

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047041**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.05.28**

(21) Номер заявки  
**202292548**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.05.12**

(51) Int. Cl. *A61P 21/00* (2006.01)  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*C12N 15/864* (2006.01)

---

(54) **ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДВОЙНЫХ ВЕКТОРОВ ДИСФЕРЛИНА**

---

(31) **63/024,338**

(32) **2020.05.13**

(33) **US**

(43) **2023.03.23**

(86) **PCT/US2021/031998**

(87) **WO 2021/231577 2021.11.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РИСЁРЧ ИНСТИТЮТ ЭТ  
НЕЙШНУАЙД ЧИЛДРЕН'С  
ХОСПИТАЛ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Родино-Клапак Луиза (US)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) US-A1-20030110526  
WO-A1-2000011157  
US-A1-20200010521  
WO-A1-2020033026

---

(57) В изобретении описаны рекомбинантные полинуклеотиды, кодирующие фрагменты белка дисферлина человека. Кроме того, дополнительно описаны плазмиды, вирусные векторы, системы двойного вектора, клетки и композиции, содержащие такие рекомбинантные полинуклеотиды. Такие рекомбинантные полинуклеотиды, плазмиды, вирусные векторы, системы двойного вектора, клетки и композиции можно применять для лечения дисферлинопатий.

---

**047041**

**B1**

**047041**

**B1**

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

Настоящая заявка, согласно § 119(e) главы 35 Свода законов США, испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/024338, поданной 13 мая 2020 года, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### **Включение посредством ссылки материалов, представленных в электронном виде**

Настоящая заявка содержит, в качестве отдельной части настоящего изобретения, перечень последовательностей в машиночитаемой форме, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки и идентифицирован следующим образом: имя файла: 106887\_8070\_SL.txt; размер: 129123 байта, создан: 11 мая 2021 года.

### **Область техники**

В настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, содержащие фрагменты гена дисферлина человека, и плазмиды, вирусные векторы, клетки и композиции, содержащие такие полинуклеотиды, и способы применения таких полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов и композиций для лечения субъектов с недостаточностью дисферлина, например, поясно-конечностной мышечной дистрофией типа 2В, миопатией Миоши и миопатией дистального переднего отдела.

### **Уровень техники**

Дисферлинопатии представляют собой аутосомно-рецессивные расстройства, включающие поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2В (LGMD2В), миопатию Миоши и миопатию дистального переднего отдела, в совокупности известные как дисферлинопатии. Поясно-конечностная мышечная дистрофия типа 2В (LGMD2В) представляет собой одно из наиболее распространенных LGMD в Соединенных Штатах Америки, причем зарегистрированная заболеваемость во всем мире составляет 1/100000-1/200000. Миопатия Миоши представляет собой более ограниченную дистальную форму дисферлинопатии нижних конечностей. Фактически, учитывая спектр заболевания, LGMD2В часто начинается с дистальной атрофии икроножной мышцы, а затем постепенно распространяется и поражает проксимальные мышцы. Потеря дисферлина приводит к прогрессирующей форме дистрофии с хронической утратой мышечных волокон, воспалением, заменой жировой ткани и фиброзом, что приводит к усугублению мышечной слабости.

Ген дисферлина является крупным геном, на данный момент идентифицировано 55 экзонов, охватывающих по меньшей мере 150 т.п.о. геномной ДНК. Эти экзоны позволяют получить кДНК с прогнозируемым размером приблизительно 6,5 т.п.о. и белок длиной 2088 аминокислот. Дисферлин представляет собой белок с молекулярной массой 237 кДа, состоящий из С-концевого гидрофобного трансмембранного домена и более длинной цитоплазматически ориентированной гидрофильной области с несколькими С2-доменами. Вновь публикуемые работы показали, что потеря дисферлина нарушает  $Ca^{2+}$ -зависимое восстановление мембраны в скелетной мышце (Song et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 98: 4084-4088, 2001; Schnepf et al., J. Virol. 77:3495-3504, 2003). Кроме того, показано, что дисферлин взаимодействует с другими белками, участвующими в восстановлении мембраны, включая аннексины А1 и А2, АННАК и кавеолин-3. Важность этой системы подчеркивается при учете того, что скелетная мышца является механически активной и предрасположенной к травмам; таким образом, должен присутствовать надежный механизм восстановления целостности мембраны. Отсутствие или мутация дисферлина приводит к нарушению восстановления мембраны и каскаду событий, начиная с некроза мышечных волокон, приводящего к утрате мышечных волокон и прогрессирующей слабости конечностей. Принято считать, что потеря регенеративной способности мышечных волокон является следствием недостаточности дисферлина. Дисферлин также ассоциирован с перемещением везикул и эндоцитозом, образованием Т-каналцев и другими явлениями.

Мутации в гене дисферлина вызывают аллельные аутосомно-рецессивные расстройства, включая поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2В (LGMD2В), миопатию Миоши и миопатию дистального переднего отдела, в совокупности известные как дисферлинопатия (см., например, статьи Grose et al., PloS one 7:e39233, 2012, Bansal et al., Nature 423, 168-172, 2003, Moore, S.A., et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol 65: 995-1003, 2006, Rosales et al., Muscle Nerv 42:14-21, 2010, Sondergaard et al., Anns of Clin. Trans. Neurol. 2:256-270, 2015, Evesson et al., J. Biol. Chem. 285: 28529-28539, 2010, и Klinge et al., Soc. Exp. Biol. 21: 1768-1776, 2007, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Менее распространенным фенотипом недостаточности дисферлина является синдром ригидного позвоночника (Klinge et al., Muscle Nerve 41: 166-173, 2010, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Как правило, у пациентов в возрасте до двадцати лет имеет место медленно прогрессирующая слабость и высокий уровень креатинкиназы (КК) в сыворотке. Приблизительно одна треть пациентов становится зависимой от инвалидной коляски в течение 15 лет с момента начала заболевания. Клинические признаки поражения сердца отсутствуют, когнитивная функция не нарушается. Фенотипические варианты с относительно ограниченным распределением мышечной слабости закладывают основу для потенциальной региональной заместительной генной терапии, которая может значительно влиять на качество жизни при этом расстройстве (Grose et al., PLoS One 7:e39233, 2012, Barton et al., Muscle Nerve 42: 22-29, 2010). Однонуклеотидные изменения представляют собой типичную мутацию гена DYSF, которая также способствует успеху переноса гена, служащего для защиты транс-

генного продукта от иммунологического отторжения (Rodine-Klapac et al., Mol. Ther. 18: 109-117, 2010, Mendell et al., N. Eng. J. Med. 363: 1429-1437, 2010, Mendell et al., Ann. Neurol. 66:290-297, 2009, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

Средств лечения или устранения дисферлинопатий не существует. В совокупности доклинические исследования, в которых оценивали замену генов или суррогатную замену генов, показали, что несколько стратегий демонстрируют некоторую эффективность в отношении восстановления мембран. Ген дисферлина включает 55 экзонов, охватывающих 150 т.п.о. геномной ДНК с ассоциированной кДНК размером 6,5 т.п.о. Однако предел упаковки в AAV для замены гена составляет 4,7 т.п.о., что меньше последовательности кДНК дисферлина - 6,5 т.п.о. Таким образом, существует потребность в средствах лечения LGMD2B, что обуславливает необходимость получения нового механизма, способного доставлять функциональный полноразмерный белок дисферлина субъекту, нуждающемуся в этом.

#### **Краткое описание изобретения**

В настоящем документе описан рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный рекомбинантный полинуклеотид содержит первую нуклеотидную последовательность, причем указанная первая нуклеотидная последовательность состоит из:

- (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18;
- (b) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении SEQ ID NO: 1, 6 или 18;
- (c) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15;
- (d) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15;
- (e) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или
- (f) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (e) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (e).

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит одну или более дополнительных нуклеотидных последовательностей, выбранных из инвертированного концевых повтора (ИКП), промотора, интрона, маркера селекции или сайта начала репликации (ORI).

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, содержащую ИКП. В некоторых вариантах реализации указанный ИКП представляет собой ИКП AAV. В некоторых вариантах реализации ИКП AAV представляет собой ИКП AAV2 или ИКП AAV3. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид содержит два ИКП. В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, содержащую промотор. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой мышечно-специфичный промотор. В некоторых вариантах реализации мышечно-специфичный промотор выбран из элемента гена скелетного актина человека, элемента гена сердечного актина, промотора десмина, промотора скелетного альфа-актина (ASKA), промотора тропонина I (TNNI2), связывающего элемента фактора связывания миоцит-специфичного энхансера mef, промотора мышечной креатинкиназы (МСК), укороченного промотора МСК (tМСК), промотора тяжелой цепи миозина (МНС), гибридного энхансера тяжелой цепи α-миозина/энхансера-промотора МСК (МНСК7), промотора C5-12, элемента энхансера креатинкиназы мышцы, элемента гена скелетного быстро сокращающегося тропонина с, элемента гена медленно сокращающегося сердечного тропонина с, элемента гена медленно сокращающегося тропонина i, ядерного фактора, индуцируемого гипоксией. В некоторых вариантах реализации мышечно-специфичный промотор представляет собой промотор МНСК7. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой рекомбинантный промотор. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный промотор представляет собой рекомбинантный мышечно-специфичный промотор. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный мышечно-специфичный промотор представляет собой рекомбинантный мышечно-специфичный промотор тяжелой цепи миозина-креатинкиназы. В некоторых вариантах реализации промотор содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, содержащую интрон. В некоторых вариантах реализации интрон содержит 5'-донорный сайт, точку ветвления и/или 3'-сайт сплайсинга. В некоторых вариантах реализации интрон представляет собой химерный интрон. В некоторых вариантах реализации интрон содержит 5'-донорный сайт гена β-глобина человека. В некоторых вариантах реализации интрон содержит точку ветвления тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG). В некоторых вариантах реализации интрон содержит 3'-сайт акцептора сплайсинга тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG) В некоторых

вариантах реализации интрон содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, содержащую маркер селекции. В некоторых вариантах реализации маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотикам. В некоторых вариантах реализации ген устойчивости к антибиотикам представляет собой ген  $\beta$ -лактамазы или ген устойчивости к канамицину. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный нуклеотид дополнительно не содержит вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй фрагмент белка hDYSF.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный нуклеотид не содержит последовательность AAV, отличную от одного или более ИКП.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный нуклеотид не содержит последовательность вируса, отличную от одного или более ИКП.

В настоящем документе описана рекомбинантная полинуклеотидная последовательность, кодирующая фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный рекомбинантный полинуклеотид содержит вторую нуклеотидную последовательность, причем указанная вторая нуклеотидная последовательность состоит из: (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (b) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (c) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (d) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16; (e) полинуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (f) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной полинуклеотидной последовательности (e) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (d).

В некоторых вариантах реализации указанный рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит одну или более дополнительных нуклеотидных последовательностей, содержащих обращенный концевой повтор (ИКП), маркер селекции, сайт начала репликации (ORI), нетранслируемую область (UTR) или сигнал полиаденилирования (polyA).

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, содержащую ИКП. В некоторых вариантах реализации указанный ИКП представляет собой ИКП AAV. В некоторых вариантах реализации ИКП AAV представляет собой ИКП AAV2 или ИКП AAV3. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный нуклеотид содержит два ИКП. В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или 17.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, содержащую polyA-сигнал. В некоторых вариантах реализации polyA-сигнал представляет собой искусственный polyA-сигнал. В некоторых вариантах реализации polyA-сигнал содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид дополнительно содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, содержащую маркер селекции. В некоторых вариантах реализации маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотикам. В некоторых вариантах реализации ген устойчивости к антибиотикам представляет собой ген  $\beta$ -лактамазы или ген устойчивости к канамицину. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный нуклеотид дополнительно не содержит первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую первый фрагмент белка hDYSF.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный нуклеотид не содержит последовательность AAV, отличную от одного или более ИКП.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный нуклеотид не содержит последовательность вируса, отличную от одного или более ИКП.

В настоящем документе дополнительно описана система двойного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая: (a) первый AAV-вектор, причем указанный первый AAV-вектор содержит первый рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий N-концевой фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный первый рекомбинантный полинуклеотид содержит первую нуклеотидную последовательность, причем указанная первая нуклеотидная последовательность состоит из: (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении

SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (b) второй AAV-вектор, причем указанный второй AAV-вектор содержит второй рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий С-концевой фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный второй рекомбинантный полинуклеотид содержит вторую нуклеотидную последовательность, причем указанная вторая нуклеотидная последовательность состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v).

В настоящем документе дополнительно описан вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий любой из рекомбинантных полинуклеотидов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид кодирует N-концевой фрагмент белка дисферлина человека. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид кодирует С-концевой фрагмент белка дисферлина человека. В некоторых вариантах реализации AAV-вектор представляет собой AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAVrh.10, AAVrh.20 или AAVrh.74. В некоторых вариантах реализации AAV-вектор представляет собой AAVrh.74.

Кроме того, в настоящем документе описана композиция, содержащая любой из AAV-векторов, описанных в настоящем документе.

Кроме того, в настоящем документе описана композиция, содержащая (a) первый вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), причем указанный первый гAAV-вектор содержит первый рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий N-концевой фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный первый рекомбинантный полинуклеотид содержит первую нуклеотидную последовательность, причем указанная первая нуклеотидная последовательность состоит из: (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (b) второй гAAV-вектор, где второй гAAV-вектор содержит второй рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий С-концевой фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный второй рекомбинантный полинуклеотид содержит вторую последовательность нуклеотидов, причем указанная вторая последовательность нуклеотидов состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v).

В некоторых вариантах реализации молярное отношение первого и второго гAAV-векторов составляет от приблизительно 100:1 до 1:100, от приблизительно 10:1 до 1:10, от приблизительно 2:1 до 1:2 или

приблизительно 1:1.

В настоящем документе дополнительно описан вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий: (a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 1 или 6; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (c) второй ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП.

В некоторых вариантах реализации указанный ИКП представляет собой ИКП AAV. В некоторых вариантах реализации ИКП AAV представляет собой ИКП AAV2 или ИКП AAV3. В некоторых вариантах реализации первый и/или второй ИКП содержат нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или 17.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор дополнительно содержит одну или более дополнительных полинуклеотидных последовательностей, содержащих промотор, интрон, селективный маркер или сайт начала репликации (ORI).

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор дополнительно содержит дополнительную полинуклеотидную последовательность, содержащую промотор. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой мышечно-специфичный промотор. В некоторых вариантах реализации мышечно-специфичный промотор представляет собой энхансер/промотор гибрида комплекса тяжелой цепи миозина и последовательности E-box креатинкиназы мышц. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой рекомбинантный промотор. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный промотор представляет собой рекомбинантный мышечно-специфичный промотор. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный мышечно-специфичный промотор представляет собой промотор МНСК7. В некоторых вариантах реализации промотор содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах реализации указанный AAV-вектор дополнительно содержит дополнительную полинуклеотидную последовательность, содержащую интрон. В некоторых вариантах реализации интрон содержит 5'-донорный сайт, точку ветвления и/или 3'-сайт сплайсинга. В некоторых вариантах реализации интрон представляет собой химерный интрон. В некоторых вариантах реализации интрон содержит 5'-донорный сайт из гена  $\beta$ -глобина человека. В некоторых вариантах реализации интрон содержит точку ветвления тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG). В некоторых вариантах реализации интрон содержит 3'-акцепторный сайт сплайсинга из тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG). В некоторых вариантах реализации интрон содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах реализации указанный AAV-вектор дополнительно содержит дополнительную полинуклеотидную последовательность, содержащую маркер селекции. В некоторых вариантах реализации маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотикам. В некоторых вариантах реализации ген устойчивости к антибиотикам представляет собой ген  $\beta$ -лактамазы или ген устойчивости к канамицину. В некоторых вариантах реализации AAV-вектор содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор дополнительно не содержит вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй фрагмент белка hDYSF.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор не содержит последовательность AAV, отличную от одного или более ИКП.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор не содержит вирусную последовательность, отличную от одного или более ИКП.

В настоящем документе дополнительно описан вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий: (a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 2 или 8; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотид, кодирующий фрагмент

белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотид, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичный полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) второй ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор дополнительно содержит одну или более полинуклеотидных последовательностей, содержащих маркер селекции, сайт начала репликации (ORI), нетранслируемую область (UTR) или сигнал полиаденилирования (polyA).

В некоторых вариантах реализации указанный ИКП представляет собой ИКП AAV. В некоторых вариантах реализации ИКП AAV представляет собой ИКП AAV2 или ИКП AAV3. В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или 17.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор дополнительно содержит дополнительную полинуклеотидную последовательность, содержащую polyA-сигнал. В некоторых вариантах реализации polyA-сигнал представляет собой искусственный polyA-сигнал. В некоторых вариантах реализации polyA-сигнал содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах реализации указанный AAV-вектор дополнительно содержит дополнительную полинуклеотидную последовательность, содержащую маркер селекции. В некоторых вариантах реализации маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотикам. В некоторых вариантах реализации ген устойчивости к антибиотикам представляет собой ген  $\beta$ -лактамазы или ген устойчивости к канамицину.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор дополнительно не содержит вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй фрагмент белка hDYSF.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор не содержит последовательность AAV, отличную от одного или более ИКП.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор не содержит вирусную последовательность, отличную от одного или более ИКП.

В настоящем документе описана система двойного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая: (I) первый AAV-вектор, причем указанный первый AAV-вектор содержит (a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 1 или 6; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) второй ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП; и (II) второй AAV-вектор, причем указанный второй AAV-вектор содержит (a) третий инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или 8; (ii) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 2 или 8; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотид, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичный полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) четвертый ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован третьим и четвертым ИКП.

В настоящем документе дополнительно описана система упаковки аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая: (a) плазмиду, содержащую рекомбинантный полинуклеотид, описанный в настоящем документе; (b) плазмиду-помощник аденовируса; и (с) плазмиду гер-сар. В некоторых случаях плазмиды-помощники аденовируса плазмиды включают плазмиду rHELP.

В настоящем документе дополнительно описана система упаковки аденоассоциированного вируса, содержащая: (a) плазмиду, содержащую рекомбинантный полинуклеотид, описанный в настоящем доку-

менте; и (b) плазмиду-помощник аденовируса. В некоторых случаях плазида-помощник аденовируса плазида включает плазмиду рHELP.

Кроме того, в настоящем документе описан способ получения вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), включающий приведение клетки в контакт с системой упаковки AAV, причем указанная система упаковки AAV содержит: (a) плазмиду, содержащую рекомбинантный полинуклеотид, описанный в настоящем документе; (b) плазмиду-помощник аденовируса; и (c) плазмиду гер-сар. В некоторых случаях клетка представляет собой клетку-хозяина, необязательно клетку-хозяина млекопитающего, необязательно HEK293.

Кроме того, в настоящем документе описан способ получения вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), включающий трансдукцию клеток упаковывающей линии системой упаковки AAV, причем указанная система упаковки AAV содержит (a) плазмиду, содержащую экспрессирующую AAV-кассету, содержащую любой из рекомбинантных полинуклеотидов, описанных в настоящем документе; и (b) плазмиду-помощник аденовируса, причем клетки упаковывающей линии экспрессируют гены гер и сар аденоассоциированного вируса. В некоторых случаях ген гер AAV представляет собой Rep78. В некоторых случаях ген сар AAV представляет собой ген Rh74 сар.

Кроме того, в настоящем документе описана клетка, содержащая любой из рекомбинантных полинуклеотидов, описанных в настоящем документе.

Кроме того, в настоящем документе описана клетка, содержащая экспрессирующую AAV-кассету, причем указанная экспрессирующая AAV-кассета содержит любой из рекомбинантных полинуклеотидов, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях плазида содержит полинуклеотид, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичный SEQ ID NO: 18 или 19. В некоторых случаях плазида содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 18 или 19.

Кроме того, в настоящем документе описан способ лечения дисферлинопатии, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту: (a) эффективного количества первого рекомбинантного полинуклеотида, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую N-концевой фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанная первая полинуклеотидная последовательность состоит из: (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (b) эффективного количества второго рекомбинантного полинуклеотида, содержащего вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую C-концевой фрагмент белка дисферлина человека, причем указанная вторая полинуклеотидная последовательность состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v).

В некоторых вариантах реализации первый полинуклеотид вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации второй полинуклеотид вводят внутримышечно или внутривенно.

В некоторых вариантах реализации первый и второй полинуклеотиды вводят одновременно или последовательно.

В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой пояснично-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.

В настоящем документе дополнительно описан способ лечения дисферлинопатии, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту (a) эффективного количества первого вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный первый AAV вектор содержит первый полинуклеотид, кодирующий N-концевой фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный первый полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% иден-

тичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 1 или 6; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (b) эффективного количества второго AAV-вектора, причем указанный второй AAV-вектор содержит второй полинуклеотид, кодирующий С-концевой фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный второй полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 2 или 8; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотида, кодирующего фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотида, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичного полинуклеотида (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v).

