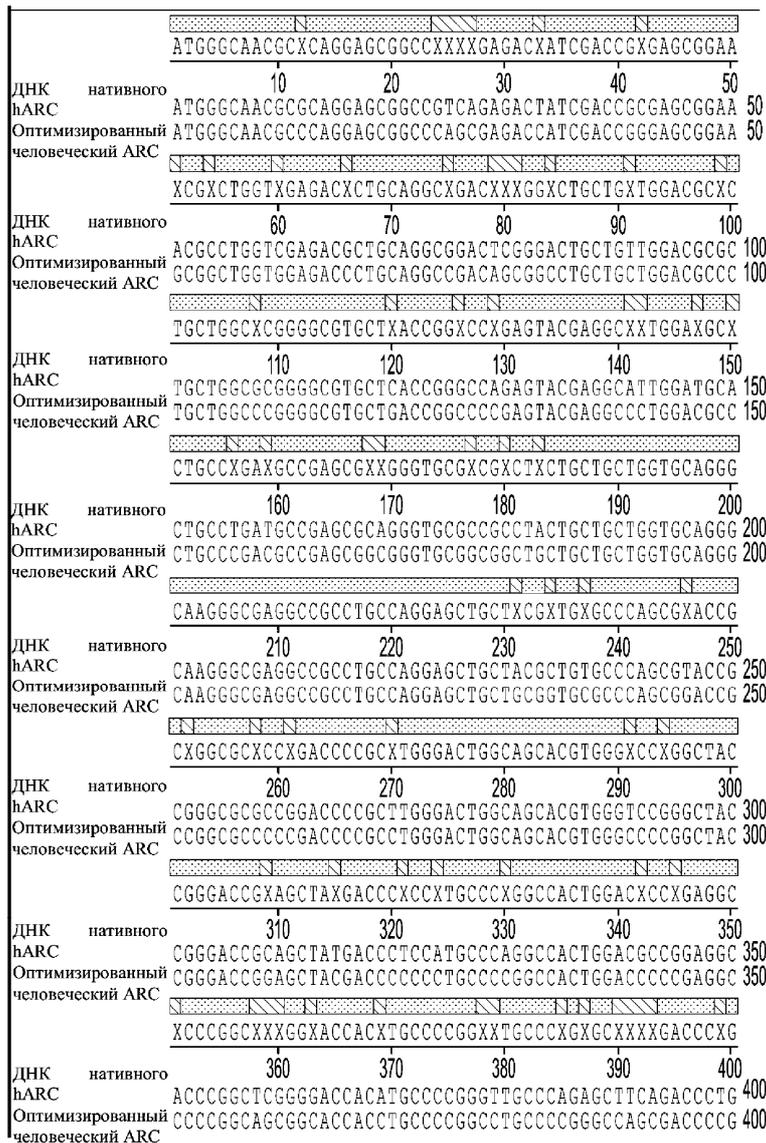


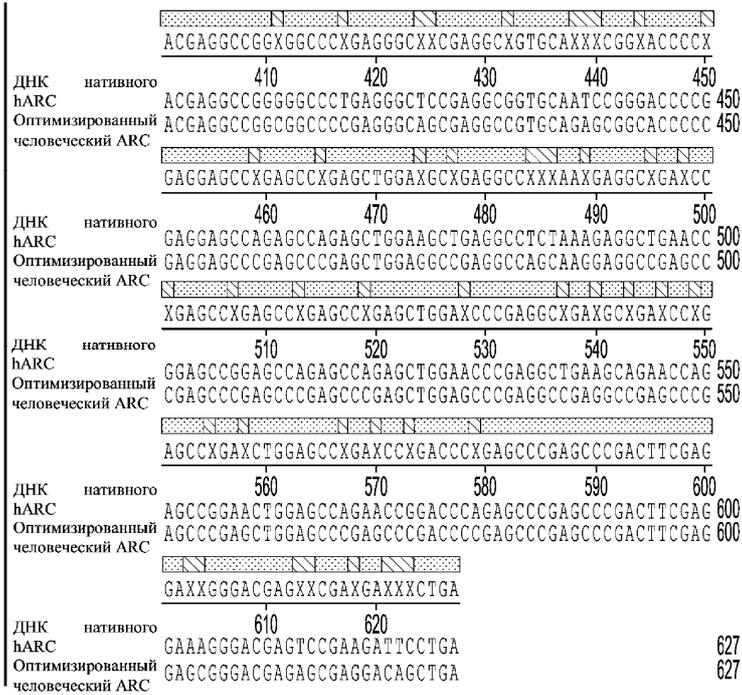
Фиг. 10

	ATGGGCAACXCCAGGAGCGGCCAGCGAGACCATCGACC	GGGAGCGGAA
Оптимизированный ARC собаки	ATGGGCAACAGCCAGGAGCGGCCAGCGAGACCATCGACC	GGGAGCGGAA 50
Оптимизированный человеческий ARC	ATGGGCAACGCCCCAGGAGCGGCCAGCGAGACCATCGACC	GGGAGCGGAA 50
	GCGGCTGGTGGAGACCCCTGCAGGCCGACAGCGCCCTGCTGCTGGACGCC	
Оптимизированный ARC собаки	GCGGCTGGTGGAGACCCCTGCAGGCCGACAGCGCCCTGCTGCTGGACGCC	100
Оптимизированный человеческий ARC	GCGGCTGGTGGAGACCCCTGCAGGCCGACAGCGCCCTGCTGCTGGACGCC	100
	TGCTGGCCCCGGGGCTGCTGXCCGGCCCCGAGTACGAGGCCCTGGACGCC	
Оптимизированный ARC собаки	TGCTGGCCCCGGGGCTGCTGGCCCCCGAGTACGAGGCCCTGGACGCC	150
Оптимизированный человеческий ARC	TGCTGGCCCCGGGGCTGCTGACCGGCCCGAGTACGAGGCCCTGGACGCC	150
	CTGCCGACGCCGAGCGCGGGTGGCGGGCTGCTGCTGCTGGTGCAGAG	
Оптимизированный ARC собаки	CTGCCGACGCCGAGCGCGGGTGGCGGGCTGCTGCTGCTGGTGCAGAG	200