В некоторых вариантах реализации первый AAV-вектор вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации второй AAV-вектор вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации первый и второй AAV-векторы вводят одновременно.

В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2В (LGMD2В) или миопатию Миоши.

В некоторых вариантах реализации способ лечения дисферлинопатии включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества любой из систем двойного AAV-вектора, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации систему двойного AAV-вектора вводят внутримышечно или внутривенно.

В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2В (LGMD2В) или миопатию Миоши.

В некоторых вариантах реализации способ лечения дисферлинопатии включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества любой из композиций, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации композицию вводят внутримышечно или внутривенно.

В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2В (LGMD2В) или миопатию Миоши.

В настоящем документе дополнительно описано применение композиции при производстве лекарственного средства для лечения дисферлинопатии у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанная композиция содержит (a) первый рекомбинантный полинуклеотид, содержащий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую N-концевой фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанная первая полинуклеотидная последовательность состоит из: (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (b) второй рекомбинантный полинуклеотид, содержащий вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую С-концевой фрагмент белка дисферлина человека, причем указанная вторая полинуклеотидная последовательность состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотидной последовательности, кодирующей фраг-

мент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v).

В некоторых вариантах реализации первый полинуклеотид вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации второй полинуклеотид вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации первый и второй полинуклеотиды вводят одновременно.

В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.

В настоящем документе описано применение композиции при производстве лекарственного средства для лечения дисферлинопатии у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанная композиция содержит: (a) эффективное количество первого вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный первый AAV-вектор содержит первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую N-концевой фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный первый полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 1 или 6; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (b) эффективное количество второго вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный второй AAV-вектор содержит второй полинуклеотид, кодирующий C-концевой фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный второй полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 2 или 8; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотида, кодирующего фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотида, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичного полинуклеотида (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v).

В некоторых вариантах реализации первый AAV-вектор вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации второй AAV-вектор вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации первый и второй AAV-векторы вводят одновременно.

В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.

В настоящем документе описано применение композиции для получения лекарственного средства для лечения дисферлинопатии у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанная композиция содержит любую из систем двойного AAV-вектора, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации композицию вводят внутримышечно или внутривенно.

В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.

В настоящем документе описано применение любой из описанных композиций при производстве лекарственного средства для лечения дисферлинопатии у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах реализации композицию вводят внутримышечно или внутривенно.

В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.

В некоторых вариантах реализации эффективное количество первого AAV-вектора составляет от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{16}$  vg/кг, приблизительно  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^{15}$  vg/кг или приблизительно  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{14}$  vg/кг при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения.

В некоторых вариантах реализации эффективное количество второго AAV-вектора составляет от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{16}$  vg/кг, приблизительно  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^{15}$  vg/кг или приблизительно  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{14}$  vg/кг при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения.

В некоторых вариантах реализации первый AAV-вектор вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 раз.

В некоторых вариантах реализации второй AAV-вектор вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 раз.

В некоторых вариантах реализации эффективное количество системы двойного AAV-вектора составляет приблизительно  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{13}$  векторных геномов (vg), приблизительно  $1 \times 10^{11}$ - $1 \times 10^{13}$  vg,  $1 \times 10^{12}$ - $1 \times 10^{13}$  vg.

В некоторых вариантах реализации систему двойного AAV-вектора вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 раз.

В некоторых вариантах реализации эффективное количество композиции составляет от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до  $1 \times 10^{13}$  векторных геномов (vg), приблизительно  $1 \times 10^{11}$ - $1 \times 10^{13}$ vg,  $1 \times 10^{12}$ - $1 \times 10^{13}$ vg.

В некоторых вариантах реализации композицию вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 раз.

В настоящем документе описан рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий белок дисферлина человека (hDYSF), причем последовательность указанного рекомбинантного полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах реализации последовательность указанного рекомбинантного полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20.

В настоящем документе описан способ получения рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего белок дисферлина человека (hDYSF), причем последовательность указанного рекомбинантного полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20, причем указанный способ включает приведение клетки в контакт с рекомбинантным полинуклеотидом, содержащим указанную полинуклеотидную последовательность, кодирующую N-концевой участок белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанная первая полинуклеотидная последовательность состоит из: (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (b) второй рекомбинантный полинуклеотид, содержащий вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую C-концевой фрагмент белка дисферлина человека, причем указанная вторая полинуклеотидная последовательность состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v).

В настоящем документе описан способ получения рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего белок дисферлина человека (hDYSF), причем указанный рекомбинантный полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20, причем указанный способ включает приведение клетки в контакт с системой двойного AAV-вектора, содержащей: (I) первый AAV-вектор, причем указанный первый AAV-вектор содержит (a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 1 или 6; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности

сти SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) второй ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП; и (II) второй AAV-вектор, причем указанный второй AAV-вектор содержит (а) третий инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека, причем последовательность указанного полинуклеотида состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 2 или 8; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 14 или 16; (v) последовательность полинуклеотида, кодирующего фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотид, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичный полинуклеотиду (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) четвертый ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован третьим и четвертым ИКП.

В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой мышечную клетку, клетку сердца, стволовую клетку, сателлитную клетку и/или клетку печени.

В настоящем документе описан способ получения рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего белок дисферлина человека (hDYSF), причем последовательность указанного рекомбинантного полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20, причем указанный способ включает введение субъекту рекомбинантного полинуклеотида, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую N-концевой участок белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанная первая полинуклеотидная последовательность состоит из: (а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (и) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (b) второй рекомбинантный полинуклеотид, содержащий вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую C-концевой фрагмент белка дисферлина человека, причем указанная вторая полинуклеотидная последовательность состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v).

В настоящем документе описан способ получения рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего белок дисферлина человека (hDYSF), причем указанный рекомбинантный полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20, причем указанный способ включает введение субъекту системы двойного AAV-вектора, содержащей: (I) первый AAV-вектор, причем указанный первый AAV-вектор содержит (а) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 1 или 6; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID

NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) второй ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП; и (II) второй AAV-вектор, причем указанный второй AAV-вектор содержит (а) третий инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или 8; (ii) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 2 или 8; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотид, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичный полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) четвертый ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован третьим и четвертым ИКП.

В настоящем документе описан способ лечения мышечной дистрофии субъекта, включающий экспрессию рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего белок дисферлина человека (hDYSF), причем последовательность указанного рекомбинантного полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20 у субъекта.

В некоторых вариантах реализации способ включает введение субъекту рекомбинантного полинуклеотида, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую N-концевой фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанная первая полинуклеотидная последовательность состоит из: (а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (b) второй рекомбинантный полинуклеотид, содержащий вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую C-концевой фрагмент белка дисферлина человека, причем указанная вторая полинуклеотидная последовательность состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v).

В некоторых вариантах реализации способ включает введение субъекту системы двойного AAV-вектора, содержащей: (I) первый AAV-вектор, причем указанный первый AAV-вектор содержит (а) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 1 или 6; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на

всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) второй ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП; и (II) второй AAV-вектор, причем указанный второй AAV-вектор содержит (а) третий инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 или 8; (ii) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 2 или 8; (iii) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 14 или 16; (v) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотид, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичный полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) четвертый ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован третьим и четвертым ИКП.

В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой млекопитающее, выбранное из человека, примата, не являющегося человеком, собаки, овцы, лошади, свиньи, мыши, крысы, кролика, крупного рогатого скота или кошки.

В некоторых вариантах реализации субъект страдает от дисферлинопатии. В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2В (LGMD2В) или миопатию Миоши.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена схема системы двойного AAV-вектора для лечения дисферлинопатии. 5'-вектор (например, AAV-вектор 5'-hDYSF), pAAV.MHCK7.DYSF5'.PTG (PTC=промотор/транскрипционный элемент) содержит мышечно-специфичный промотор MHCK7, химерный интрон, консенсусную последовательность Козака и 5'-фрагмент кДНК DYSF, соответствующий 1-1113 аминокислотам SEQ ID NO: 12. 3'-вектор (например, AAV-вектор 3'-hDYSF), pAAV.DYSF3'.POLYA, содержит 3'-фрагмент кДНК DYSF, соответствующий 794-2080 аминокислотам SEQ ID NO: 12, и 3'-UTR DYSF, несущую сигнал полиаденилирования.

На фиг. 2 представлена карта векторной ДНК-плазмиды pAAV.MHCK7.DYSF5'.PTG.

На фиг. 3 представлена карта векторной ДНК-плазмиды pAAV.DYSF3'.POLYA.

На фиг. 4А-4D показана экспрессия дисферлина после доставки системы двойного вектора. После доставки обоих векторов наблюдали устойчивую экспрессию полноразмерного дисферлина с помощью иммунологического окрашивания (фиг. 4А) и вестерн-блоттинга (фиг. 4С). Доставка любого вектора по отдельности не приводила к aberrантной экспрессии дисферлина (фиг. 4В: иммунное окрашивание, фиг. 4D: вестерн-блоттинг). 3222 представляет собой полноразмерный контроль.

На фиг. 5А-5С показаны результаты временного хода экспрессии дисферлина после доставки gAAVrh74.MHCK7.DYSF.DV. На фиг. 5А продемонстрирована экспрессия полноразмерного дисферлина с помощью иммунологического мечения дисферлина (верхние панели), наблюдаемая после доставки двойных векторов в левую переднюю большеберцовую мышцу (LTA). Экспрессия дисферлина сохранялась в течение 1, 3 и 6 месяцев после обработки без aberrантного ответа при патологии (H&E, нижние панели). Шкала 100 мкм. N=4 на момент времени. На фиг. 5В показан вестерн-блоттинг 1, 3, 6-месячных образцов, демонстрирующих экспрессию полноразмерного дисферлина в LTA после инъекции (2 на группу),  $\gamma$ -тубулин использовали в качестве контроля загрузки. На фиг. 5С показан график биораспределения векторных геномов на мкг геномной ДНК через 3 и 6 месяцев после инъекции для различных тканей. Примечание: LTA подвергали обработке; логарифмическая ось.

На фиг. 6 показан вестерн-блоттинг мышцы-мишени (LTA) и нецелевых тканей 4 отдельных животных, получавших внутримышечную инъекцию gAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV в конечные моменты 3 или 12 месяцев.

На фиг. 7А-7С показана экспрессия дисферлина после системной доставки AAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV. На фиг. 7А показано иммунологическое мечение дисферлина в тканях после системной доставки  $6 \times 10^{12}$  vg ( $2,4 \times 10^{13}$  vg/kg при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения) AAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV (n=6 на дозу). Показаны мышцы сердца, желудочно-кишечного тракта, диафрагмы и четырехглавой мышцы для тканей Dysf<sup>-/-</sup>, тканей, обработанных (AAV.DV), и тканей дикого типа (ДТ). На фиг. 7В показана количественная оценка централизованных ядер в передней большеберцовой мышце (LTA), желудочно-кишечном тракте (RGAS), четырехглавой мышце (LQD), трицепсе (RTri) и диафрагме. \*p < 0,05 - значимое разли-

чие между образцом и диким типом, # - значимое различие между образцом и диким типом отсутствует. На фиг. 7С показан вестерн-блоттинг тканевых лизатов (Н: сердце, G: желудочно-кишечный тракт, Q: четырехглавая мышца, D: диафрагма), демонстрирующий полосу полноразмерного дисферлина при 237 кДа,  $\gamma$ -тубулин включали в качестве контроля нагрузки.

На фиг. 8 показана мембрановосстанавливающая активность в зависимости от дозы после доставки AAVrh.74.DYSF.DV.

На фиг. 9 показано купирование фиброза и воспаления после системной доставки AAVrh.74.МНСК7.DYSF.DV. Мыши BlaJ получали  $6 \times 10^{12}$  vg ( $2,4 \times 10^{13}$  vg/kg) при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения. AAVrh.74.МНСК7.DYSF.DV (n=6). Поясничную мышцу удаляли и анализировали на наличие фиброза (средний столбец) и мононуклеарных CD8-клеток. После доставки гена наблюдали значимое снижение обоих параметров.

На фиг. 10А-10В продемонстрировано, что системная доставка rAAVrh.74.МНСК7.DYSF.DV восстанавливала функциональный дефицит у Dysf<sup>-/-</sup>-мышей. Фиг. 10А: собирали полоски мышцы диафрагмы и подвергали их обработке согласно протоколу для оценки удельной силы. Обработанные образцы диафрагмы продемонстрировали значительное улучшение силы (\*\*p > 0,01, ANOVA), которая не отличалась от силы мышц дикого типа при обеих дозах [ $2 \times 10^{12}$  vg общего AAV.DYSF DV ( $8 \times 10^{13}$  vg/kg при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения), или  $6 \times 10^{12}$  vg общего AAV.DYSF.DV ( $2,4 \times 10^{13}$  vg/kg при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения)]. На фиг. 10В показан ответ в отношении восстановления герметичности мембраны в зависимости от дозы. Значимое улучшение при применении низкой дозы отсутствовало.

На фиг. 11А-11D показаны результаты мониторинга Т-клеточных ответов на капсид AAV и дисферлин. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли и подвергали воздействию пептидов, содержащих капсид AAV5 и AAVrh.74 (синие полосы), а также дисферлин человека (зеленый). Т-клеточные ответы на капсид AAV5 и дисферлин отслеживали через 3 месяца (фиг. 11А) и 6 месяцев (фиг. 11В). Т-клеточные ответы на капсид AAVrh.74 и дисферлин отслеживали через 3 месяца (фиг. 11С) и 6 месяцев (фиг. 11D).

На фиг. 12А-12С показана экспрессия дисферлина у приматов, не являющихся человеком. На фиг. 12А показаны гистологические изображения (H&E) и иммунофлуоресцентные (IF) изображения дисферлина в ткани ННР через 3 и 6 месяцев после инъекции AAV5.DYSF или AAVrh.74.DYSF.DV. Окрашенные H&E срезы демонстрируют отсутствие инфильтрации клеток иммунной системы и некроза волокон. IF-срезы демонстрируют сверхэкспрессию дисферлина в тканях, подвергшихся инъекции, по сравнению с нативными (имитационными). На фиг. 12В показан вестерн-блоттинг тканей через 3 и 6 месяцев после инъекции как AAV5.DYSF, так и AAVrh.74.DYSF.DV. Важно отметить, что ткани, подвергавшиеся инъекции, демонстрируют сверхэкспрессию дисферлина по сравнению с имитационным контролем. Положительный (+) контроль представляет собой ткань мышцы дикого типа, а отрицательный (-) контроль представляет собой ткань 129-Dysf<sup>-/-</sup>, не подвергавшуюся инъекции. На фиг. 12С показано биораспределение векторных геномов после в/м инъекции AAVrh.74.DYSF.DV в левую ТА, обратите внимание: логарифмическая шкала.

На фиг. 13 продемонстрировано применение антитела против FLAG для подтверждения экспрессии дисферлина с вектора. N-концевой FLAG-маркер использовали для различения эндогенного и происходящего из AAV дисферлина.

### Подробное описание изобретения

#### Определения

Если не задано иное, все термины (включая технические и научные термины), используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно используемое специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Кроме того, следует понимать, что термины, определение которых приведено, например, в общепотребительных словарях, следует интерпретировать как термины, значение которых согласуется с их значением в настоящем документе и соответствующего уровня техники, и не следует интерпретировать в идеализированном или чрезмерно формальном смысле, если иное не указано в настоящем документе явным образом. Хотя определение таких терминов не приведено ниже явным образом, их следует интерпретировать в соответствии с их общепринятым значением.

Терминология, используемая в настоящем описании, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения настоящего изобретения. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие источники, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Если не указано иное, при реализации настоящей технологии следует использовать обычные методики, применяемые в области культивирования тканей, иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и технологии рекомбинантных ДНК, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

Если из контекста не следует иное, явным образом подразумевается, что различные признаки изобретения, описанные в настоящем документе, можно использовать в любой комбинации. Кроме того, настоящее изобретение также предполагает, что в некоторых вариантах реализации любой признак или комбинация признаков, изложенные в настоящем документе, могут быть исключены или опущены. В качестве иллюстрации, если в описании указано, что комплекс содержит компоненты А, В и С, то, в частности, предполагается, что любой из А, В или С или их комбинация могут быть исключены и отвергнуты по отдельности или в любой комбинации. Если иное не указано явным образом, все указанные варианты реализации, признаки и термины должны включать как указанный вариант реализации, признак или термин, так и их биологические эквиваленты.

Все численные обозначения, например, значения рН, температуры, времени, концентрации и молекулярной массы, включая диапазоны, представляют собой приближенные значения, которые изменяются в сторону (+) или (-) с шагом 1,0 или 0,1, в зависимости от обстоятельств, или, в качестве альтернативы, с отклонением на +/-15%, или, в качестве альтернативы, 10%, или, в качестве альтернативы, 5%, или, в качестве альтернативы, 2%, и такие диапазоны входят в рамки настоящего изобретения. Следует понимать, что всем численным обозначениям предшествует термин "приблизительно", хотя это и не всегда указано явным образом. Также следует понимать, что реагенты, описанные в настоящем документе, являются исключительно иллюстративными, хотя это и не всегда указано явным образом, и что в данной области техники известны их эквиваленты.

Если не указано иное, при реализации настоящей технологии следует использовать обычные методики, применяемые в области органической химии, фармакологии, иммунологии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии и технологии рекомбинантных ДНК, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. См., например, Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> edition (1989); *Current Protocols In Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, a Laboratory Manual*, и *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)).

В настоящем документе термины "повышенный", "пониженный", "высокий", "низкий" или любые их грамматические вариации относятся к отклонению приблизительно на 90%, 80%, 50%, 20%, 10%, 5%, 1%, 0,5% или даже 0,1% от эталонной композиции, полипептида, белка и т.д.

Термины "приемлемый", "эффективный" или "достаточный" при использовании для описания выбора любых компонентов, диапазонов, лекарственных форм и т.д., описанных в настоящем документе, подразумевают, что указанный компонент, диапазон, лекарственная форма и т.д. подходят для описанной цели.

Кроме того, в настоящем документе термин "и/или" относится к и охватывает все возможные комбинации одного или более связанных с ним перечисленных элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в качестве альтернативы варианту ("или").

Следует подразумевать, что если настоящее изобретение относится к полипептиду, белку, полинуклеотиду или антителу, при отсутствии четкого указания, если не подразумевается иное, предполагается, что эквивалент или биологический эквивалент такого соединения входит в рамки настоящего изобретения. В настоящем документе термин "биологический эквивалент" считается синонимом термина "эквивалент", когда речь идет об эталонном белке, антителе, полипептиде или нуклеиновой кислоте, и относится к эквивалентам с минимальной идентичностью последовательности при сохранении желательной структуры или функциональности. Если это не указано в настоящем документе явным образом, следует считать, что любой полинуклеотид, полипептид или белок, упомянутый в настоящем документе, также включает его эквиваленты. Например, эквивалент подразумевает по меньшей мере приблизительно 70% гомологию или идентичность или по меньшей мере 80% гомологию или идентичность и, в качестве альтернативы, или по меньшей мере приблизительно 85%, или, в качестве альтернативы, по меньшей мере приблизительно 90%, или, в качестве альтернативы, по меньшей мере приблизительно 95%, или, в качестве альтернативы, 98% гомологию или идентичность на всем протяжении эталонной последовательности и проявляет по существу эквивалентную биологическую активность по отношению к эталонному белку, полипептиду или нуклеиновой кислоте. В качестве альтернативы, когда речь идет о полинуклеотидах, их эквивалент в одном аспекте представляет собой полинуклеотид, гибридирующий в жестких условиях с эталонным полинуклеотидом или его комплементарной последовательностью и, в дополнительном аспекте, обладающий такой же или сходной активностью или функцией, что и эталонный полинуклеотид или его комплементарная последовательность.

Эквивалент белка или полипептида (называемого в настоящем документе эталоном) обладает по меньшей мере 50% (или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%) идентичностью эталону и сохраняет функцию и технологичность эталона.