Оптимизированный человеческий ARC	CTGCCGACGCCGAGCGCGGGTGGCGGGCTGCTGCTGCTGGTGCAGAG	200
	CAAGGGCCAGGCCCTGCCAGGAGCTGCTGCTGCTGGCCAGCGGACCG	
Оптимизированный ARC собаки	CAAGGGCCAGGCCCTGCCAGGAGCTGCTGCTGCTGGCCAGCGGACCG	250
Оптимизированный человеческий ARC	CAAGGGCCAGGCCCTGCCAGGAGCTGCTGCTGCTGGCCAGCGGACCG	250
	CCXGXGCCCCCGACCCCGCTGGGACTGGCAGCACGTGGGXCXCGGTAC	
Оптимизированный ARC собаки	CCCGGGCCCCCGACCCCGCTGGGACTGGCAGCACGTGGGACCXCGGTAC	300
Оптимизированный человеческий ARC	CCCGGGCCCCCGACCCCGCTGGGACTGGCAGCACGTGGGACCXCGGTAC	300
	CGGGAXCGGAGCTXXGACXCCXCTGCXCCGGCCACTGGACCCCGAGGC	
Оптимизированный ARC собаки	CGGGAGCCGAGCTGGGACCCCGCTGCXCCGGCCACTGGACCCCGAGGC	350
Оптимизированный человеческий ARC	CGGGACCCGAGCTACGACCCCGCTGCXCCGGCCACTGGACCCCGAGGC	350
	CCCCGGCAGCXGCACCCTGCCCGXXCTGCCCGGGCCXXCGACXXCG	
Оптимизированный ARC собаки	CCCCGGCAGCAGCACCCTGCCCGAGCTGCCCGGGCCCGGACTGGC	400
Оптимизированный человеческий ARC	CCCCGGCAGCGGCACCCTGCCCGGGCTGCCCGGGCCAGGACCCCG	400

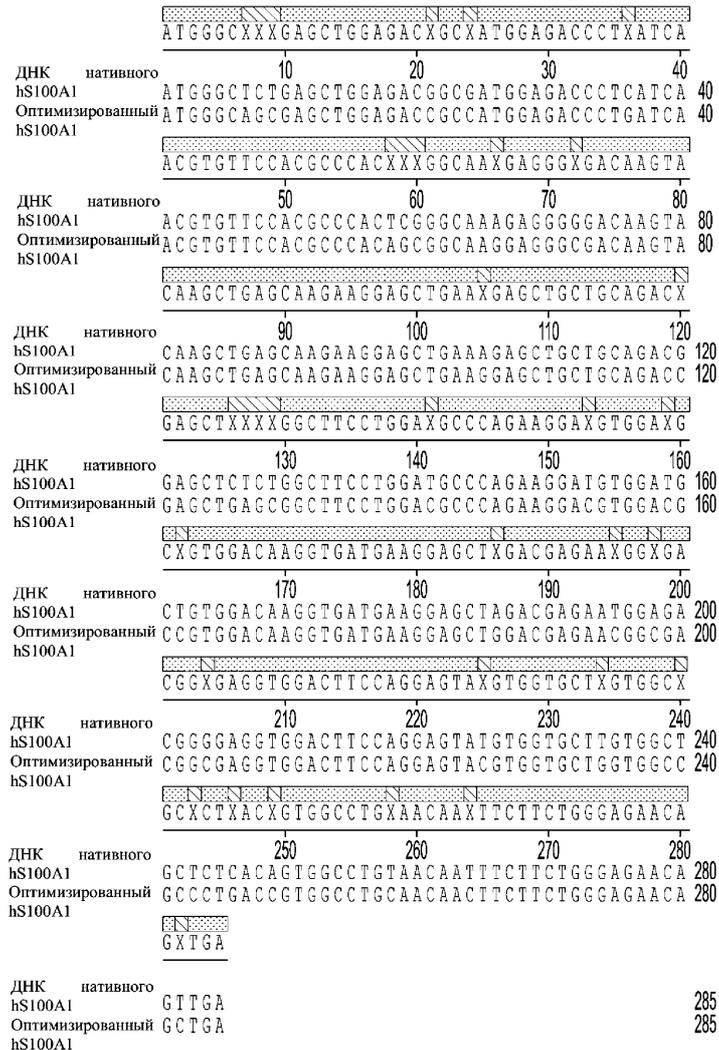


Фиг. 11





Фиг. 12

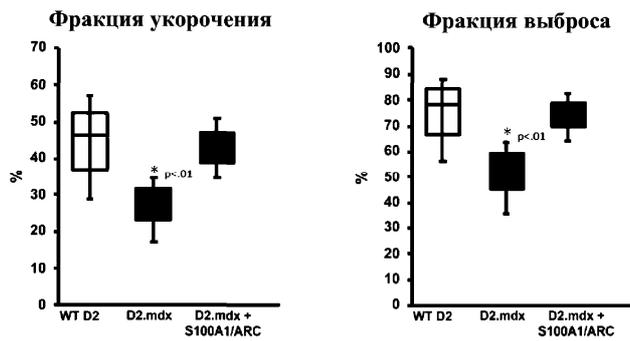


Фиг. 13

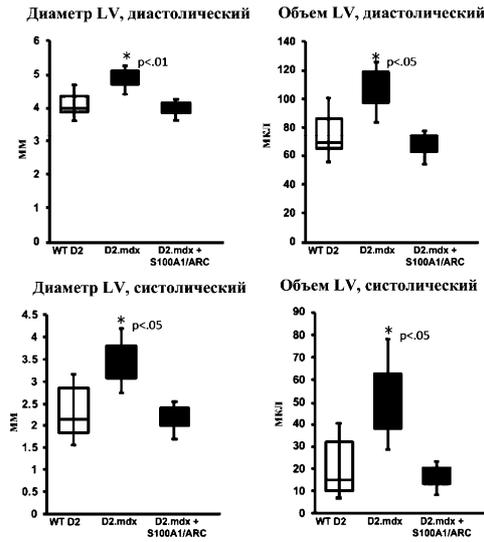
```

ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCCTGATCA
Оптимизированный hS100A1 10 20 30 40 40
Оптимизированный cS100A1 ATGGGCAGCGAGCTGGAGACCGCCATGGAGACCCCTGATCA 40
ACGTGTTCCACGCCCCACAGCGGCAAGGAGGGCXCACAAGTA
Оптимизированный hS100A1 50 60 70 80 80
Оптимизированный cS100A1 ACGTGTTCCACGCCCCACAGCGGCAAGGAGGGCAACAAGTA 80
CAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGAGCTGCTGCAGACC
Оптимизированный hS100A1 90 100 110 120 120
Оптимизированный cS100A1 CAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTGAAGGAGCTGCTGCAGACC 120
GAGCTGAGCGGCTTCC TGGACGCCCCAGAAGGACGXXGACG
Оптимизированный hS100A1 130 140 150 160 160