В настоящем документе термины "функция", "активность" и "ферментативная активность" используются взаимозаменяемо. Показано, что потеря дисферлина ставит под угрозу восстановление Ca<sup>2+</sup>-зависимой мембраны в скелетных мышцах (Song et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:4084-4088, 2001 и Schnepf et al., *J. Virol.* 77:3495-3504, 2003). Кроме того, показано, что дисферлин взаимодействует с дру-

гими белками, участвующими в восстановлении мембран, включая аннексины A1 и A2, ANNAK и кавеолин-3 (Schnepp et al., *J. Virol.* 77:3495-3504, 2003, Duan et al., *J. Virol.* 72:8568-8577, 1998, Donsante et al., *Gene Ther.* 8:1343-1346, 2001, и Monahan et al., *Expert Opin. Drug. Saf.* 1:79-91, 2002). Считается, что утрата регенеративной способности мышечных волокон является сопутствующим следствием недостаточности дисферлина (Song et al., *Gene Ther.* 8:1299-1306, 2001). Дисферлин также ассоциирован с транспортом везикул, эндоцитозом и образованием Т-трубочек (Eveson et al., *The Journal of Biological Chemistry* 285:28529-28539, 2010, Klinge et al., *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21:1768-1776, 2007, and Klinge et al., *Muscle & Nerve* 41:166-173, 2010). Соответственно, примеры активности дисферлина включают восстановление мембраны в скелетной мышце, например, восстановление герметичности мембраны, предотвращение или восстановление регенеративной способности мышечных волокон, транспорт везикул, эндоцитоз и образование поперечных (Т-) трубочек, но не ограничиваются ими. Анализы восстановления мембраны, анализы транспорта везикул и анализы образования трубочек известны в данной области техники, и их можно использовать для измерения активности дисферлина *in vitro*. См., например, источники Carmelle et al., *Methods Mol. Biol.* 1668:195-207, 2017, Vassilieva and Nusrat, *Methods Mol. Biol.* 440:3-14, 2008, Demonbreun et al., *Am. J. Pathol.* 184(1):248-59, 2014, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные способы измерения активности дисферлина можно найти, например, в Grose et al., *PLoS One* 7:e39233, 2012 и Sondergaard et al., *Anns of Clin. Trans. Neurol.* 2:256-270, 2015. Эквивалент полинуклеотида (называемого в настоящем документе эталоном) обладает по меньшей мере 50% (или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%) идентичностью эталону и кодирует тот же полипептид, что и полипептид, кодируемый эталоном, или кодирует эквивалент полипептида, кодируемого эталоном.

Для достижения положения или последовательного сегмента тестовой последовательности, эквивалентного (или соответствующего) аминокислотному/нуклеотидному остатку или последовательному сегменту эталонной последовательности, выполняют выравнивание тестовой и эталонной последовательностями. Положения или сегменты, выровненные друг с другом, определяют как эквиваленты.

Термин "аффинный маркер" относится к полипептиду, который можно включить в состав гибридного белка для обеспечения обнаружения гибридного белка и/или очистки гибридного белка из клеточной среды с использованием лиганда, который способен связываться, т.е. обладает сродством к аффинному маркеру. Лиганд может представлять собой антитело, смолу или дополняющий полипептид, но не ограничивается ими. Аффинный маркер может содержать небольшой пептид, обычно пептид длиной приблизительно от 4 до 16 аминокислот, или более крупный полипептид. Обычно используемые аффинные маркеры включают, в числе прочего, полиаргинин, FLAG, V5, полигистидин, с-Мус, Strep II, белок, связывающий мальтозу (MBP), белок-вещество N-утилизации A (NusA), тиоредоксин (Trx) и глутатион-S-трансферазу (GST) (например, см. *GST Gene Fusion System Handbook - Sigma-Aldrich*). В одном варианте реализации аффинный маркер представляет собой полигистидиновый маркер, например, маркер His<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 21). Включение аффинного маркера в гибридный белок позволяет очистить гибридный белок из клеточной среды путем аффинной очистки, используя аффинную среду, способную прочно и специфично связывать аффинный маркер. Аффинная среда может содержать, например, металлсодержащую смолу или лиганд, ковалентно связанный с неподвижной фазой (матрицей), например, агарозой или металлическими гранулами. Например, гибридные белки, меченные полигистидином (также называемые His-мечеными гибридными белками), можно выделять с помощью хроматографии на иммобилизованных ионах металла с использованием смол, загруженных Ni<sup>2+</sup> или Co<sup>2+</sup>, аффинные гели в антителом против FLAG можно использовать для захвата гибридных белков с FLAG-маркером, а глутатион, перекрестно связанный с твердой подложкой, например, агарозой, можно использовать для захвата гибридных белков с маркером GST. В одном аспекте аффинный маркер представляет собой маркер очистки.

В настоящем документе термины "очистка" или "разделение" относятся к процессу выделения одного или более биоматериалов (например, полинуклеотидов, полипептидов или вирусных векторов) из сложной смеси, например, лизата клеток или смеси полипептидов. Очистка, разделение или выделение не обязательно должны быть полными, т.е. некоторые компоненты сложной смеси могут оставаться с одним или более биоматериалами (например, полинуклеотидами, полипептидами или вирусными векторами) после процесса очистки. Однако продукт очистки должен быть обогащен одним или более биоматериалами (например, полинуклеотидами, полипептидами или вирусными векторами) по сравнению со сложной смесью перед очисткой, и процесс очистки должен удалить значительную часть других компонентов, первоначально присутствующих в сложной смеси.

Термин "клетка" в настоящем документе может относиться к прокариотической или эукариотической клетке, необязательно полученной от субъекта или из коммерчески доступного источника. В некоторых случаях клетка представляет собой клетку-хозяина, например, клетку млекопитающего или клетку-хозяина млекопитающего. В некоторых случаях клетку-хозяина также называют в настоящем документе продуцирующей клеткой или упаковывающей клеткой. В некоторых случаях линия клеток представляет собой линию упаковывающих клеток.

"Эукариотические клетки" включают все царства, за исключением дробянок. Их легко отличить по

наличие ядра, окруженного мембраной. Животные, растения, грибы и простейшие являются эукариотами или организмами, клетки которых организованы в сложные структуры внутренними мембранами и цитоскелетом. Наиболее характерной структурой, ограниченной мембраной, является ядро. Если специально не указано иное, термин "хозяин" включает эукариотического хозяина, включая, например, клетки дрожжей, высших растений, насекомых и млекопитающих. Неограничивающие примеры эукариотических клеток или хозяев включают клетки обезьян, крупного рогатого скота, свиней, мышей, крысы, птиц, рептилий и человека, например, клетки HEK293, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки CHO-S, клетки CHO-K1, клетки 293T, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомячка (BHK), клетки Sf9, стволовые клетки, сателлитные клетки и мышечные клетки. Примеры мышечных клеток включают клетки скелетных мышц, клетки сердечной мышцы и клетки гладких мышц, но не ограничиваются ими.

"Прокариотические клетки", которые обычно не содержат ядра или любых других органелл, ограниченных мембранами, подразделяются на два домена - бактерий и архей. Помимо хромосомной ДНК, эти клетки могут также содержать генетическую информацию в кольцевой структуре, называемой эпизомой. Бактериальные клетки очень мелкие, размером приблизительно с митохондрию животного (приблизительно 1-2 мкм в диаметре и 10 мкм в длину). Прокариотические клетки имеют три основные формы: палочкообразную, сферическую и спиральную. Вместо осуществления сложных процессов репликации, как у эукариот, бактериальные клетки делятся путем деления пополам. Примеры включают бактерии *Bacillus*, бактерию *E. coli* и бактерию *Salmonella*, но не ограничиваются ими.

Термин "кодировать" по отношению к последовательностям нуклеиновых кислот относится к полинуклеотиду, про который говорят, что он "кодирует" полипептид, если в его нативном состоянии или после обработки с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, его можно транскрибировать и/или транслировать с получением мРНК полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь комплементарна такой нуклеиновой кислоте, и по ней можно установить кодирующую последовательность.

Термины "эквивалентный" или "биологический эквивалент" используются взаимозаменяемо, когда речь идет о конкретной молекуле, биологическом или клеточном материале, и подразумевают материалы, обладающие минимальной гомологией и сохраняющие желательную структуру или функционал (например, обладающие аналогичной функцией или активностью). Следует понимать, без четкого указания, что, когда речь идет об эквиваленте или биологическом эквиваленте эталонного полипептида, белка или полинуклеотида, такой эквивалент или биологический эквивалент характеризуется указанным структурным родством по отношению к эталонному полипептиду, белку или полинуклеотиду и эквивалентной или по существу эквивалентной биологической активностью. Например, неограничивающие примеры эквивалентных полипептидов, белков или полинуклеотидов включают полипептид, белок или полинуклеотид, характеризующийся по меньшей мере 60% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 65% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 70% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 75% или, в качестве альтернативы, 80% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 85% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 90% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 95% идентичностью по отношению к ним или к последовательностям полипептида, полинуклеотида или белка на всем протяжении эталонного полипептида, полинуклеотида или белка. В качестве альтернативы, эквивалентный полипептид представляет собой полинуклеотид или его комплементарную последовательность, гибридизующийся в условиях высокой жесткости с полинуклеотидом, кодирующим такие эталонные полипептидные последовательности, и обладающий эквивалентной или по существу эквивалентной биологической активностью. Условия высокой жесткости описаны в настоящем документе и включены в него посредством ссылки. В качестве альтернативы, эквивалент представляет собой полипептид, кодируемый полинуклеотидом или его комплементарной последовательностью, характеризующийся по меньшей мере 70% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 75% или, в качестве альтернативы, 80% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 85% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 90% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 95% идентичностью или по меньшей мере 97% идентичностью последовательности по отношению к эталонному полинуклеотиду, например, полинуклеотиду дикого типа, на всем протяжении эталонного полинуклеотида. Такие эквивалентные полипептиды обладают той же биологической активностью, что и полипептид, кодируемый эталонным полинуклеотидом.

Неограничивающие примеры эквивалентных полинуклеотидов включают полинуклеотид, характеризующийся по меньшей мере 60% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 65% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 70% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 75% или, в качестве альтернативы, 80% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 85% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 90% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 95% или, в качестве альтернативы, по меньшей мере 97% идентичностью по отношению к эталонному полинуклеотиду. Эквивалент также подразумевает полинуклеотид или его комплементарную последовательность, гибридизующийся в условиях высокой жесткости с эталонным полинуклеотидом. Такие эквивалентные полинуклеотиды обладают такой же биологической активностью, что и эталонный полинуклеотид. Если полинуклеотид или участок полинуклеотида (или полипептид или участок полипептида) характеризуется некоторым процентом (например, 80%, 85%, 90% или 95%) "идентичности последовательности" другой последовательности, то

это означает, что при выравнивании указанный процент оснований (или аминокислот) совпадает при сравнении двух указанных последовательностей на всем протяжении эталонного полинуклеотида. Выполнить выравнивание и определить процент гомологии или идентичности последовательности можно с помощью программного обеспечения, известного в данной области техники, например, описанного в *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1. В некоторых вариантах реализации для выравнивания применяют параметры по умолчанию. Неограничивающим примером программы выравнивания является BLAST с использованием параметров по умолчанию. В частности, типичные программы включают BLASTN и BLASTP, в которых используют следующие параметры по умолчанию: генетический код=стандартный; фильтр=нет; цепь=обе; порог=60; ожидание=10; матрица=BLOSUM62; описания=50 последовательностей; сортировка по=ВЫСОКАЯ ОЦЕНКА; базы данных=неизбыточные, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR. Подробную информацию об этих программах можно найти по следующему адресу в Интернете: [ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). Идентичность последовательностей и процент идентичности можно определить путем включения их в clustalW (доступно по адресу в сети: [genome.jp/tools/clustalw/](http://genome.jp/tools/clustalw/), дата последнего доступа 13 января 2017 г.) или Clustal Omega (доступно по адресу [ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)).

"Гомология", или "идентичность", или "сходство" относится к сходству между последовательностями двух пептидов или между последовательностями двух молекул нуклеиновой кислоты. Гомологию можно определить путем сравнения положений в каждой последовательности, которые можно выровнять с целью сравнения. Если положение в сравниваемой последовательности занято таким же основанием или аминокислотой, то молекулы гомологичны по данному положению. Степень гомологии между последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для указанных последовательностей. "Неродственные" или "негомологичные" последовательности менее чем на 40% идентичны или, в качестве альтернативы, менее чем на 25% идентичны одной из последовательностей в соответствии с настоящим изобретением.

В настоящем документе термин "по меньшей мере 90% идентичный" относится к идентичности двух сравниваемых последовательностей (полинуклеотидов или полипептидов), составляющей от приблизительно 90% до приблизительно 100%. Он также включает идентичность, равную по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, от приблизительно 91% до приблизительно 100%, от приблизительно 92% до приблизительно 100%, от приблизительно 93% до приблизительно 100%, от приблизительно 94% до приблизительно 100%, от приблизительно 95% до приблизительно 100%, от приблизительно 96% до приблизительно 100%, от приблизительно 97% до приблизительно 100%, от приблизительно 98% до приблизительно 100% или от приблизительно 99% до приблизительно 100%.

В настоящем документе термины "сохранять", "сходный" и "одинаковый" используются взаимозаменяемо при описании функции, активности или функциональной активности полинуклеотида, белка и/или пептида, относящейся к функциональной активности, составляющей по меньшей мере приблизительно 20% (включая по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или приблизительно 100%, но не ограничиваясь ими) от активности эталонного белка, полинуклеотида и/или пептида.

"Гибридизация" относится к реакции, в которой один или более полинуклеотидов реагируют с образованием комплекса, стабилизирующегося посредством водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков. Образование водородных связей может происходить путем спаривания оснований по Уотсону-Крику, связывания по Хугстину или любым другим образом, специфичным по отношению к последовательности. Комплекс может содержать две цепи, образующие двойную структуру, три или более цепей, образующих многоцепочечный комплекс, одну самогибридирующуюся цепь или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может представлять собой этап в более обширном процессе, например, иницировании реакции ПЦР или ферментативном расщеплении полинуклеотида рибозимом. Примеры жестких условий гибридизации включают: температуру инкубирования от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C; концентрации буфера для гибридизации от приблизительно 6×SSC до приблизительно 10×SSC; концентрации формамида от приблизительно 0% до приблизительно 25%; и растворы для промывки от приблизительно 4×SSC до приблизительно 8×SSC. Примеры умеренных условий гибридизации включают: температуру инкубирования от приблизительно 40°C до приблизительно 50°C; концентрации буфера от приблизительно 9×SSC до приблизительно 2×SSC; концентрации формамида от приблизительно 30% до приблизительно 50%; и растворы для промывки от приблизительно 5×SSC до приблизительно 2×SSC. Примеры условий высокой жесткости включают: температуру инкубирования от приблизительно 55°C до приблизительно 68°C; концентрации буфера от приблизительно 1×SSC до приблизительно 0,1×SSC; концентрации формамида от приблизительно 55% до приблизительно 75%; и рас-

творы для промывки, представляющие собой приблизительно  $1 \times SSC$ ,  $0,1 \times SSC$  или деионизированную воду. Как правило, время инкубирования при гибридизации составляет от 5 мин до 24 ч с 1, 2 или более этапами промывки, а время инкубирования при промывке составляет приблизительно 1, 2 или 15 мин.  $SSC$  представляет собой  $0,15 \text{ M NaCl}$  и  $15 \text{ mM}$  цитратный буфер. Очевидно, что можно применять эквиваленты  $SSC$  с использованием других буферных систем. В одном аспекте эквивалентный полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, гибридизующийся в жестких условиях с эталонным полинуклеотидом или его комплементарной последовательностью. В еще одном аспекте эквивалентный полипептид представляет собой полипептид, кодируемый полинуклеотидом, гибридизующимся в жестких условиях с эталонным полинуклеотидом или его комплементарной последовательностью.

В настоящем документе термин "экспрессия" относится к процессу, посредством которого полинуклеотиды транскрибируются в мРНК, и/или процессу, посредством которого транскрибируемая мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

В настоящем документе термин "функциональный" может быть использован для модификации любой молекулы, биологического или клеточного материала с целью достижения конкретного, определенного эффекта.

В настоящем документе термины "нуклеотидная последовательность" и "полинуклеотид" используются взаимозаменяемо для обозначения полимерной формы нуклеотидов любой длины, как рибонуклеотидов, так и дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает одно-, двух- или многоцепочечную ДНК или РНК, геномную ДНК, комплементарную ДНК (кДНК), гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или производные нуклеотидные основания, но не ограничивается ими. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит и/или кодирует матричную РНК (мРНК), короткую шпилечную РНК и/или малую шпилечную РНК. В одном варианте реализации указанный полинуклеотид представляет собой или кодирует мРНК. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид представляет собой двуцепочечную (лц) ДНК, например, сконструированную дц-ДНК или дц-кДНК, синтезированную из одноцепочечной РНК.

Термины "белок", "пептид" и "полипептид" используются взаимозаменяемо и в самом широком смысле для обозначения соединения, состоящего из двух или более субъединиц аминокислот, аналогов аминокислот или пептидомиметиков. Указанные субъединицы могут быть соединены пептидными связями. В еще одном аспекте субъединица может быть связана другими связями, например, эфирной, сложноэфирной и т.д. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и максимальное количество аминокислот, которое может содержать последовательность белка или пептида, не ограничено. В настоящем документе термин "аминокислота" относится к природным и/или неприродным или синтетическим аминокислотам, включая глицин и оба оптических изомера - D и L, аналогам аминокислот и пептидомиметикам.

В настоящем документе непрерывная аминокислотная последовательность относится к последовательности, содержащей по меньшей мере две аминокислоты.

Однако следует отметить, что непрерывная аминокислотная последовательность первой части и второй части не ограничивает аминокислотную последовательность тем, что первая часть непосредственно конъюгирована со второй частью. Также возможно, что первая часть соединена со второй частью посредством третьей части, например, связи, образуя, таким образом, одну непрерывную последовательность аминокислот.

В настоящем документе термины "конъюгат", "конъюгированный", "конъюгирование" и "конъюгация" относятся к образованию связи между молекулами и, в частности, между двумя аминокислотными последовательностями и/или двумя полипептидами. Конъюгация может быть прямой (т.е. посредством связи) или косвенной (т.е. через дополнительную молекулу). Конъюгация может быть ковалентной или нековалентной.

В настоящем документе непрерывная аминокислотная последовательность может содержать два или более полипептидов, конъюгированных друг с другом прямо или косвенно (например, через линкер).

В настоящем документе термин "рекомбинантная система экспрессии" относится к генетическому конструкту или конструктам для экспрессии определенного генетического материала, образованного в результате рекомбинации.

"Носитель для доставки гена" определяют как любую молекулу, способную переносить встроенные полинуклеотиды в клетку-хозяина. Примерами носителей для доставки генов являются липосомы, мицеллы, биосовместимые полимеры, включая природные полимеры и синтетические полимеры; липопротеины; липидные наночастицы; полипептиды; полисахариды; липополисахариды; искусственные оболочки вирусов; металлические частицы; и бактерии или вирусы, например, вирус бешенства, флавивирус, лентивирус, бакуловирус, аденовирус и ретровирус, бактериофаг, космида, плаزمид, грибковые векторы и другие рекомбинационные носители, обычно используемые в данной области техники, описанные для экспрессии у различных эукариотических и прокариотических хозяев, которые можно использовать для генной терапии, а также для простой экспрессии белка.

Полинуклеотид, описанный в настоящем документе, можно доставить в клетку или ткань с использованием носителя для доставки генов. "Доставка генов", "перенос генов", "доставка на основе мРНК", "трансдукция" и т.п. в настоящем документе представляют собой термины, относящиеся к введению экзогенного полинуклеотида (иногда называемого "трансгеном") в клетку-хозяина, независимо от способа, используемого для введения. Такие способы включают в себя множество хорошо известных способов, например, вектор-опосредованный перенос гена (посредством, например, вирусной инфекции/трансфекции или различных других комплексов для доставки генов на основе белков или липидов, включая, например, протаминные комплексы, липидные наночастицы, полимерные наночастицы, липидно-полимерные гибридные наночастицы и неорганические наночастицы или их комбинации), а также способы, способствующие доставке "несвязанных" полинуклеотидов (например, электропорацию, доставку с помощью "генной пушки" и различные другие методики, используемые для введения полинуклеотидов). Введенный полинуклеотид может быть немодифицированным или может содержать одну или более модификаций; например, модифицированная мРНК может содержать ARCA-кэпирование; ферментативное полиаденилирование для добавления хвоста из 100-250 остатков аденозина (SEQ ID NO: 22); и замену одного или обоих из цитидина на 5-метилцитидин и/или уридина на псевдоуридин. Введенный полинуклеотид может стабильно или временно поддерживаться в клетке-хозяине. Стабильное поддержание обычно требует, чтобы введенный полинуклеотид либо содержал сайт инициации репликации, совместимый с клеткой-хозяином, либо встраивался в репликон клетки-хозяина, например, во внехромосомный репликон (например, плазмиду) или ядерную или митохондриальную хромосому. Известно, что ряд векторов способен опосредовать перенос генов в клетки млекопитающих, как известно в данной области техники и описано в настоящем документе.

"Плаزمида" представляет собой внехромосомную молекулу ДНК, отделенную от хромосомной ДНК и способную реплицироваться независимо от хромосомной ДНК. Во многих случаях она является циклической и двуцепочечной. Плазмиды обеспечивают механизм горизонтального переноса генов в популяции микроорганизмов и, как правило, обеспечивают преимущество при отборе в данном состоянии окружающей среды. Плазмиды могут нести гены, обеспечивающие устойчивость к природным антибиотикам в конкурентной экологической нише, или, в качестве альтернативы, полученные белки могут действовать в качестве токсинов при аналогичных обстоятельствах.

"Плазмиды", используемые в генной инженерии, называются "плазмидными векторами". Многие плазмиды доступны для приобретения для таких вариантов применения. Реплицируемый ген вставляют в копии плазмиды, содержащей гены, которые делают клетки устойчивыми к определенным антибиотикам, и множественный сайт клонирования (MCS или полилинкер), который представляет собой короткую область, содержащую несколько обычно используемых сайтов рестрикции, позволяющих легко вставлять фрагменты ДНК в этом месте. Другой основной вариант применения плазмид - производство большого количества белков. В этом случае исследователи выращивают бактерии, содержащие плазмиду, несущую интересующий ген. Аналогично тому, как бактерия продуцирует белки для придания себе устойчивости к антибиотикам, в ней можно индуцировать продукцию большого количества белка со встроенного гена.

"Дрожжевая искусственная хромосома" или "YAC" относится к вектору, используемому для клонирования больших фрагментов ДНК (более 100 т.п.о. и до 3000 т.п.о.). Она представляет собой искусственно сконструированную хромосому и содержит теломерные, центромерные последовательности и последовательности сайта инициации репликации, необходимые для репликации и сохранения в дрожжевых клетках. Построенные с использованием исходной циклической плазмиды, они линеаризируются с помощью ферментов рестрикции, а затем ДНК-лигаза может добавлять последовательность или ген, представляющий интерес, в пределах линейной молекулы за счет липких концов. Дрожжевые экспрессирующие векторы, например, YAC, YIps (дрожжевая встраиваемая плаزمида) и YEps (дрожжевая эпизомальная плазмида), чрезвычайно полезны, поскольку с их помощью можно получать эукариотические белковые продукты с посттрансляционными модификациями, так как дрожжи сами по себе являются эукариотическими клетками, однако обнаружено, что YAC более нестабильны, чем YAC, и вызывают химерные эффекты. В настоящем документе термин "вирусный капсид" или "капсид" относится к белковой оболочке или покрытию вирусной частицы. Функция капсида - заключение вирусного генома в капсид, его защита, транспортировка и высвобождение в клетку-хозяина. Капсиды, как правило, состоят из олигомерных структурных субъединиц белка ("капсидных белков"). В настоящем документе термин "инкапсидированный" означает заключенный в капсид вируса.

В настоящем документе термин "помощник" в отношении вируса или плазмиды относится к вирусу или плазмиде, используемой для обеспечения дополнительных компонентов, необходимых для репликации и упаковки вирусной частицы или рекомбинантной вирусной частицы, например, модифицированного AAV, описанного в настоящем документе. Компоненты, кодируемые вирусом-помощником, могут включать любые гены, необходимые для сборки вириона, заключения в капсид, репликации генома и/или упаковки. Например, вирус-помощник может кодировать ферменты, необходимые для репликации вирусного генома. Неограничивающие примеры вирусов и плазмид-помощников, подходящих для применения с AAV-конструктами, включают rHELP (плазмиду), аденовирус (вирус) или герпесвирус (вирус).

В настоящем документе биологический образец или образец может быть получен из субъекта, линии клеток или культивированной клетки или ткани. Типичные образцы включают образец клетки, образец ткани, жидкие образцы, например, кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, включая офтальмологические жидкости (водную и стекловидную клетчатку), но не ограничиваясь ими, периферическую кровь, сыворотку, плазму, асцитную жидкость, мочу, спинномозговую жидкость (СМЖ), мокроту, слюну, костный мозг, синовиальную жидкость, водянистую влагу, амниотическую жидкость, ушную серу, грудное молоко, бронхоальвеолярную промывную жидкость, сперму, секрет предстательной железы, куперову жидкость или предэякуляторную жидкость, женский эякулят, пот, слезы, кистозную жидкость, плевральную и перитонеальную жидкость, перикардальную жидкость, асцитную жидкость, лимфу, хилус, хилус, желчь, интерстициальную жидкость, менструальные выделения, гной, кожное сало, рвотные массы, вагинальные выделения/промывную жидкость, синовиальную жидкость, секрет слизистой, жидкий кал, сок поджелудочной железы, промывные жидкости из полостей пазух, бронхолегочные аспираты, жидкость из полости дробления или пуповинную кровь, но не ограничиваются ими. В настоящем документе термин "обнаружимый маркер" относится по меньшей мере к одному маркеру, способному прямо или косвенно продуцировать обнаружимый сигнал. Неполный список этих маркеров включает ферменты, продуцирующие сигнал, обнаружимый, например, с помощью колориметрии, флуоресценции, люминесценции, например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, хромофоры, например, флуоресцентные, люминесцентные красители, группы с высокой электронной плотностью, обнаружимые с помощью электронной микроскопии или по их электрическим свойствам, например, посредством кондуктометрии, амперометрии, вольтамперометрии, импедансометрии, обнаружимые группы, например, обладающие достаточным размером для осуществления обнаружимой модификации их физических и/или химических свойств, такое обнаружение можно выполнять с помощью оптических способов, например, дифрактометрии, поверхностного плазмонного резонанса, по изменению поверхности, изменению контактного угла, или физических способов, например, атомно-силовой спектроскопии, с использованием туннельного эффекта, или радиоактивные молекулы, например,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  или  $^{125}\text{I}$ .

В настоящем документе термин "маркер очистки" относится по меньшей мере к одному маркеру, пригодному для очистки или выявления. Неполный список таких маркеров включает His, lacZ, GST, белок, связывающий мальтозу, NusA, BCCP, с-мус, CaM, FLAG, GFP, YFP, cherry, тиоредоксин, поли(NANP), V5, Snap, HA, белок, связывающий хитин, Softag 1, Softag 3, Strep или S-белок. Подходящий прямой или косвенный флуоресцентный маркер включает FLAG, GFP, YFP, RFP, dTomato, Cherry, Cy3, Cy 5, Cy 5.5, Cy 7, DNP, AMCA, биотин, дигоксигенин, Tamra, Texas Red, родамин, флуорофоры Alexa, FITC, TRITC или любой другой флуоресцентный краситель или гаптен.

В настоящем документе эпитопный маркер представляет собой биологическую структуру или последовательность, например, белок или углевод, действующую как антиген, распознаваемый антителом. В некоторых вариантах реализации эпитопный маркер используют взаимозаменяемо с маркером очистки и/или аффинным маркером. Термин "композиция" предназначен для обозначения комбинации двух или более соединений, например, комбинации активного полипептида, полинуклеотида, вирусного вектора или антитела и другого соединения или композиции, инертного (например, обнаружимой метки) или активного (например, носителя для доставки генов).

Подразумевается, что "фармацевтическая композиция" включает комбинацию активного полипептида, полинуклеотида или антитела с носителем, инертным или активным, например, твердой подложкой, что делает композицию пригодной для диагностического или терапевтического применения *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" охватывает любые из стандартных фармацевтических носителей, например, физиологический раствор с фосфатным буфером, воду и эмульсии, например, эмульсия масло/вода или вода/масло, и различные типы смачивающих агентов. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см. в работе Martin (1975) Remington's Pharm. Sci., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton).

В настоящем документе термины "субъект", "индивид" или "пациент" используются взаимозаменяемо и относятся к позвоночному, предпочтительно к млекопитающему, более предпочтительно к человеку. Млекопитающие включают приматов, не являющихся человеком, мышей, крыс, кроликов, обезьян, крупный рогатый скот, овец, свиней, собак, кошек, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, лошадей и приматов, в частности, человека, но не ограничиваются ими. Помимо того, что настоящее изобретение применимо для лечения человека, оно также применимо для ветеринарного лечения комнатных млекопитающих, экзотических животных и одомашненных животных, включая млекопитающих, грызунов и тому подобное. В одном варианте реализации млекопитающие включают лошадей, собак и кошек. В еще одном варианте реализации настоящего изобретения человек представляет собой подростка или младенца в возрасте до восемнадцати лет.

"Обработка" или "лечение" заболевания включает: (1) предотвращение заболевания, т.е. действие, результатом которого является отсутствие развития клинических симптомов заболевания у пациента, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не испытывает или не демонстрирует сим-

птомов заболевания; (2) подавление заболевания, т.е. остановку или ослабление развития заболевания или его клинических симптомов; или (3) облегчение заболевания, т.е. вызывание регрессии заболевания или его клинических симптомов. В одном аспекте термин "лечение" исключает предотвращение или профилактику.

Термин "страдающий" в той мере, в какой он относится к термину "лечение", относится к пациенту или индивиду, у которого диагностировано заболевание или который предрасположен к нему.

"Эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для достижения полезных или желательных результатов. Эффективное количество можно вводить в один или более приемов, применений или дозировок. Такая доставка зависит от ряда факторов, включая период времени, в течение которого следует использовать отдельную лекарственную форму, биодоступность терапевтического агента, путь введения и т.д. Однако следует понимать, что конкретные уровни доз терапевтических агентов согласно настоящему изобретению для любого конкретного субъекта зависят от множества факторов, включая активность конкретного применяемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион субъекта, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств, тяжесть конкретного расстройства, подлежащего лечению, и форму введения. Лечебные дозировки, как правило, можно титровать для оптимизации безопасности и эффективности. В одном аспекте эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество. Как правило, зависимость "доза-эффект" из тестов *in vitro* и/или *in vivo* изначально может обеспечить руководство по надлежащим дозам для введения пациенту. Как правило, желательно ввести количество соединения, которое является эффективным для достижения уровня в сыворотке, соизмеримого с концентрациями, которые, как было обнаружено, являются эффективными *in vitro*. Определение этих параметров хорошо известно специалистам в данной области техники. Эти соображения, а также эффективные составы и процедуры введения хорошо известны в данной области техники и описаны в стандартных учебниках. В соответствии с этим определением, в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для ингибирования репликации РНК вируса *ex vivo*, *in vitro* или *in vivo*.

Термин "введение" включает, без ограничения, введение перорально, парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, посредством внутривенной инъекции или вливания, подкожной инъекции или имплантата), путем ингаляции назального аэрозоля, вагинально, ректально, сублингвально, уретрально (например, в виде уретрального суппозитория) или местным путем (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.); составы для введения можно получить отдельно или совместно в подходящих составах для лекарственных форм, содержащих обычные нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, вспомогательные вещества и носители, подходящие для каждого пути введения. Настоящее изобретение не ограничено путем введения, составом или схемой приема.

В настоящем документе термин "AAV" представляет собой стандартное сокращение для аденоассоциированного вируса. Аденоассоциированный вирус представляет собой одноцепочечный ДНК-парвовирус, который растет только в клетках, в которых определенные функции обеспечивает совместная инфекция вируса-помощника. В настоящее время существует тринадцать охарактеризованных серотипов AAV. Общую информацию и обзоры об AAV можно найти, например, в источниках Carter, Handbook of Parvoviruses 1: 169-228, 1989, и Berns, Virology 1743-1764, 1999. Тем не менее, ожидается, что эти же принципы будут применимы к дополнительным серотипам AAV, поскольку хорошо известно, что различные серотипы являются довольно близкородственными как на структурном, так и на функциональном и даже на генетическом уровне. (См., например, Blacklowe, Parvoviruses and Human Disease 165-174, 1988, J. R. Pattison, ed.; и Rose, Comprehensive Virology 3:1-61, 1974). Например, все серотипы AAV, по-видимому, демонстрируют очень сходные свойства в отношении репликации, опосредованные гомологичными генами *g*; и все они несут три родственных капсидных белка, например, белки, экспрессирующиеся в AAV2. Степень родства дополнительно подтверждается гетеродуплексным анализом, который выявляет обширную перекрестную гибридизацию между серотипами на всем протяжении генома; и наличием аналогичных самоотжигающихся сегментов на концах, соответствующих "последовательностям инвертированных концевых повторов" (ИТР). Аналогичный характер инфекционной способности также позволяет предположить, что функции репликации у каждого серотипа находятся под аналогичным регуляторным контролем. В настоящем документе термин "экспрессирующая AAV-кассета" обозначает нуклеотидную последовательность, содержащую один или более представляющих интерес полинуклеотидов (или трансгенов), фланкированные последовательностями концевых повторов AAV (ИКП). Такую экспрессирующую AAV-кассету можно реплицировать и упаковать в инфекционные вирусные частицы (например, AAV-векторы), когда она присутствует в клетке-хозяине, трансфицированной вектором, кодирующим и экспрессирующим продукты генов *g* и *cap*.

"Вирион AAV", или "AAV-вектор", или "вирусная частица AAV", или "частица AAV-вектора" относится к вирусной частице, состоящей по меньшей мере из одного капсидного белка AAV и включенной в капсид полинуклеотидной экспрессирующей AAV-касеты. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т.е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, например, трансген, подлежащий доставке в клетку млекопитающего), ее обычно называют "частицей AAV-вектора" или

просто "AAV-вектором". Таким образом, получение частицы AAV-вектора обязательно включает получение экспрессирующей AAV-кассеты, поскольку такая плаزمиды содержится в частице AAV-вектора. Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой дефектный по репликации парвовирус, длина одноцепочечного ДНК-генома которого составляет приблизительно 4,7 т.п.о., включая 145-нуклеотидный инвертированный концевой повтор (ИКП). Существует несколько серотипов AAV. Известны нуклеотидные последовательности геномов серотипов AAV. Например, нуклеотидная последовательность генома AAV 2 серотипа (AAV2) представлена в статье Srivastava et al., *J Virol*, 45: 555-564 (1983), с поправками Ruffing et al., *J Gen Virol*, 75: 3385-3392 (1994). В качестве других примеров, полный геном AAV-1 представлен в GenBank под номером доступа NC\_002077; полный геном AAV-3 представлен в GenBank под номером доступа NC\_1829; полный геном AAV-4 представлен в GenBank под номером доступа NC\_001829; геном AAV-5 представлен в GenBank под номером доступа AF085716; полный геном AAV-6 представлен в GenBank под номером доступа NC\_001862; по меньшей мере фрагменты геномов AAV-7 и AAV-8 представлены в GenBank под номерами доступа AX753246 и AX753249, соответственно (см. также патенты США № 7282199 и 7790449, относящиеся к AAV-8); геном AAV-9 представлен в статье Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); геном AAV-10 представлен в источнике *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); и геном AAV-11 представлен в источнике *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). Клонирование серотипа AAVrh.74 описано в Rodino-Klapac., et al. *Journal of translational medicine* 5, 45 (2007). Цис-действующие последовательности, направляющие репликацию вирусной ДНК (rep), включение в капсид/упаковку и встраивание в хромосому клетки-хозяина, содержатся в ИКП. Три промотора AAV (под названиями p5, p19 и p40 по их относительному положению на карте) управляют экспрессией двух внутренних открытых рамок считывания AAV, кодирующих гены *rep* и *cap*. Два промотора *rep* (p5 и p19) в сочетании с дифференциальным сплайсингом единственного интрона AAV (например, по нуклеотидам 2107 и 2227 AAV2) приводят к продукции четырех белков *rep* (*rep* 78, *rep* 68, *rep* 52 и *rep* 40) с гена *rep*. Белки *rep* обладают множественными ферментативными свойствами, которые в конечном итоге отвечают за репликацию вирусного генома. Ген *cap* экспрессируется с промотора p40 и кодирует три капсидных белка VP1, VP2 и VP3. Альтернативный сплайсинг и неконсенсусные сайты начала трансляции отвечают за продукцию трех родственных капсидных белков. Единственный консенсусный сайт полиаденилирования расположен в положении 95 карты генома AAV. Жизненный цикл и генетика AAV рассмотрены в обзоре Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992). Рекомбинантные геномы AAV согласно изобретению содержат молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению и один или более ИКП AAV, фланкирующих указанную молекулу нуклеиновой кислоты. ДНК AAV в геномах гAAV может относиться к любому серотипу AAV, для которого можно получить рекомбинантный вирус, включая серотипы AAVrh.74, AAVrh.10, AAVrh.20, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13, но не ограничиваясь ими. Получение псевдотипированного гAAV описано, например, в WO 01/83692. Также рассматриваются другие типы вариантов гAAV, например, гAAV с мутациями капсида. См., например, Margis et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Как отмечено в разделе "Уровень техники" выше, нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны в данной области техники. В некоторых вариантах реализации для стимуляции специфичной экспрессии в скелетных мышцах применяют AAV1, AAV6, AAV8 или AAVrh.74.

В описании и формуле изобретения форма единственного числа включает ссылки на множественное число, если иное не следует из контекста явным образом. Например, термин "клетка" включает множество клеток, включая их смеси. В настоящем документе термин "содержащий" или "содержит" подразумевает, что композиции и способы включают перечисленные элементы, но не исключают другие. Фраза "состоит по существу из" в контексте определения композиций и способов означает исключение других элементов, имеющих существенное значение для комбинации для указанной цели. Таким образом, композиция, состоящая по существу из элементов, заданных в настоящем документе, не исключает следовых загрязнений, возникших за счет способа выделения и очистки, и фармацевтически приемлемых носителей, например, физиологического раствора с фосфатным буфером, консервантов и т.п. "Состоит из" означает исключение более чем следовых количеств других ингредиентов и существенных стадий способа для введения композиций согласно настоящему изобретению или этапов процесса получения композиции или достижения предполагаемого результата. Варианты реализации, определенные каждым из этих переходных терминов, входят в рамки настоящего изобретения.

В настоящем изобретении термин "выделенный" по отношению к нуклеиновым кислотам, например, ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других молекул ДНК или РНК, соответственно, присутствующих в природном источнике указанной макромолекулы. Подразумевается, что термин "выделенная нуклеиновая кислота" включает фрагменты нуклеиновых кислот, которые не встречаются в природе в виде фрагментов. Термин "выделенный" также применяют в настоящем документе по отношению к полипептидам, белкам и/или клеткам-хозяевам, отделенным от других клеточных белков; подразумевается, что он охватывает как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды. В других вариантах реализации термин "выделенный" означает отделенный от составляющих, клеточных и иных, с которыми клетка, ткань, полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагмент(ы) обыч-

но ассоциированы в природе. Например, выделенная клетка представляет собой клетку, которая отделена от ткани или клеток другого фенотипа или генотипа. Как очевидно для специалистов в данной области техники, неприродный полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагмент(ы) не требуют "выделения" для их различения от аналога, встречающегося в природе. Термин "рекомбинантный" в настоящем документе по отношению к полипептидам или полинуклеотидам, например, ДНК или РНК, относится к молекулам, образованным с помощью лабораторных методик рекомбинации, например, молекулярного клонирования. Методики молекулярного клонирования известны в данной области техники и могут включать ПЦР-амплификацию полинуклеотида, ферментативное расщепление полинуклеотида, лигирование полинуклеотида в экспрессирующую кассету (например, экспрессирующую кассету млекопитающего), трансформацию, трансфекцию или трансдукцию клетки полинуклеотидом и экспрессию полинуклеотида с получением полипептида, но не ограничиваются ими. См., например, Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2012. Подразумевается, что термин "рекомбинантный полинуклеотид" включает фрагменты полинуклеотидов, кодирующих белок. Например, рекомбинантный полинуклеотид может содержать фрагмент полинуклеотида, кодирующего белок дисферлина человека. Рекомбинантный полинуклеотид можно получить путем ПЦР-амплификации фрагмента полинуклеотида, кодирующего белок. Рекомбинантный полипептид можно получить путем экспрессии одного или более рекомбинантных полинуклеотидов.

В настоящем документе описаны полинуклеотиды, кодирующие фрагменты белка дисферлина человека (hDSYSF). Кроме того, в настоящем документе описаны плазмиды, вирусные векторы, векторные системы, системы упаковки вируса, клетки и композиции, содержащие полинуклеотиды, кодирующие фрагменты белка дисферлина человека (hDSYSF). Кроме того, в настоящем документе описаны способы получения и применения таких полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, векторных систем, систем упаковки вируса, клеток и композиций.

В настоящем документе описан рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный рекомбинантный полинуклеотид содержит первую нуклеотидную последовательность, причем указанная первая нуклеотидная последовательность состоит из: (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (b) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении SEQ ID NO: 1, 6 или 18; (c) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (d) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 13 или 15; (e) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок hDYSF, причем указанный белок hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (f) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности (e) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (e).

В настоящем документе дополнительно описана последовательность рекомбинантного полинуклеотида, кодирующая фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный рекомбинантный полинуклеотид содержит первую нуклеотидную последовательность, причем указанная первая нуклеотидная последовательность состоит из: (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (b) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19; (c) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (d) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16; (e) полинуклеотидной последовательности, кодирующей белок hDYSF, причем указанный белок hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (f) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной полинуклеотидной последовательности (e) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (e). Кроме того, в настоящем документе описаны векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) содержит: (a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 1 или 6; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15; (v) нуклеотидной последовательности, коди-

рующей белок hDYSF, причем указанный белок hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) второй ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП.

В некоторых вариантах реализации вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) содержит: (а) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный полинуклеотид состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 2 или 8; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 14 или 16; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок hDYSF, причем указанный белок hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (с) второй ИКП, причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП. Кроме того, в настоящем документе описаны экспрессирующие кассеты на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит: (а) первый инвертированный концевой повтор (ИКП), причем указанный первый ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе; (b) любой из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (с) второй ИКП, причем указанный второй ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе, причем полинуклеотид 5'-hYDSYF согласно (b) фланкирован первым и вторым ИКП согласно (а) и (с). В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит: (а) первый инвертированный концевой повтор (ИКП), причем указанный первый ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе; (b) любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (с) второй ИКП, причем указанный второй ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе, причем полинуклеотид 3'-hYDSYF согласно (b) фланкирован первым и вторым ИКП согласно (а) и (с).