Оптимизированный cS100A1 GAGCTGAGCGGCTTCC TGGACGCCCCAGAAGGACGCGCGACG 160
CCGTGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAACCGCGCA
Оптимизированный hS100A1 170 180 190 200 200
Оптимизированный cS100A1 CCGTGGACAAGGTGATGAAGGAGCTGGACGAGAACCGCGCA 200
CGGCGAGGTGGACTTCCAGGAGTACGTGGTGCTGGTGGCC
Оптимизированный hS100A1 210 220 230 240 240
Оптимизированный cS100A1 CGGCGAGGTGGACTTCCAGGAGTACGTGGTGCTGGTGGCC 240
GCCCTGACCGTGGCCTGCAACAACCTCTTCTGGGAGAACA
Оптимизированный hS100A1 250 260 270 280 280
Оптимизированный cS100A1 GCCCTGACCGTGGCCTGCAACAACCTCTTCTGGGAGAACA 280
GCTGA
Оптимизированный hS100A1 GCTGA 285
Оптимизированный cS100A1 GCTGA 285
    
```

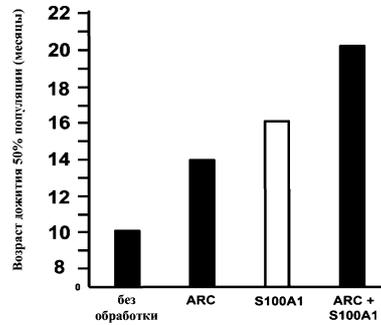
Фиг. 14



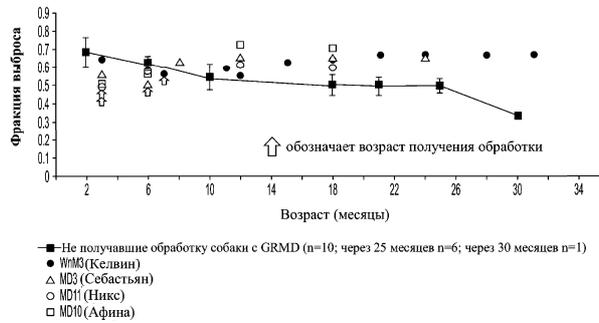
Фиг. 15



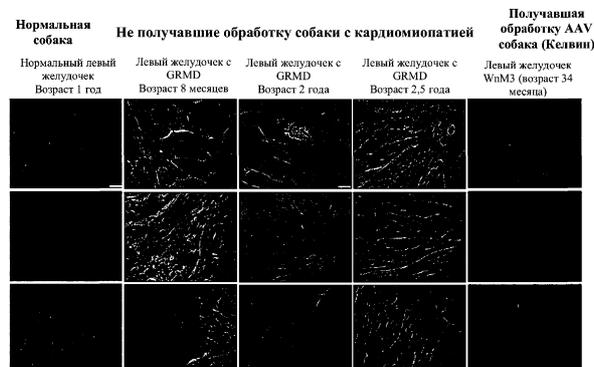
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