Кроме того, в настоящем документе описаны векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации AAV-вектор содержит: (а) первый инвертированный концевой повтор (ИКП), причем указанный первый ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе; (b) любой из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (с) второй ИКП, причем указанный второй ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе, причем указанный полинуклеотид 5'-hYDSYF согласно (b) фланкирован первым и вторым ИКП согласно (а) и (с).

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор содержит: (а) первый инвертированный концевой повтор (ИКП), причем указанный первый ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе; (b) любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (с) второй ИКП, причем указанный второй ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе, причем указанный полинуклеотид 3'-hYDSYF согласно (b) фланкирован первым и вторым ИКП согласно (а) и (с).

Кроме того, в настоящем документе описаны системы двойного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации система двойного AAV-вектора содержит: (а) первый AAV-вектор, причем указанный первый AAV-вектор содержит любой из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) второй AAV-вектор, причем указанный второй AAV-вектор содержит любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе описаны системы двойного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации система двойного AAV-вектора содержит, состоит или по существу состоит из: (а) первого AAV-вектора, причем указанный первый AAV-вектор содержит, состоит или по существу состоит из любого из AAV-векторов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) второго AAV-вектора, причем указанный второй AAV-вектор содержит, состоит или по существу состоит из любого из AAV-векторов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе.

Кроме того, в настоящем документе описаны векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации AAV-векторы содержат любой из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации AAV-векторы содержат любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации указанные полинуклеотиды, плазмиды, вирусные векторы (на-

пример, вирусы или вирусные частицы), векторные системы, системы упаковки вируса, клетки и композиции дополнительно содержат одну или более нуклеотидных последовательностей, содержащих, состоящих или по существу состоящих из обращенного концевой повтора (ИКП), промотора, интрона, маркера селекции или сайта инициации репликации (ORI).

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, плазмиды, вирусные векторы, векторные системы, системы упаковки вируса, клетки и композиции дополнительно содержат одну или более дополнительных нуклеотидных последовательностей, содержащих обращенный концевой повтор (ИКП), маркер селекции, сайт инициации репликации (ORI), нетранслируемую область (UTR) или сигнал полиаденилирования (polyA).

Кроме того, в настоящем документе описаны способы лечения дисферлинопатии. В некоторых вариантах реализации способ лечения дисферлинопатии включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, векторных систем, систем упаковки вируса, клеток и композиций, описанных в настоящем документе.

Кроме того, в настоящем документе описано применение любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, векторных систем, систем упаковки вируса, клеток и композиций, описанных в настоящем документе, для производства лекарственного средства для лечения дисферлинопатии.

#### Гомологичная рекомбинация и фрагменты hDYSF

AAV-опосредованная генная терапия представляет желательную стратегию лечения многих заболеваний; однако она затруднена за счет ограничивающего предельного размера упаковки вириона AAV, составляющего 4,7 т.п.о. Особый интерес представляют заболевания, которые в настоящее время не лечатся или для которых отсутствует эффективная терапия, например, дисферлинопатии. В настоящем документе описан способ получения или продукции полноразмерного гена дисферлина за счет гомологичной рекомбинации двух частично упакованных геномов. В одном примере два частично упакованных генома показаны на фиг. 1 как rAAV.MHCK7.DYSF5'.PTG и rAAV.DYSF3'.POLYA. После доставки двух геномов посредством вирусной доставки за счет упаковки в AAV-вектор или невирусными способами (например, LNP) в клетку (например, миоциты) они генерируют транскрипт, содержащий полноразмерную кодирующую область дисферлина, что приводит к экспрессии функционального белка дисферлина. Область перекрытия между двумя полинуклеотидами облегчает гомологичную рекомбинацию, которая приводит к получению транскрипта, содержащего полноразмерный ген дисферлина. Разделяя полноразмерный ген дисферлина на два частично упакованных генома, этот способ успешно обходит ограничение упаковки AAV и позволяет получить функциональный полноразмерный ген дисферлина. В одном варианте реализации транскрипт представляет собой экспрессирующую кассету, содержащую последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20. В другом варианте реализации транскрипт представляет собой экспрессирующую кассету, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах реализации в настоящем документе описан рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий белок дисферлина человека (hDYSF), причем последовательность указанного рекомбинантного полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20. В некоторых случаях рекомбинантный полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых случаях в настоящем документе описан способ получения рекомбинантного полипептида. В некоторых случаях указанный способ включает приведение клетки в контакт с рекомбинантным полинуклеотидом, кодирующим 5'-фрагмент белка hDYSF, и вторым рекомбинантным полинуклеотидом, кодирующим 3'-фрагмент белка hDYSF. В некоторых случаях указанный способ включает приведение клетки в контакт с системой двойного AAV-вектора, описанной в настоящем документе. В некоторых случаях клетка представляет собой эукариотическую клетку, необязательно мышечную клетку, клетку сердца и/или клетку печени. В некоторых случаях указанный способ включает введение субъекту рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего 5'-фрагмент белка hDYSF, и второго рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего 3'-фрагмент белка hDYSF. В некоторых случаях указанный способ включает введение субъекту системы двойного AAV-вектора, описанной в настоящем документе. В некоторых случаях указанный способ включает лечение мышечной дистрофии у субъекта путем экспрессии рекомбинантного полинуклеотида, содержащего SEQ ID NO: 20, или нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20. В некоторых случаях субъект страдает от дисферлинопатии, необязательно выбранной из LGMD2B или миопатии Миоши.

В настоящем документе также описаны два рекомбинантных полинуклеотида, каждый из которых кодирует фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), что может привести к продукции полноразмерного гена дисферлина путем гомологичной рекомбинации, как описано выше. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид кодирует 5'-фрагмент белка hDYSF. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий 5'-фрагмент белка hDYSF, называют полинуклеотидом 5'-hDYSF. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид кодирует 3'-





















нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид 3'-hDYSF содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид 3'-hDYSF дополнительно не содержит вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй фрагмент белка hDYSF.

В некоторых вариантах реализации последовательности полинуклеотида 5'-hDSYF и полинуклеотида 3'-hDYSF перекрываются по меньшей мере на 500, 600, 700, 800, 900, 950, 960 или 963 нуклеотида. В некоторых вариантах реализации последовательности N-концевого белка hDSYF и C-концевого белка hDSYF перекрываются по меньшей мере на 50, 100, 150, 200, 250, 300 или 320 аминокислот. Инвертированные концевые повторы

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, плазмиды, вирусные векторы, векторные системы, системы упаковки вируса, клетки и композиции дополнительно содержат нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую из или состоящую по существу из одного или более инвертированных концевых повторов (ИКП). В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, плазмиды, вирусные векторы, векторные системы, системы упаковки вируса, клетки и композиции дополнительно содержат две, три, четыре, пять или шесть или более нуклеотидных последовательностей, содержащих, состоящих или состоящих по существу из двух, трех, четырех, пяти или шести или более ИКП. В некоторых вариантах реализации два или более ИКП являются одинаковыми. В некоторых вариантах реализации два или более ИКП являются различными.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид фланкирован двумя или более ИКП. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид 5'-hDSYF фланкирован первой парой ИКП. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид 3'-hDYSF фланкирован второй парой ИКП. В некоторых вариантах реализации ИКП в первой паре ИКП являются одинаковыми. В некоторых вариантах реализации ИКП в первой паре ИКП отличаются. В некоторых вариантах реализации ИКП во второй паре ИКП являются одинаковыми. В некоторых вариантах реализации ИКП во второй паре ИКП отличаются. В некоторых вариантах реализации ИКП в первой паре ИКП совпадают с ИКП во второй паре ИКП. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один ИКП в первой паре ИКП совпадает с по меньшей мере одним ИКП во второй паре ИКП. В некоторых вариантах реализации ИКП в первой паре ИКП отличаются от ИКП во второй паре ИКП. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один ИКП в первой паре ИКП отличается от по меньшей мере одного ИКП во второй паре ИКП.

В некоторых вариантах реализации ИКП представляет собой вирусный ИКП. В некоторых вариантах реализации указанный ИКП представляет собой ИКП AAV. В некоторых вариантах реализации ИКП AAV выбран из ИКП по меньшей мере одного из серотипов AAV AAVrh.20, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAVrh.74, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAVrh.10, AAV-11, AAV-12 и AAV-13. В некоторых вариантах реализации ИКП AAV представляет собой ИКП AAV2. В некоторых вариантах реализации ИКП AAV представляет собой ИКП AAV5. Последовательности ИКП для AAV1-6 можно найти, например, в источнике Grimm et al., J. Virol. 80(1): 426-39, 2006, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид не содержит последовательность AAV, отличную от инвертированного концевого повтора (ИКП).

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный полинуклеотид не содержит вирусную последовательность, отличную от инвертированного концевого повтора (ИКП).

В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 на всем протяжении SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 на всем протяжении SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3 на всем протяжении SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность, содержащую 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 или менее несовпадающих нуклеотидов по сравнению с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации ИКП содержит нуклеотидную последовательность, содержащую 5 или менее несовпадающих нуклеотидов по сравнению с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3.

#### Промоторы

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, плазмиды, вирусные векторы, векторные системы, системы упаковки вируса, клетки и композиции дополнительно содержат нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую из или состоящую по существу из одного или более промоторов. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения промотор представляет собой эукариотический промотор. Примеры эукариотических промоторов включают промотор цитомегаловируса (ЦМВ),

промотор 1 альфа-фактора элонгации (EF1a), промотор CAG, промотор гена фосфоглицераткиназы (PGK), промотор элемента реакции на тетрациклин (TRE), промотор ядерного U6 человека (U6) и промотор UAS, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой промотор млекопитающего. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой индуцибельный промотор.

В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой тканеспецифичный промотор. Примеры тканей включают мышечную, эпителиальную, соединительную и нервную ткани, но не ограничиваются ими. Примеры тканеспецифичных промоторов включают промотор B29, промотор CD14, промотор CD43, промотор CD45, промотор CD68, промотор десмина, промотор эластазы-1, промотор эндоглина, промотор фибронектина, промотор Flt-1, промотор GFAP, промотор ICAM-2, промотор INF- $\beta$ , промотор Mb, промотор NphsI, промотор OG-2, промотор SP-B, промотор SYN1, промотор WASP, промотор SV40/bAlb, промотор SV40/hAlb, промотор SV40/CD43, промотор SV40/CD45 и промотор NSE/RU5', но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой мышечно-специфичный промотор. В некоторых вариантах реализации мышечно-специфичный промотор представляет собой энхансер/промотор гибрида комплекса тяжелой цепи миозина и последовательности E-box креатинкиназы мышц.

В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой рекомбинантный промотор. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный промотор представляет собой рекомбинантный мышечно-специфичный промотор. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный мышечно-специфичный промотор представляет собой рекомбинантный мышечно-специфичный промотор тяжелой цепи миозина-креатинкиназы. В еще одном варианте реализации мышечно-специфичный промотор содержит элемент гена скелетного актина человека, элемент гена сердечного актина, промотор десмина, промотор скелетного альфа-актина (ASKA), промотор тропонина I (TNNI2), связывающий элемент миоцит-специфичного энхансера фактора связывания *tef*, промотор мышечной креатинкиназы (MCK), укороченный промотор MCK (tMCK), промотор тяжелой цепи миозина (MHC), гибридный энхансер тяжелой цепи  $\alpha$ -миозина/энхансер-промотор MCK (MHCK7), промотор C5-12, элемент энхансера креатинкиназы мышцы, элемент гена скелетного быстро сокращающегося тропонина c, элемент гена медленно сокращающегося сердечного тропонина c, элемент гена медленно сокращающегося тропонина i, ядерный фактор, индуцируемый гипоксией.

В некоторых вариантах реализации промотор содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации промотор содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 4 на всем протяжении SEQ ID NO: 4.

#### Интроны

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, плазмиды, вирусные векторы, векторные системы, системы упаковки вируса, клетки и композиции дополнительно содержат нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую из или состоящую по существу из одного или более интронов. В некоторых вариантах реализации интрон представляет собой эукариотический интрон. В некоторых вариантах реализации интрон представляет собой интрон млекопитающего. В некоторых вариантах реализации интрон представляет собой синтетический интрон. В некоторых вариантах реализации интрон представляет собой химерный интрон. В некоторых вариантах реализации интрон получен из некодирующего экзона. В некоторых вариантах реализации интрон расположен выше или в 5'-направлении относительно 5'-полинуклеотида hDYSF.

В некоторых вариантах реализации интрон содержит по меньшей мере один из 5'-донорного сайта, точки ветвления или 3'-сайта сплайсинга. В некоторых вариантах реализации интрон содержит два или более из 5'-донорного сайта, точки ветвления или 3'-сайта сплайсинга. В некоторых вариантах реализации интрон содержит 5'-донорный сайт, точку ветвления и 3'-сайт сплайсинга.

В некоторых вариантах реализации интрон содержит 5'-донорный сайт из гена  $\beta$ -глобина человека.

В некоторых вариантах реализации интрон содержит точку ветвления тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG).

В некоторых вариантах реализации интрон содержит 3'-акцепторный сайт сплайсинга из тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG).

В некоторых вариантах реализации интрон содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах реализации интрон содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 на всем протяжении SEQ ID NO: 5.

#### Маркер селекции

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, плазмиды, вирусные векторы, векторные системы, системы упаковки вируса, клетки и композиции дополнительно содержат нуклеотидную последо-

вательность, содержащую, состоящую из или состоящую по существу из одного или более маркеров селекции. В некоторых вариантах реализации маркер селекции представляет собой бактериальный селектируемый маркер. В некоторых вариантах реализации маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотикам. Примеры генов устойчивости к антибиотикам включают  $\beta$ -лактамазу, ген устойчивости к канамицину, ген *neo* из Tn5, мутантный ген *FabI* из генома *E.coli* и *URA3* (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу из дрожжей), но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации ген устойчивости к антибиотикам представляет собой ген  $\beta$ -лактамазы. В некоторых вариантах реализации ген устойчивости к антибиотикам представляет собой ген устойчивости к канамицину.

#### Сигнал полиаденилирования

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды, плазмиды, вирусные векторы, векторные системы, системы упаковки вируса, клетки и композиции дополнительно содержат нуклеотидную последовательность, содержащую, состоящую из или состоящую по существу из одного или более сигналов полиаденилирования (*polyA*). В некоторых вариантах реализации *polyA*-сигнал представляет собой искусственный *polyA*-сигнал.

В некоторых вариантах реализации *polyA*-сигнал содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации *polyA*-сигнал содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7 на всем протяжении SEQ ID NO: 7.

#### Экспрессирующие кассеты и системы упаковки

Кроме того, в настоящем документе описаны экспрессирующие кассеты на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит: (a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП), причем указанный первый ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе; (b) любой из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (c) второй ИКП, причем указанный второй ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе, причем полинуклеотид 5'-hYDSYF согласно (b) фланкирован первым и вторым ИКП согласно (a) и (c). В некоторых вариантах реализации экспрессирующую AAV-кассету, содержащую любой из 5'-полинуклеотидов hDYSF, описанных в настоящем документе, называют экспрессирующей AAV-кассетой 5'-HDYSF.

Кроме того, в настоящем документе описаны плазмиды на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит: (a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП), причем указанный первый ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе; (b) любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (c) второй ИКП, причем указанный второй ИКП содержит любой из ИКП, описанных в настоящем документе, причем полинуклеотид 3'-hYDSYF согласно (b) фланкирован первым и вторым ИКП согласно (a) и (c). В некоторых вариантах реализации экспрессирующую AAV-кассету, содержащую любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе, называют экспрессирующей AAV-кассетой 3'-hDYSF.

В некоторых вариантах реализации экспрессирующая кассета на основе аденоассоциированного вируса (AAV) содержит: (a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанная полинуклеотидная последовательность состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 на всем протяжении SEQ ID NO: 1; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13; (iv) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 на всем протяжении SEQ ID NO: 13; (v) нуклеотидной последовательности, кодирующей белок hDYSF, причем указанный белок hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или (vi) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (c) второй ИКП, причем указанная полинуклеотидная последовательность фланкирована первым и вторым ИКП. В некоторых вариантах реализации любая из экспрессирующих AAV-кассет, описанных в настоящем документе, дополнительно содержит одну или более дополнительных полинуклеотидных последовательностей, содержащих промотор, интрон, маркер селекции или сайт инициации репликации (ORI). В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит нуклеотидную последовательность

SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета дополнительно не содержит вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую второй фрагмент белка hDYSF. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета не содержит последовательность AAV, отличную от инвертированного концевой повтора (ИКП). В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета не содержит вирусную последовательность, отличную от инвертированного концевой повтора (ИКП).

В некоторых вариантах реализации экспрессирующие кассеты на основе аденоассоциированного вируса (AAV) содержат: (a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП); (b) полинуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент белка дисферлина человека, причем указанная полинуклеотидная последовательность состоит из: (i) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 на всем протяжении SEQ ID NO: 2; (iii) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14; (ii) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 на всем протяжении SEQ ID NO: 14; (v) полинуклеотидной последовательности, кодирующей белок hDYSF, причем указанный белок hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или (vi) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной полинуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и (c) второй ИКП, причем указанная полинуклеотидная последовательность фланкирована первым ИКП и вторым ИКП. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета дополнительно содержит одну или более полинуклеотидных последовательностей, содержащих маркер селекции, сайт инициации репликации (ORI), нетранслируемую область (UTR) или сигнал полиадектирования (polyA).

Кроме того, в настоящем документе описаны системы упаковки аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах реализации системы упаковки AAV содержат: (a) любую из экспрессирующих AAV-кассет 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; (b) плазмиду-помощник аденовируса; и (c) плазмиду гер-сар. В некоторых вариантах реализации плазмиды-помощник аденовируса содержит один или более генов аденовируса. В некоторых вариантах реализации один или более генов аденовируса опосредуют репликацию AAV. В некоторых вариантах реализации один или более генов аденовируса выбраны из E4, E2a и VA. В некоторых вариантах реализации плазмиды гер-сар содержит один или более полинуклеотидов, кодирующих гены гер и сар аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах реализации ген гер кодирует один или более из белков жизненного цикла, выбранных из Rep78, Rep68, Rep62 и Rep40. В некоторых вариантах реализации указанный ген сар кодирует один или более из капсидных белков, выбранных из VP1, VP2 и VP3. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета 5'-hDYSF содержит один или более ИКП. В некоторых вариантах реализации ИКП представляют собой ИКП AAV. В некоторых вариантах реализации ИКП получен из AAV того же серотипа, что и белок капсида AAV. В некоторых вариантах реализации серотип AAV ИКП отличается от серотипа белка капсида AAV. В некоторых вариантах реализации ген гер AAV получен из AAV того же серотипа, что и белок капсида AAV. В некоторых вариантах реализации серотип гена гер AAV отличается от серотипа белка капсида AAV. В некоторых вариантах реализации система упаковки AAV, содержащая любую из экспрессирующих AAV-кассет 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе, называется системой упаковки AAV 5'-hDYSF.

В некоторых вариантах реализации системы упаковки AAV содержат: (a) любую из экспрессирующих AAV-кассет 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; (b) плазмиду-помощник аденовируса; и (c) плазмиду гер-сар. В некоторых вариантах реализации плазмиды-помощник аденовируса содержит один или более генов аденовируса. В некоторых вариантах реализации один или более генов аденовируса опосредуют репликацию AAV. В некоторых вариантах реализации один или более генов аденовируса выбраны из E4, E2a и VA. В некоторых вариантах реализации плазмиды гер-сар содержит один или более

полинуклеотидов, кодирующих гены гер и сар аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах реализации ген гер кодирует один или более из белков жизненного цикла, выбранных из Rep78, Rep68, Rep62 и Rep40. В некоторых вариантах реализации указанный ген сар кодирует один или более из капсидных белков, выбранных из VP1, VP2 и VP3. В некоторых вариантах реализации экспрессирующая AAV-кассета 3'-hDYSF содержит один или более ИКП. В некоторых вариантах реализации ИКП представляют собой ИКП AAV. В некоторых вариантах реализации ИКП получен из AAV того же серотипа, что и белок капсида AAV. В некоторых вариантах реализации серотип AAV ИКП отличается от серотипа белка капсида AAV. В некоторых вариантах реализации ген гер AAV получен из AAV того же серотипа, что и белок капсида AAV. В некоторых вариантах реализации серотип гена гер AAV отличается от серотипа белка капсида AAV. В некоторых вариантах реализации система упаковки AAV, содержащая любую из экспрессирующих AAV-кассет 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе, называется системой упаковки AAV 3'-hDYSF.

В некоторых вариантах реализации система упаковки аденоассоциированного вируса содержит: (a) любую из экспрессирующих AAV-кассет 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) плазмиду-помощник аденовируса. В некоторых вариантах реализации плазмиду-помощник аденовируса содержит один или более генов аденовируса. В некоторых вариантах реализации один или более генов аденовируса опосредуют репликацию AAV. В некоторых вариантах реализации один или более генов аденовируса выбраны из E4, E2a и VA.

В некоторых вариантах реализации система упаковки аденоассоциированного вируса содержит: (a) любую из экспрессирующих AAV-кассет 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) плазмиду-помощник аденовируса. В некоторых вариантах реализации плазмиду-помощник аденовируса содержит один или более генов аденовируса. В некоторых вариантах реализации один или более генов аденовируса опосредуют репликацию AAV. В некоторых вариантах реализации один или более генов аденовируса выбраны из E4, E2a и VA. Вирусные векторы

Кроме того, в настоящем документе описаны векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (например, вирусы AAV или частицы AAV). В некоторых вариантах реализации AAV-векторы содержат, состоят или по существу состоят из любого из полинуклеотидов 5'-hDSYF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации AAV-вектор, содержащий любой из полинуклеотидов 5'-hDSYF, описанных в настоящем документе, называют AAV-вектором 5'-hDYSF.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор 5'-hDYSF содержит любую из экспрессирующих AAV-кассет 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации AAV-векторы содержат, состоят или по существу состоят из любого из полинуклеотидов 3'-hDSYF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации AAV-вектор, содержащий любой из полинуклеотидов 3'-hDSYF, описанных в настоящем документе, называют AAV-вектором 3'-hDYSF.

В некоторых вариантах реализации AAV-вектор 3'-hDYSF содержит любую из экспрессирующих AAV-кассет 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации AAV-вектор представляет собой AAV серотипа 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, rh.10, rh.20 или rh.74. В некоторых вариантах реализации AAV-вектор представляет собой AAV серотипа rh.74. В некоторых вариантах реализации AAV-вектор не является AAV 5 серотипа.

Кроме того, в настоящем документе описаны системы двойного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащие два или более AAV-векторов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации система двойного AAV-вектора содержит: (a) первый AAV-вектор, причем указанный первый AAV-вектор содержит любой из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) второй AAV-вектор, причем указанный второй AAV-вектор содержит любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации система двойного AAV-вектора содержит, состоит или по существу состоит из: (a) первого AAV-вектора, причем указанный первый AAV-вектор содержит, состоит или по существу состоит из любого из AAV-векторов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) второго AAV-вектора, причем указанный второй AAV-вектор содержит, состоит или по существу состоит из любого из AAV-векторов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе.

#### Композиции

Кроме того, в настоящем документе описаны композиции, содержащие, состоящие из или состоящие по существу из любого из полинуклеотидов 5'-hDSYF, описанных в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе описаны композиции, содержащие, состоящие из или состоящие по существу из любого из полинуклеотидов 3'-hDSYF, описанных в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе описаны композиции, содержащие, состоящие из или состоящие по существу из любой из плазмид 5'-hDSYF, описанных в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе описаны композиции, содержащие, состоящие из или состоящие по существу из любой из систем двойного AAV-вектора, описанных в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе описаны композиции, содержащие, состоящие из или состоящие по существу из любого из AAV-векторов, описанных в настоящем документе.

те.

В настоящем документе дополнительно описана композиция, содержащая, состоящая из или состоящая по существу из: (а) вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), причем указанный rAAV-вектор содержит, состоит или по существу состоит из любого из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя, вспомогательного вещества или адьюванта.

В настоящем документе дополнительно описана композиция, содержащая, состоящая из или состоящая по существу из: (а) вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), причем указанный rAAV содержит, состоит или по существу состоит из любого из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя, вспомогательного вещества или адьюванта.

В настоящем документе дополнительно описана композиция, содержащая, состоящая из или состоящая по существу из: (а) первого рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), причем указанный первый rAAV содержит, состоит или по существу состоит из любого из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) второго рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), причем указанный второй rAAV содержит, состоит или по существу состоит из любого из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В настоящем документе дополнительно описана композиция, содержащая, состоящая из или состоящая по существу из: (а) первой частицы аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанная первая AAV-частица содержит, состоит или по существу состоит из любого из AAV-векторов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) второй частицы аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанная вторая AAV-частица содержит, состоит или по существу состоит из любого из AAV-векторов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации любая из композиций, описанных в настоящем документе, дополнительно содержит по меньшей мере один из фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя, вспомогательного вещества или адьюванта. Приемлемые носители, разбавители и адьюванты нетоксичны для реципиентов и предпочтительно инертны в используемых дозах и концентрациях и включают буферы и поверхностно-активные вещества, например, плуроники. Примеры приемлемых носителей включают физиологический раствор с фосфатным буфером, консерванты и т.п., но не ограничиваются ими.

Фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество могут быть пригодны для инъекционного применения. Примеры фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ, подходящих для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекции непосредственно перед применением. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой в той степени, чтобы ее можно было легко ввести посредством шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, например, бактерий и грибов. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), подходящие смеси указанных компонентов и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, например, лецитина, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ. Действие микроорганизмов можно предотвращать с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические вещества, например, углеводы или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить посредством использования агентов, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций готовят посредством включения полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов или систем двойного вектора, описанных в настоящем документе, в требуемом количестве в соответствующий растворитель с различными другими компонентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтром. Как правило, дисперсии готовят посредством включения стерилизованного действующего вещества в стерильную среду-носитель, содержащую основную дисперсионную среду и другие требуемые компоненты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, которые позволяют получить действующее вещество в виде порошка в комбинации с любым дополнительным желательным компонентом из его раствора, предварительно стерилизованного фильтрацией.

Способы получения AAV-векторов

В настоящем документе описаны способы получения вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (например, вируса или вирусной частицы). Способы получения AAV-векторов известны в

данной области техники. Например, такие способы описаны, например, в WO 01/83692, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Общие принципы получения AAV рассматриваются, например, в статьях Carter, *Current Opinions in Biotechnology* 1533-1539, 1992; и Muzyczka, *Curr. Topics in Microbial. and Immunol.* 158:97-129, 1992, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Различные подходы к получению AAV описаны в Ratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072, 1984; Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466, 1984; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251, 1985; McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963, 1988; and Lebkowski et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:349, 1988; Samulski et al., *J. Virol.*, 63:3822-3828, 1989; патенте США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте США № 5658776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al., *Vaccine* 13:1244-1250, 1995; Paul et al., *Human Gene Therapy* 4:609-615, 1993; Clark et al., *Gene Therapy* 3:1124-1132, 1996; патенте США № 5786211; патенте США № 5871982; и патенте США № 6258595, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации способ получения вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) включает трансдукцию клетки любой из систем упаковки AAV, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой рекомбинантную клетку, стабильно экспрессирующую гены гер и сар аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает культивирование клетки для получения популяции трансдуцированных клеток. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает сбор надосадочной жидкости из популяции трансдуцированных клеток. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает подвергание надосадочной жидкости одной или более стадиям очистки для получения очищенного образца AAV-вектора, причем указанный образец AAV-вектора по существу не содержит остатков клеток и белков. В качестве альтернативы или дополнения, указанный способ дополнительно включает лизирование популяции трансдуцированных клеток с получением клеточного лизата. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает подвергание клеточного лизата одной или более стадиям очистки для получения очищенного образца AAV-вектора, причем указанный образец AAV-вектора по существу не содержит остатков клеток и белков. В некоторых вариантах реализации чистота очищенного образца AAV-вектора составляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

В некоторых вариантах реализации способ получения вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) включает трансдукцию клетки любой из систем упаковки AAV 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой рекомбинантную клетку, стабильно экспрессирующую гены гер и сар аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает культивирование клетки для получения популяции трансдуцированных клеток. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает сбор надосадочной жидкости из популяции трансдуцированных клеток. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает подвергание надосадочной жидкости одной или более стадиям очистки для получения очищенного образца AAV-вектора, причем указанный образец AAV-вектора по существу не содержит остатков клеток и белков. В качестве альтернативы или дополнения, указанный способ дополнительно включает лизирование популяции трансдуцированных клеток с получением клеточного лизата. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает подвергание клеточного лизата одной или более стадиям очистки для получения очищенного образца AAV-вектора, причем указанный образец AAV-вектора по существу не содержит остатков клеток и белков. В некоторых вариантах реализации чистота очищенного образца AAV-вектора составляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

В некоторых вариантах реализации способ получения вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) включает трансдукцию клетки любой из систем упаковки AAV 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой рекомбинантную клетку, стабильно экспрессирующую гены гер и сар аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает культивирование клетки для получения популяции трансдуцированных клеток. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает сбор надосадочной жидкости из популяции трансдуцированных клеток. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает подвергание надосадочной жидкости одной или более стадиям очистки для получения очищенного образца AAV-вектора, причем указанный образец AAV-вектора по существу не содержит остатков клеток и белков. В качестве альтернативы или дополнения, указанный способ до-

полнительно включает лизирование популяции трансдуцированных клеток с получением клеточного лизата. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает подвергание клеточного лизата одной или более стадиям очистки для получения очищенного образца AAV-вектора, причем указанный образец AAV-вектора по существу не содержит остатков клеток и белков. В некоторых вариантах реализации чистота очищенного образца AAV-вектора составляет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

#### Клетки

Кроме того, в настоящем документе описаны клетки, содержащие любой из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе. Клетки могут быть прокариотическими или эукариотическими клетками. Неограничивающие примеры эукариотических клеток включают клетки млекопитающих, например, хомяка, мыши, крысы, собаки, овцы или человека. В некоторых вариантах реализации клетки трансфицируют плазмидой, содержащей любой из полинуклеотидов 5'-hDSYF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения клетки трансдуцируют любой из экспрессирующих AAV-кассет 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации клетки инфицируют любым из AAV-векторов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе описаны клетки, содержащие любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения клетки трансфицируют плазмидой, содержащей любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения клетки трансдуцируют любой из экспрессирующих AAV-кассет 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации клетки инфицируют любым из AAV-векторов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе.

Любые клетки, описанные в настоящем документе, могут представлять собой упаковывающие клетки, продуцирующие инфекционный гAAV. В некоторых вариантах реализации упаковывающие клетки представляют собой стабильно трансформированные раковые клетки, например, клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная линия 293). В еще одном варианте реализации упаковывающие клетки представляют собой клетки, не являющиеся трансформированными раковыми клетками, например, клетки 293 низкого пересева (клетки почки плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты плода человека), клетки WI-38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почки обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легкого плода макака-резуса). Неограничивающие примеры прокариотических клеток включают бактериальные клетки (например, *Escherichia coli*) и клетки архей. Клетки в соответствии с настоящим изобретением можно применять для получения банка клеток, например, банков доступных клеток (ACB) для целей, не связанных с GMP, или главного банка клеток (MCB) GMP. Объем аликвоты клеток в одном из вариантов реализации увеличивают от исходного инокулята до большего объема перед культивированием в биореакторе для продукции.

#### Способы лечения

Кроме того, в настоящем документе описаны способы лечения дисферлинопатии. В некоторых вариантах реализации способ лечения дисферлинопатии включает, состоит из или по существу состоит из введения субъекту, нуждающемуся в этом: (a) эффективного количества первого полинуклеотида, причем указанный первый полинуклеотид содержит любой из полинуклеотидов 5'-hDSYF, описанных в настоящем документе; и (b) эффективного количества второго полинуклеотида, причем указанный второй полинуклеотид содержит любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации первый полинуклеотид вводят перорально, парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, посредством внутривенной инъекции или вливания, подкожной инъекции или имплантата), путем ингаляции назального аэрозоля, вагинально, ректально, сублингвально, уретрально (например, в виде уретрального суппозитория) или местным путем (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.). В некоторых вариантах реализации первый полинуклеотид вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации второй полинуклеотид вводят перорально, парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, посредством внутривенной инъекции или вливания, подкожной инъекции или имплантата), путем ингаляции назального аэрозоля, вагинально, ректально, сублингвально, уретрально (например, в виде уретрального суппозитория) или местным путем (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.). В некоторых вариантах реализации второй полинуклеотид вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации первый и второй полинуклеотиды вводят одновременно. В некоторых вариантах реализации первый и второй полинуклеотиды вводят последовательно. В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.

В некоторых вариантах реализации способ лечения дисферлинопатии включает, состоит из или по существу состоит из введения субъекту, нуждающемуся в этом: (a) эффективного количества первого вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный первый AAV-вектор содержит любой из AAV-векторов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (b) эффективного количества второго вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный второй AAV-

вектор содержит любой из AAV-векторов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации первый AAV-вектор вводят перорально, парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, посредством внутричерепной инъекции или вливания, подкожной инъекции или имплантата), путем ингаляции назального аэрозоля, вагинально, ректально, сублингвально, уретрально (например, в виде уретрального суппозитория) или местным путем (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.). В некоторых вариантах реализации первый AAV-вектор вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации второй AAV-вектор вводят перорально, парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, посредством внутричерепной инъекции или вливания, подкожной инъекции или имплантата), путем ингаляции назального аэрозоля, вагинально, ректально, сублингвально, уретрально (например, в виде уретрального суппозитория) или местным путем (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.). В некоторых вариантах реализации второй AAV-вектор вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации первый и второй AAV-векторы вводят одновременно. В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой пояснично-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.

В некоторых вариантах реализации способ лечения дисферлинопатии включает, состоит из или по существу состоит из введения субъекту, нуждающемуся в этом: (а) эффективного количества первой экспрессирующей AAV-кассеты, причем указанная первая экспрессирующая AAV-кассета содержит любую из экспрессирующих AAV-кассет 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе; и (б) эффективного количества второй экспрессирующей AAV-кассеты, причем указанная вторая экспрессирующая AAV-кассета содержит любую из экспрессирующих AAV-кассет 3'-hDSYF, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации первую экспрессирующую AAV-кассету вводят перорально, парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, посредством внутричерепной инъекции или вливания, подкожной инъекции или имплантата), путем ингаляции назального аэрозоля, вагинально, ректально, сублингвально, уретрально (например, в виде уретрального суппозитория) или местным путем (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.). В некоторых вариантах реализации первую экспрессирующую AAV-кассету вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации вторую экспрессирующую AAV-кассету вводят перорально, парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, посредством внутричерепной инъекции или вливания, подкожной инъекции или имплантата), путем ингаляции назального аэрозоля, вагинально, ректально, сублингвально, уретрально (например, в виде уретрального суппозитория) или местным путем (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.). В некоторых вариантах реализации вторую экспрессирующую AAV-кассету вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации первую и вторую экспрессирующие AAV-касеты вводят одновременно. В некоторых вариантах реализации первую и вторую экспрессирующие AAV-касеты вводят последовательно. В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой пояснично-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.

В некоторых вариантах реализации способ лечения дисферлинопатии включает, состоит из или по существу состоит из введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции, содержащей (а) любой из полинуклеотидов 5'-hDSYF, описанных в настоящем документе, и любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; (б) любой из AAV-векторов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе, и любой из AAV-векторов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; (с) любую из экспрессирующих AAV-кассет 5'-hDSYF, описанных в настоящем документе, и любую из экспрессирующих AAV-кассет 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; или (д) любую из систем двойного AAV-вектора, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации композицию вводят перорально, парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, посредством внутричерепной инъекции или вливания, подкожной инъекции или имплантата), путем ингаляции назального аэрозоля, вагинально, ректально, сублингвально, уретрально (например, в виде уретрального суппозитория) или местным путем (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.). В некоторых вариантах реализации композицию вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой пояснично-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.

В настоящем документе дополнительно описано применение любых из рекомбинантных полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, векторных систем и композиций для производства лекарственного средства для лечения дисферлинопатии у субъекта, нуждающегося в этом.

В настоящем документе описано применение композиции, содержащей (а) любой из полинуклеотидов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе, и любой из полинуклеотидов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; (б) любой из AAV-векторов 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе, и любой из AAV-векторов 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; (с) любую из экспрессирующих AAV-кассет 5'-hDYSF, описанных в настоящем документе, и любую из экспрессирующих AAV-кассет 3'-hDYSF, описанных в настоящем документе; или (д) (е) любую из систем двойного AAV-вектора, опи-

санных в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения дисферлинопатии у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах реализации композицию вводят перорально, парентерально (например, внутримышечно, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, посредством внутривенной инъекции или вливания, подкожной инъекции или имплантата), путем ингаляции назального аэрозоля, вагинально, ректально, сублингвально, уретрально (например, в виде уретрального суппозитория) или местным путем (например, в виде геля, мази, крема, аэрозоля и т.д.). В некоторых вариантах реализации композицию вводят внутримышечно или внутривенно. В некоторых вариантах реализации дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2В (LGMD2В) или миопатию Миоши.

Титры AAV-векторов, подлежащих введению в способах согласно настоящему изобретению, зависят, например, от конкретного AAV, способа введения, цели лечения, индивида и типа(ов) клеток, являющихся мишенью, и их можно определить способами, стандартно применяемыми в данной области техники. Титры AAV могут варьировать от по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1 \times 10^9$ , приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , от приблизительно  $1 \times 10^{13}$  до приблизительно  $1 \times 10^{14}$  или более ДНКазоустойчивых частиц (DRP) на мл. Дозы также можно выражать в единицах вирусных геномов (vg). Например, дозы AAV могут составлять от по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1 \times 10^9$ , приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $2 \times 10^{12}$ , приблизительно  $3 \times 10^{12}$ , приблизительно  $4 \times 10^{12}$ , приблизительно  $5 \times 10^{12}$ , приблизительно  $6 \times 10^{12}$ , приблизительно  $7 \times 10^{12}$ , приблизительно  $8 \times 10^{12}$ , приблизительно  $9 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1 \times 10^{13}$  до приблизительно  $1 \times 10^{14}$  вирусных геномов.

Дозировку AAV можно определить несколькими способами, которые включают твердофазный ИФА, оценку активности обратной транскриптазы, FACS, анализы трансдукции, нозерн-блоттинг (например, полуколичественный нозерн-блоттинг), дот-блоттинг или ПЦР (например, кПЦР), но не ограничиваются ими. Хорошо известно, что дозы AAV можно определить путем измерения количества геномов AAV-вектора с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР). Такие способы на основе кПЦР преодолевают разночтения или произвольные результаты, получаемые при обычных анализах трансдукции. В одном варианте реализации определения дозировки ПЦР в качестве калибровочного стандарта используют плазмидную ДНК. Формы плазмид могут влиять на результаты дозировки, полученные с помощью способов на основе кПЦР. В одном варианте реализации в качестве стандарта количественного определения используют циклическую или суперспирализованную ДНК или плазмиды.

В некоторых вариантах реализации дозировки можно выражать в единицах vg/кг при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения. Например, дозы AAV составляют приблизительно  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^{16}$  vg/кг, приблизительно  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^{15}$  vg/кг или приблизительно  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{14}$  vg/кг при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения. В еще одном варианте реализации дозировки составляют приблизительно по меньшей мере  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1 \times 10^9$ , приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $2 \times 10^{12}$ , приблизительно  $4 \times 10^{12}$ , приблизительно  $6 \times 10^{12}$ , приблизительно  $8 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1 \times 10^{13}$ , приблизительно  $2 \times 10^{13}$ , приблизительно  $2,4 \times 10^{13}$ , приблизительно  $3 \times 10^{13}$ , приблизительно  $4 \times 10^{13}$ , приблизительно  $5 \times 10^{13}$ , приблизительно  $6 \times 10^{13}$ , приблизительно  $7 \times 10^{13}$ , приблизительно  $8 \times 10^{13}$ , приблизительно  $9 \times 10^{13}$ , приблизительно  $1 \times 10^{14}$ , приблизительно  $1 \times 10^{15}$  или по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{16}$  vg/кг. В одном варианте реализации дозировка составляет по меньшей мере  $2 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $2,4 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$  или  $8 \times 10^{13}$  vg/кг при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения.

В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, включают введение по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1 \times 10^9$ , приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $2 \times 10^{12}$ , приблизительно  $3 \times 10^{12}$ , приблизительно  $4 \times 10^{12}$ , приблизительно  $5 \times 10^{12}$ , приблизительно  $6 \times 10^{12}$ , приблизительно  $7 \times 10^{12}$ , приблизительно  $8 \times 10^{12}$ , приблизительно  $9 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1 \times 10^{13}$  vg в общем объеме 1,5 мл на инъекцию. В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, включают введение общей суточной дозы по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1 \times 10^9$ , приблизительно  $1 \times 10^{10}$ , приблизительно  $1 \times 10^{11}$ , приблизительно  $1 \times 10^{12}$ , приблизительно  $2 \times 10^{12}$ , приблизительно  $3 \times 10^{12}$ , приблизительно  $4 \times 10^{12}$ , приблизительно  $5 \times 10^{12}$ , приблизительно  $6 \times 10^{12}$ , приблизительно  $7 \times 10^{12}$ , приблизительно  $8 \times 10^{12}$ , приблизительно  $9 \times 10^{12}$ , приблизительно  $1 \times 10^{13}$ , приблизительно  $2 \times 10^{13}$ , приблизительно  $5 \times 10^{13}$ , приблизительно  $7 \times 10^{13}$ , приблизительно  $1 \times 10^{14}$  vg. В одном типичном способе определения титра инкапсидированного векторного генома используют количественную ПНР, например, способы, описанные в статье Pozsgai et al., Mol. Ther. 25(4): 855-869, 2017, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации любой из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз в сутки. В некоторых вариантах реализации любой из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз в неделю. В некоторых вариантах реализации любой из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 раз в месяц. В некоторых вариантах реализации любой из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту по меньшей мере каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней. В некоторых вариантах реализации любой из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту по меньшей мере каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 недель. В некоторых вариантах реализации любой из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней. В некоторых вариантах реализации любой из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 недель. В некоторых вариантах реализации любой из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 месяцев.

В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, включают системное введение любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе. Например, системное введение представляет собой введение в систему кровообращения, влияющее на весь организм. Системное введение включает энтеральное введение, например, за счет всасывания через желудочно-кишечный тракт, и парентеральное введение посредством инъекции, вливания или имплантации. В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, включают местное введение любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, включают введение любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, в одну или более тканей. В некоторых вариантах реализации ткань выбрана из мышечной, эпителиальной, соединительной и нервной ткани. В некоторых вариантах реализации ткань представляет собой мышечную ткань.

В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, включают введение любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, в стопу субъекта. В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, включают введение любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, в короткий разгибатель пальцев (EDB) субъекта.

В настоящем изобретении также рассматривается комбинированная терапия. В настоящем документе комбинация включает как одновременное лечение, так и последовательное лечение. Конкретно рассматриваются комбинации способов согласно настоящему изобретению со стандартными медицинскими способами лечения (например, кортикостероидами), а также комбинации с новыми способами лечения. В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают обнаружение наличия или отсутствия мутации в гене дисферлина у субъекта перед или после введения субъекту любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации любой из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе, вводят субъекту после обнаружения наличия мутации в гене дисферлина. Примеры мутаций дисферлина включают с.1392dupA, с.3035G>A (p.W1012X), с.2858dupT, с.2779del G, с.5594delG, с.4201dupA, с.1795\_1799dupTACT, с.3832C>T (p.Q1278X), с.757C>T (p.R253W), с.855+1delG, с.3126G>A (p.W1042X), с.1663C>T (p.R555W), с.610C>T (p.R204X), с.3112C>T (p.R1038X), с.1368C>G (p.C456W), с.5713C>T (p.R1905X), с.3826C>G (p.I1276V), с.3843 +1G>A, с.4167+1G>C, с.2643+1G>A, с.797T>C (p.I266P), с.4876delG, с.3477C>A (p.Y1159X), с.3137G>A (p.R1046H), с.509C>A (p.A170E), с.3967C>T (p.Q1323X), 3191\_3196dupGAGGCG, с.3992G>T (p.R1331L), с.3516\_3517delTT, с.247delG, с.1180+11C>T, с.896G>A (p.G299E), с.5078G>A (p.R1693Q), с.5979dupA, с.3348+1\_3348+4delGTAT, с.5314\_5318delAGCCC и с565C>G (p.L189V), но не ограничиваются ими. В некоторых случаях ген дисферлина содержит одну или более мутаций, включая с.1392dupA, с.3035G>A (p.W1012X), с.2858dupT, с.2779del G, с.5594delG, с.4201dupA, с.1795\_1799dupTACT, с.3832C>T (p.Q1278X), с.757C>T (p.R253W), с.855+1delG, с.3126G>A (p.W1042X), с.1663C>T (p.R555W), с.610C>T (p.R204X), с.3112C>T (p.R1038X),

c.1368C>G (p.C456W), C.5713C>T (p.R1905X), c.3826C>G (p.I1276V), c.3843+1G>A, c.4167+1G>C, c.2643+1G>A, c.797T>C (p.I266P), c4876delG, c.3477C>A (p.Y1159X), c.3137G>A (p.R1046H), C.509C>A (p.A170E), c.3967C>T (p.Q1323X), 3191\_3196dupGAGGCG, c.3992G>T (p.R1331L), c.3516\_3517delTT, c.247delG, c.H80+11C>T, c896G>A (p.G299E), c.5078G>A (p.R1693Q), c.5979dupA, c.3348+1\_3348+4delGTAT, c.5314\_5318delAGCCC и c565C>G (p.L189V), но не ограничиваясь ими.

В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают определение уровня белка дисферлина у субъекта до или после введения субъекту любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают обнаружение уровня белка дисферлина у субъекта после введения субъекту любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации обнаружение уровня дисферлина включает обнаружение экспрессии гена дисферлина. Обнаружение экспрессии гена дисферлина может включать количественное определение уровней ДНК или РНК дисферлина. В качестве альтернативы или дополнения, обнаружение уровня белка дисферлина включает количественное определение уровня белка дисферлина. В некоторых вариантах реализации уровень белка дисферлина обнаруживают в образце, полученном от субъекта. В некоторых вариантах реализации образец представляет собой образец биологической жидкости. Примеры образцов биологических жидкостей включают кровь, мочу, пот, слюну, кал и синовиальную жидкость, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации образец крови представляет собой образец плазмы или сыворотки. В некоторых случаях указанный способ дополнительно включает анализ путем секвенирования ДНК дисферлина, например, от Athena Diagnostics (CPT: 81408(1)).

В некоторых вариантах реализации способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают модификацию дозы или частоты введения любого из полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, которые вводят субъекту. В некоторых вариантах реализации модификация дозы или частоты введения основана на обнаружении уровня белка дисферлина. В некоторых вариантах реализации дозу или частоту введения снижают, когда уровень белка дисферлина у субъекта увеличивается по сравнению с уровнем белка дисферлина у субъекта в более ранний момент времени (например, перед введением полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций или после введения начальной дозы полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций, но перед введением следующей дозы полинуклеотидов, плазмид, вирусных векторов, систем двойного вектора или композиций).

#### Наборы

В дополнительном аспекте предложен набор, содержащий или, в качестве альтернативы, по существу состоящий или состоящий из любого одного или более полинуклеотидов, полипептидов, векторов, клеток и систем или композиций, и инструкции по применению. В одном аспекте любой из одного или более полинуклеотидов, полипептидов, векторов, клеток и систем или композиций мечены обнаруживаемой меткой или дополнительно содержат маркер очистки или обнаружимый маркер. В некоторых случаях набор содержит а) первый полинуклеотид, причем указанный первый полинуклеотид представляет собой рекомбинантный полинуклеотид, описанный в настоящем документе, и второй полинуклеотид, причем указанный второй полинуклеотид представляет собой рекомбинантный полинуклеотид, описанный в настоящем документе; или б) первый вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный первый AAV-вектор представляет собой AAV-вектор, описанный в настоящем документе, и второй вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный второй AAV-вектор представляет собой AAV-вектор, описанный в настоящем документе; или в) систему двойного AAV-вектора, описанную в настоящем документе; или г) композицию, описанную в настоящем документе; или д) клетку (например, клетку-хозяина, необязательно клетку млекопитающего), описанную в настоящем документе; и, необязательно, инструкцию по применению.

#### Примеры

##### Пример 1: Получение системы двойного AAV-вектора

В этом примере представлен типичный способ получения систем двойного AAV-вектора, описанных в настоящем документе. В этом примере получали двойной AAV-вектор, gAAVrh.74.MHC K7.DYSF.DV. RAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV представляет собой нереплицирующийся рекомбинантный AAV серотипа rh74 (AAVrh74), экспрессирующий дисферлин человека с двойных векторов (DV) под контролем мышечно-специфичного промотора МНСК7. Двойные векторы содержат 5'-фрагмент либо 3'-фрагмент последовательности кДНК дисферлина, и эти фрагменты перекрываются на ~1 т.п.о. для облегчения рекомбинации с получением полноразмерного гена дисферлина человека. Экспрессирующая кассета, содержащая фрагмент кДНК человеческого дисферлина, фланкирована последовательностями инвертированных концевых повторов (ИКП) AAV2 (фиг. 1).

Для конструирования gAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV кДНК дисферлина человека разделили на два конструкта, соответствовавшие предельному размеру упаковки AAV (< 4,7 т.п.о.). 5'-вектор (например, AAV-вектор 5'-hDYSF), pAAV.MHCK7.DYSF5'.PTG (PTC=промотор/трансген) содержал мышечно-

специфичный промотор МНСК7, химерный интрон, консенсусную последовательность Козака и 5'-фрагмент кДНК DYSF, соответствующую 1-1113 аминокислотам аминокислотной последовательности дисферлина. 3'-вектор (например, AAV-вектор 3'-hDYSF), pAAV.DYSF3'.POLYA, содержал 3'-фрагмент кДНК DYSF, соответствующую 794-2080 аминокислотам аминокислотной последовательности дисферлина, и 3'-UTR DYSF, несущую сигнал полиаденилирования. Последовательности экспрессирующих каскад AAV-вектора 5'-hDSYF и AAV-вектора 3'-hDYSF описаны как SEQ ID NO: 6 и 8, соответственно.

Предыдущие исследования подтвердили экспрессию в сердце при использовании промотора МНСК7 (Salva et al. Mol Ther 15, 320-329 (2007), полностью включенная в настоящий документ посредством ссылки) и достижение экспрессии AAVrh74 в скелетных мышцах, диафрагме и сердечной мышце (Sondergaard et al. Annals of clinical and Transl Neurology 2, 256-270 (2015), полностью включенная в настоящий документ посредством ссылки). AAV-вектор 5'-hDSYF и AAV-вектор 3'-hDYSF включали в капсид как отдельные вирионы AAVrh.74. Молекулярный клон серотипа AAVrh.74 клонировали из лимфатического узла макака-резуса, его обсуждение приведено в статье Rodino-Klapac et al. Journal of Translational medicine 5, 45 (2007), полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

AAV-вектор 5'-hDYSF (плазмида на основе AAV-вектора pAAV.МНСК7.DYSF5'.PTG)

Первый рекомбинантный одноцепочечный AAV-вектор получили с использованием ДНК-плазмиды на основе AAV-вектора pAAV.МНСК7.DYSF5'.PTG. Плазмиду конструировали путем инсерции экспрессирующей каскады МНСК7, управляющей 5'-фрагментом частичной последовательности кДНК дисферлина человека (кДНК человека, номер доступа в Genbank NM\_003494.3) в векторный остов pAAV-CMV (Clontech) (карту плазмиды см. на фиг. 2, а информацию о конкретной последовательности - в табл. 1). Присутствовал химерный интрон, состоящий из 5'-донорного сайта из первого интрона гена  $\beta$ -глобина человека и точки ветвления и 3'-акцепторного сайта сплайсинга из интрона, находящегося между лидером и телом варибельной области тяжелой цепи гена иммуноглобулина. Единственными вирусными последовательностями, включенными в этот вектор, являлись инвертированные концевые повторы AAV2, необходимые как для репликации вирусной ДНК, так и для упаковки генома  $\gamma$ AAV-вектора. Последовательность между двумя ИКП представляла собой фрагмент ДНК, включенный в капсид вирионов AAVrh74.

Таблица 1

Молекулярные свойства одной типичной плазмиды pAAV.МНСК7.DYSF5'.PTG

ТИП	НАЧАЛ	КОН	НАЗВАНИЕ	ОПИСАНИЕ
ОБЛАСТЬ	8229	8373	5'-ИКП	Инвертированный концевой повтор
ОБЛАСТЬ	22	813	МНСК7	Энхансер/промотор гибрида комплекса тяжелой цепи миозина и последовательности E-box
ОБЛАСТЬ	823	970	Химерный интрон	5'-донорный сайт из гена $\beta$ -глобина человека, точка ветвления и 3'-акцепторный сайт сплайсинга из
ГЕН	993	4329	кДНК hDYSF	кДНК дисферлина человека (транскрипционный вариант 8; 377-
ОБЛАСТЬ	4440	4584	3'-ИКП	Инвертированный концевой повтор
ГЕН	6370	7230	AmpR	ген $\beta$ -лактамазы
ОБЛАСТЬ	7378	8045	ori	Сайт инициации репликации плазмиды

AAV-вектор 3'-hDYSF (плазмида на основе AAV-вектора pAAV.DYSF3'.POLY)

Второй рекомбинантный одноцепочечный AAV-вектор получили с использованием ДНК-плазмиды на основе AAV-вектора pAAV.DYSF3'.POLYA. Плазмиду конструировали путем инсерции частичной последовательности кДНК дисферлина человека (кДНК человека, номер доступа в Genbank NM\_003494.3) в векторный остов pAAV-CMV (Clontech) (карту плазмиды см. на фиг. 3, а информацию о конкретной последовательности - в табл. 2). Для эффективной терминции транскрипции использовали последовательности эндогенной 3'-нетранслируемой области дисферлина и сигнала polyA. Единственными вирусными последовательностями, включенными в этот вектор, являлись инвертированные концевые повторы AAV2, необходимые как для репликации вирусной ДНК, так и для упаковки генома  $\gamma$ AAV-вектора. Последовательность между двумя ИКП представляла собой фрагмент ДНК, включенный в капсид вирионов AAVrh74.

Таблица 2

Молекулярные свойства одной типичной плазмиды pAAV.DYSF3'.POLYA

ТИП	НАЧАЛ	КОН	НАЗВАНИЕ	ОПИСАНИЕ
ОБЛАСТЬ	1	145	5'-ИКП	Инвертированный концевой повтор
ГЕН	204	3866	кДНК hDYSF	КДНК дисферлина человека (транскрипционный вариант 8; 2754-
ОБЛАСТЬ	4070	4364	hDYSF 3'-UTR	3'-нетранслируемая область гена дисферлина человека
ОБЛАСТЬ	4378	4427	pA	Искусственный сигнал
ОБЛАСТЬ	4481	4625	3'-ИКП	Инвертированный концевой повтор
ГЕН	6411	7271	AmpR	ген β-лактамазы
ОБЛАСТЬ	7419	8086	ori	Сайт инициации репликации плазмиды

Плаزمид-помощник AAV (pNLRep2-Caprh74)

Исходную плазмиду pNLrep конструировали из p5E18 и pCLR3K. (См. статью Bansal, D., et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. Nature 423, 168-172 (2003), полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки). p5E18 была основана на pAAV/Ad. Она содержала гены гер и сар AAV2, причем промотор p5 удалили с 5'-конца гер и поместили в 3'-конец сар, что привело к наличию 3 т.п.о. спейсерной последовательности между p5 и гер (информацию о конкретной последовательности см. в табл. 3). Для получения pCLR3K интрон коллагена человека амплифицировали с помощью ПЦР, а затем клонировали в pAd/AAV в положении 1052. Для конструирования pNLrep фрагмент BamHI/XbaI p5E18 заменяли фрагментом BamHI/XbaI, содержащим 3 т.п.о. интрона коллагена из pCLR3k. Ген сар rh74 амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали вместо гена сар AAV2 в pNLrep с использованием сайтов рестрикции Swa I/Not I с получением pNLRep2-Caprh74. Идентичность гена капсида AAV rh74 подтверждали путем секвенирования ДНК-плазмиды.

Таблица 3

Молекулярные свойства плазмиды pNLRep2-Caprh.74

ТИП	НАЧАЛ	КОН	НАЗВАНИЕ	ОПИСАНИЕ
ГЕН	84	815	5'-конец Rep78	5'-конец OPC Rep78
ОБЛАСТЬ	816	3886	Интрон Col	3 т.п.о., интрон коллагена человека
ГЕН	3887	5017	3'-конец Rep78	3'-конец OPC Rep78
ГЕН	5037	7253	Cap rh74	ген сар rh74
ОБЛАСТЬ	7428	7507	промотор p5	Область промотора p5 AAV2

Плазмид-помощник аденовируса (pHELP)

Плазмиду pHELP получили от Applied Viromics (Фремонт, штат Калифорния, 94538), ее размер составлял 11635 п.о. (информацию о конкретной последовательности см. в табл. 4). Плазмиды содержала области генома аденовируса, важные для репликации AAV, а именно E2A, E4 и VA-РНК (функции E1 аденовируса обеспечивали клетки 293). Плазмиды была основана на остоле pBluescript и также содержала ген bla, кодирующий ген β-лактамазы TEM-1, придающий устойчивость к ампициллину (10182-11042 п.о.), бактериальный сайт инициации репликации ColE1 (9315-10167 п.о.) и сайт инициации репликации одноцепочечной ДНК f1 (11172-11627 п.о.). Последовательности аденовируса, присутствующие в этой плазмиде, составляли лишь ~28% (9280/35938) генома аденовируса и не содержали cis-элементов, критически важных для репликации, например, инвертированных концевых повторов. Идентичность этих 3 генов аденовируса подтверждали посредством секвенирования ДНК-плазмиды. Анализ ДНК выявил 100% гомологию с 3 областями гена аденовируса 5 типа (номер доступа в GenBank AF369965, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки).

Таблица 4

Молекулярные свойства плазмиды pHELP

ТИП	НАЧАЛ	КОНЕ	НАЗВАНИЕ	ОПИСАНИЕ
ОБЛАСТЬ	1	5336	E2A	ДНК-связывающий белок, необходимый для выполнения
ОБЛАСТЬ	5337	8537	E4	ОРС6 E4, необходимая для функций помощника AAV.
ОБЛАСТЬ	8537	9280	VA-РНК	Вирусно-ассоциированная РНК представляет собой некодирующую РНК, регулирующую трансляцию
ГЕН	11042	10182	Amp <sup>r</sup>	Ген устойчивости к ампициллину

Пример 2: Производство вирусных продуктов с использованием системы двойного AAV-вектора

Клетки HEK 293 трансфицировали 3 продуцирующими плазмидами ((i) плазмидой на основе AAV-вектора, например, AAV-вектором 5'-hDSYF или AAV-вектором 3'-hDYSF; (ii) плазмидой-помощником аденовируса (Ad); и (iii) плазмидой-помощником AAV) с использованием оптимизированного способа на основе совместного осаждения с фосфатом кальция. Трансфекция клеток включала получение раствора

ДНК/кальция, содержащего плазмиду на основе AAV-вектора, плазмиду-помощник Ad, плазмиду-помощник AAV и CaCl<sub>2</sub>, и смешивание с равным объемом 2X физиологического раствора с HEPES-буфером с получением оптимального осадка. Затем осадок добавляли к клеткам HEK 293 и инкубировали. Затем осадок добавляли к клеткам HEK 293 и инкубировали. После инкубирования среду заменяли, после чего добавляли нуклеазу.

Пример 3: Определение эффективности внутримышечной доставки rAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV

Получили две экспрессирующие AAV-кассеты, содержащие 5'- и 3'-фрагменты кассеты MHCK7.DYSF с перекрытием последовательностей на ~1 т.п.о. (см. фиг. 1). Плазмиды упаковывали в векторы AAVrh.74. 4-недельным мышам *Dysf*<sup>+/−</sup> вводили 1×10<sup>11</sup> vg каждого вектора путем внутримышечной инъекции в переднюю большеберцовую мышцу и выполняли некропсию через 1 месяц. После доставки обоих векторов наблюдали устойчивую полноразмерную экспрессию дисферлина с помощью иммунологического окрашивания (фиг. 4А) и вестерн-блоттинга (фиг. 4С). Доставка любого вектора по отдельности не приводила к aberrантной экспрессии дисферлина (фиг. 4В: иммунное окрашивание, фиг. 4D: вестерн-блоттинг). 3222 представляет собой полноразмерный контроль. Количество мышечных волокон, экспрессирующих дисферлин, количественно определяли и показали в табл. 5.

Таблица 5

Экспрессия дисферлина после в/м доставки rAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV

Испытываемое соединение (вектор)	Идентификатор животного (№ ушной бирки)	Линия животного	Конечный момент времени (месяцев)	Доза	% волокон, экспрессирующих <i>Dysf</i> *
rAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV	3266	<i>Dysf</i> <sup>+/−</sup>	1	2x10 <sup>11</sup> vg	75%
	3267				68%
	3268				81%
	674				63%
	675				83%
* Выполняли подсчет в четырех полях при увеличении 20x на мышцу (~550-600 волокон на животное)					

Начали исследование для оценки безопасности в зависимости от времени после внутримышечной инъекции в переднюю большеберцовую мышцу (табл. 6). Кроме того, оценивали экспрессию белка и биораспределение вектора. Через 1, 3, 6, 9 и 12 месяцев животных подвергали полной некропсии и оценивали на предмет экспрессии дисферлина (фиг. 5А-5С (показаны 1, 3 и 6 месяцев)), биораспределения вектора (табл. 7) и гистопатологии мышцы и нецелевых органов. Инъекцию выполняли в большеберцовую мышцу (ГА). Ткани, проанализированные на предмет гистопатологии для каждого животного, включали: гонады, печень, сердце, легкие, селезенку, почки, диафрагму, левую (обработанную) и правую передние большеберцовые мышцы. Никаких результатов не выявили.

Таблица 6

Долгосрочное исследование безопасности rAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV

Испытываемое соединение (вектор)	Идентификатор животного (№ ушной бирки)	Линия животного	Конечный момент времени (месяцев)	Доза	% волокон, экспрессирующих <i>Dysf</i> *
rAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV	832	<i>Dysf</i> <sup>+/−</sup>	3	2x10 <sup>11</sup> vg	70%
	833				78%
	834				79%
	835		6		90%
	836				91%
	815				68%
	816				70%
		9			

	817			79%
	818			68%
	819			89%
	820		12	87%
	821			89%
* Выполняли подсчет в четырех полях при увеличении 20x на мышцу (~550-600 волокон на животное)				

Таблица 7

Биораспределение вектора у животных, получавших gAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV, через три месяца

Ткань	Количество копий векторного генома/мкг		
	Животное 832	Животное 833	Животное 834
LTA (обработанная мышца)	1,12E+05	1,12E+05	2,61E+05
RTA (контралатеральная мышца)	Необн.	1,87E+02	1,02E+02
Сердце	4,54E+03	1,96E+03	9,11E+02
Легкое	2,62E+03	1,00E+04	6,86E+02
Печень	2,42E+05	9,19E+04	2,24E+05
Почка	6,71E+03	2,76E+03	1,86E+02
Селезенка	4,13E+03	3,43E+03	4,49E+02
Гонады	2,30E+02	3,32E+02	4,15E+01

После внутримышечной инъекции экспрессию дисферлина обнаружили в передней большеберцовой мышце, подвергавшейся инъекции (фиг. 6). После внутривенной доставки экспрессию дисферлина обнаружили в скелетной и сердечной мышцах (фиг. 7А).

Дополнительные когорты мышей обработали для определения минимальной эффективной дозы для восстановления мембраны. Три дозы AAV-векторов вводили в FDB мышам 129Dysf<sup>-/-</sup> в возрасте 8 недель (n=6 на группу). Контрольная группа Dysf<sup>-/-</sup> получала физиологический раствор, а группа мышей 129WT служила в качестве нормальных контролей, специфических по отношению к линии. Как показано на фиг. 8, обработка AAVrh.74.DYSF.DV привела к восстановлению мембраны в зависимости от дозы. Исследования параллельной экспрессии показывают, что высокая доза приводит к экспрессии >50% трансдукции волокон. Эта доза эквивалентна дозе, которую вводили в переднюю большеберцовую мышцу для исследований экспрессии и безопасности, с учетом нормировки на массу мышцы (фиг. 4А-5С).

Таблица 8

Зависимость ответа от дозы AAVrh.74.MHCK7.Dysferlin.DV

Линия мыши	Обработка	Общая доза (vg)	12 недель
129-Dysf <sup>tm1Kcam/J</sup>	AAVrh.74.MHCK7.Dysf.DV	6x10 <sup>9</sup>	n = 6
129-Dysf <sup>tm1Kcam/J</sup>	AAVrh.74.MHCK7.Dysf.DV	2x10 <sup>10</sup>	n = 6
129-Dysf <sup>tm1Kcam/J</sup>	AAVrh.74.MHCK7.Dysf.DV	6x10 <sup>10</sup>	n = 6
129-Dysf <sup>tm1Kcam/J</sup>	PBS	н/о	n = 6
Нормальные контрольные 129S1/SvImJ	PBS	н/о	n = 6

Системная доставка gAAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV

Выполнили исследование по подбору дозы для проверки целесообразности/эффективности системной доставки двойного вектора. Мышей BlaJ (мышей AJ с недостаточностью дисферлина, скрещенных с мышами BL6) использовали для исследования на основе установленного функционального результата МРТ/МРС у этой линии. 3 группы мышей (n=6 на группу) обрабатывали в возрасте 6 недель путем инъекции в хвостовую вену физиологического раствора либо 2e12 vg общего AAV.DYSF DV (8e13 vg/kg при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения), либо 6e12 vg общего AAV.DYSF.DV (2,4e13 vg/kg при использовании суперспирализованной ДНК или плазмиды в качестве стандарта количественного определения). Анализ конечного показателя выполняли через 3 месяца, он включал оценку физиологии диафрагмы, анализ восстановления мембраны в FDB и полную некропсию для количественной оценки экспрессии дисферлина и оценки гистопатологии.<sup>4</sup>

В конечный момент исследования (4 месяца) выполняли полную некропсию. Диафрагму подвергали измерениям силы, в мышце FDB анализировали восстановление мембраны, мышцы и органы собирали для оценки экспрессии, биораспределения вектора и гистопатологии. При высокой дозе экспрессия дисферлина была широко распространена во всех мышцах (фиг. 7А и 7В), в то время как низкая доза приводила к вариабельной экспрессии на низком уровне. Через 20 недель мыши BlaJ характеризовались очень сглаженным гистологическим фенотипом. Наблюдали значимое увеличение количества центральных ядер как маркера регенерации по сравнению с контрольными животными. Обработанные мыши демонстрировали значительное снижение центральной нуклеации при высокой дозе (фиг. 7В). Подверг-

шаяся наибольшему воздействию поясничная мышца демонстрировала снижение фиброза и воспаления при обработке в высокой дозе (6e12 vg) (фиг. 9). Недостаточная сила диафрагмы восстанавливалась как при высокой, так и при низкой дозе (фиг. 10A), наблюдали восстановление мембраны в мышце FDB в зависимости от дозы (фиг. 10B).

Пример 4: Безопасность и эффективность экспрессии полноразмерного дисферлина при доставке AAV5 и Aavrh.74.Mhck7.Dysf.Dv у приматов, не являющихся человеком

Способы: Авторы изобретения обработали 4 NHP AAV.MHCK7.DYSF.FLAG путем внутримышечной инъекции. 2 NHP обрабатывали AAV5.MHCK7.DYSF, а 2 - AAVrh.74.MHCK7.DYSF.FLAG. Зеркально дизайну клинического исследования, одно животное анализировали через 3 месяца, а двух - через 6 месяцев. В исходный момент для животных выполняли биохимические анализы и иммунологические исследования, включая анализ ELISpot для измерения количества Т-клеток против AAV5 и капсида rh.74 и дисферлина (фиг. 11A-11D) и титров антител против AAV (табл. 9). Пептидные пулы, используемые для стимуляции МПК, характеризовались длиной 15 аминокислот с перекрытием на 10 аминокислот с целью охвата всех возможных антигенных эпитопов. Клетки, реагирующие на пептиды, высвобождали интерферон- $\gamma$ , количественно определяемый как пятна с помощью анализа ELISpot. Подсчитывали количество пятен на миллион клеток, используя 50 пятен/1 $\times$ 10<sup>6</sup> клеток в качестве порога положительной реакции. Устойчивого иммунного ответа не наблюдали. Экспрессия имела место у всех животных в конечный момент исследования (фиг. 16A). Эти исследования повторяли каждые две недели в течение всего исследования. В конечный момент исследования выполняли полную некропсию животных, которая в дополнение к исследованиям экспрессии генов включала гистопатологические исследования и исследования биораспределения в тканях жизненно важных органов.

Результаты: Наблюдаемая токсичность не обнаружена. Авторны настоящей заявки использовали антитело против дисферлина, не позволявшее различать дисферлин макака-резуса и человека, чтобы продемонстрировать сверхэкспрессию дисферлина (фиг. 12A-12C). Иммунологическое окрашивание антителом против FLAG также выполняли для подтверждения экспрессии дисферлина с вектора (фиг. 13). Для ТА, в которые выполняли инъекции AAV5.DYSF, мышцы продемонстрировали 104,9% (3 мес.) и 122,6% (6 мес.) сверхэкспрессию дисферлина, в то время как ТА, в которые выполняли инъекции AAVrh.74.DYSF.DV, демонстрировали 122,0% (3 мес.) и 115,2% (6 мес.) сверхэкспрессию по сравнению с контролем без инъекций. У NHP не наблюдали токсичности на уровне тканей, воспаление или некроз мышечных волокон отсутствовали. Иммунологические анализы ELISpot не продемонстрировали какого-либо aberrантного ответа на капсид или трансген (фиг. 11A-11D). Кроме того, полный общий анализ крови и биохимические анализы не демонстрировали аномальных значений ни у одного из макаков. Как и ожидалось, титры антител против AAV были повышены после переноса гена. Титры антител против AAVrh.74 в конечный момент времени были ниже, чем титры антител против AAV5.

Таблица 9

Антитела против AAV5 и антитела против AAVrh.74 после внутримышечной инъекции у NHP

Недели после инъекции	AAV5.hDYSF			AAVrh.74.DYSF.DV	
	06C011	06C029	07C019	10-158	10-172
0	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
2	1600	6400	6400	400	400
4	51200	51200	51200	800	800
6	51200	102400	102400	800	200
8	51200	204800	102400	800	800
10	51200	102400	51200	1600	1600
12	51200	204800	102400	1600	800
14	51200	204800	51200		800
16	51200	102400			800
18	51200	51200			1600
20	51200	25600			1600
22	51200	25600			1600
24	51200	51200			3200

Эквиваленты

Если не задано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно используемое специалистом в области техники, к которой относится данная технология.

Настоящую технологию, иллюстративно описанную в настоящем документе, можно реализовать на практике подходящим способом при отсутствии любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не описанных в настоящем документе. Таким образом, например, термины "содержащий", "включая", "включающий" и т.д. следует интерпретировать расширительно и без ограничения.

Кроме того, термины и выражения, применяемые в настоящем документе, были использованы в качестве терминов описания, а не ограничения, и при использовании таких терминов и выражений отсутствует намерение исключить какие-либо эквиваленты представленных или описанных характеристик либо их составных частей, однако следует понимать, что в пределах заявленных рамок настоящей технологии возможны различные модификации.

Таким образом, следует понимать, что материалы, способы и примеры, представленные в настоящем документе, характеризуют предпочтительные аспекты, являются типичными и не предназначены для ограничения рамок настоящей технологии.

Настоящая технология описана в настоящем документе в широком и общем смысле. Каждая из ее более узких разновидностей и субродовых групп, подпадающая под общее описание, также входит в состав настоящей технологии. Сюда входят общее описание настоящей технологии при условии или отрицательном ограничении, исключающем любой объект изобретения, вне зависимости от того, указан ли конкретно удаляемый материал в настоящем документе или нет.

Помимо этого, если характеристики или аспекты настоящей технологии описаны в терминах групп Маркуша, специалисты в данной области техники должны понимать, что тем самым настоящая технология также описывается применительно к любому отдельному члену или подгруппе членов группы Маркуша.

Все публикации, заявки на патент, патенты и другие источники, упомянутые в настоящем документе, явным образом полностью включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый из них был в отдельности включен в настоящий документ посредством ссылки. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, является определяющим.

Другие аспекты изложены в следующей формуле изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный рекомбинантный полинуклеотид содержит первую нуклеотидную последовательность, причем указанная первая нуклеотидная последовательность состоит из:

- (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 6 или 18;
- (b) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 18 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 1, 6 или 18;
- (c) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15;
- (d) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 13 или 15;
- (e) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или
- (f) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности (e) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (e).

2. Рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный рекомбинантный полинуклеотид содержит вторую нуклеотидную последовательность, причем указанная вторая нуклеотидная последовательность состоит из:

- (a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19;
- (b) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 19 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 2, 8 или 19;
- (c) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16;
- (d) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении соответствующей SEQ ID NO: 14 или 16;
- (e) полинуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или
- (f) полинуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной полинуклеотидной последовательности (e) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (e).

3. Рекомбинантный полинуклеотид по п.1 или 2, дополнительно содержащий один или более дополнительных нуклеотидов, содержащих инвертированный концевой повтор (ИКП), промотор, интрон, маркер селекции, сайт инициации репликации (ORI), нетранслируемую область (UTR) или сигнал полиаденилирования (polyA).

4. Рекомбинантный полинуклеотид по п.3, отличающийся тем, что ИКП представляет собой ИКП AAV.

5. Рекомбинантный полинуклеотид по п.3, отличающийся тем, что промотор представляет собой мышечно-специфичный промотор.

6. Рекомбинантный полинуклеотид по п.5, отличающийся тем, что мышечно-специфичный промотор представляет собой МНСК7.

7. Система двойного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для лечения дисферлинопатии, содержащая:

(a) первый AAV-вектор, отличающийся тем, что указанный первый AAV-вектор содержит рекомбинантный полинуклеотид по п.1; и

(b) второй AAV-вектор, отличающийся тем, что указанный второй AAV-вектор содержит рекомбинантный полинуклеотид по п.2.

8. Система двойного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) по п.7, отличающаяся тем, что мольное отношение первого и второго AAV-векторов составляет от приблизительно 100:1 до 1:100, приблизительно 10:1-1:10, приблизительно 2:1-1:2 или приблизительно 1:1.

9. Система двойного вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) по п.7 или 8, отличающаяся тем, что AAV-вектор представляет собой AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAVrh.10, AAVrh.20, AAVrh.74 или их рекомбинантный AAV вариант.

10. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий:

(a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП);

(b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека (hDYSF), причем указанный полинуклеотид состоит из:

i. нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6;

ii. нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 6 на всем протяжении SEQ ID NO: 1 или 6;

iii. нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15;

iv. нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13 или 15 на всем протяжении SEQ ID NO: 13 или 15;

v. нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; или

vi. нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и

(c) второй ИКП,

причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП.

11. AAV-вектор по п.10, дополнительно содержащий один или более дополнительных полинуклеотидов, выбранных из промотора, интрона, маркера селекции или сайта инициации репликации (ORI).

12. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий:

(a) первый инвертированный концевой повтор (ИКП);

(b) полинуклеотид, кодирующий фрагмент белка дисферлина человека, причем указанный полинуклеотид состоит из:

i. нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8;

ii. нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2 или 8 на всем протяжении SEQ ID NO: 2 или 8;

iii. нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16;

iv. нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14 или 16 на всем протяжении SEQ ID NO: 14 или 16;

v. полинуклеотида, кодирующего фрагмент белка hDYSF, причем указанный фрагмент белка hDYSF состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; или

vi. полинуклеотида, по меньшей мере на 90% идентичного последовательности полинуклеотида (v) на всем протяжении нуклеотидной последовательности (v); и

(c) второй ИКП,

причем указанный полинуклеотид фланкирован первым и вторым ИКП.

13. AAV-вектор по п.12, дополнительно содержащий один или более полинуклеотидов, выбранных из маркера селекции, сайта инициации репликации (ORI), нетранслируемой области (UTR) или сигнала полиаденилирования (polyA).

14. AAV-вектор по любому из пп.10-13, отличающийся тем, что AAV-вектор представляет собой AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAVrh.10, AAVrh.20, AAVrh.74 или их рекомбинантный AAV вариант.

15. Композиция для лечения дисферлинопатии, содержащая AAV-вектор по п.11 и AAV-вектор по п.13.

16. Композиция по п.15, отличающаяся тем, что AAV-вектор представляет собой AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAVrh.10, AAVrh.20, AAVrh.74 или их рекомбинантный AAV вариант.

17. Система упаковки аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая:

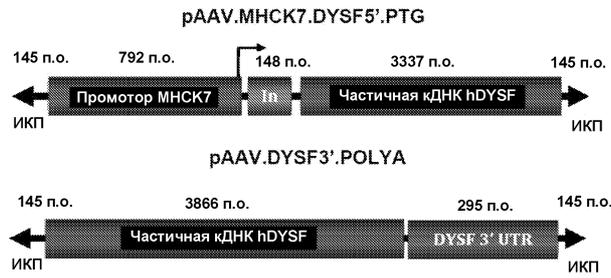
(a) плазмиду, содержащую рекомбинантный полинуклеотид по любому из пп.1-6;

(b) плазмиду-помощник аденовируса; и

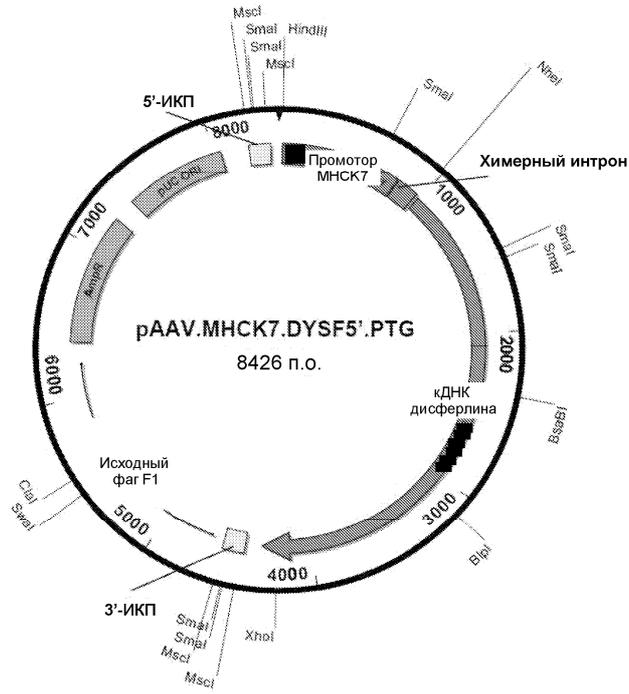
(c) плазмиду гер-сар.

18. Система упаковки аденоассоциированного вируса, содержащая:
- (a) плазмиду, содержащую рекомбинантный полинуклеотид по любому из пп.1-6; и
  - (b) плазмиду-помощник аденовируса.
19. Система упаковки AAV по любому из пп.17, 18, отличающаяся тем, что плазида содержит полинуклеотид, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 18 или 19.
20. Система упаковки AAV по любому из пп.17, 18, отличающаяся тем, что указанная плазида содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 18 или 19.
21. Способ получения вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), включающий приведение клетки в контакт с плазмидой, содержащей рекомбинантный полинуклеотид по любому из пп.1-6, или системой упаковки AAV по п.17.
22. Способ по п.21, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой клетку-хозяина, необязательно клетку-хозяина млекопитающего, дополнительно необязательно HEK293.
23. Способ получения вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), включающий трансдукцию линии упаковывающих клеток плазмидой, содержащей рекомбинантный полинуклеотид по любому из пп.1-6, причем указанная линия упаковывающих клеток экспрессирует гены гер и сар аденоассоциированного вируса.
24. Способ по любому из пп.21-23, отличающийся тем, что плазида содержит полинуклеотид, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 18 или 19.
25. Способ по любому из пп.21-23, отличающийся тем, что указанная плазида содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 18 или 19.
26. Клетка, содержащая рекомбинантный полинуклеотид по любому из пп.1-6.
27. Клетка по п.26, отличающаяся тем, что плазида содержит полинуклеотид, по меньшей мере на 90% идентичный SEQ ID NO: 18 или 19.
28. Клетка по п.26, отличающаяся тем, что указанная плазида содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 18 или 19.
29. Способ лечения дисферлинопатии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом:
- (a) эффективного количества первого полинуклеотида, причем указанный первый полинуклеотид представляет собой рекомбинантный полинуклеотид по п.1; и
  - (b) эффективного количества второго полинуклеотида, причем указанный второй полинуклеотид представляет собой рекомбинантный полинуклеотид по п.2.
30. Способ по п.29, отличающийся тем, что первый полинуклеотид и/или второй полинуклеотид вводят внутримышечно или внутривенно.
31. Способ по п.29 или 30, отличающийся тем, что первый и второй полинуклеотиды вводят одновременно или последовательно.
32. Способ лечения дисферлинопатии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом:
- (a) эффективного количества первого вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), причем указанный первый AAV-вектор представляет собой AAV-вектор по п.10; и
  - (b) эффективного количества второго AAV-вектора, причем указанный второй AAV-вектор представляет собой AAV-вектор по п.12.
33. Способ по п.32, отличающийся тем, что первый AAV-вектор и/или второй AAV-вектор вводят внутримышечно или внутривенно.
34. Способ по п.32 или 33, отличающийся тем, что первый и второй AAV-векторы вводят одновременно или последовательно.
35. Способ лечения дисферлинопатии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества системы двойного AAV-вектора по п.7 или 8, или композиции по п.15.
36. Способ по любому из пп.32-35, отличающийся тем, что эффективное количество первого AAV-вектора составляет от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{16}$  vg/kg, приблизительно  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^{15}$  vg/kg или приблизительно  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{14}$  vg/kg.
37. Способ по любому из пп.29-36, отличающийся тем, что дисферлинопатия представляет собой поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2B (LGMD2B) или миопатию Миоши.
38. Рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий белок дисферлина человека (hDYSF), причем последовательность указанного рекомбинантного полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20.
39. Рекомбинантный полинуклеотид по п.38, отличающийся тем, что последовательность указанного рекомбинантного полинуклеотида содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20.
40. Способ получения рекомбинантного полинуклеотида по п.38, включающий приведение клетки в контакт или экспрессирование в клетке рекомбинантного полинуклеотида по п.1 и рекомбинантного полинуклеотида по п.2.
41. Способ получения рекомбинантного полинуклеотида по п.38, включающий приведение клетки в контакт с системой двойного вектора на основе AAV по п.7 или 8.

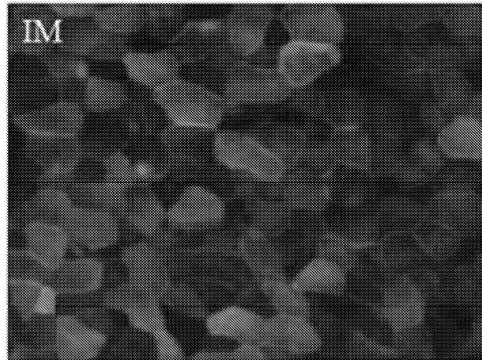
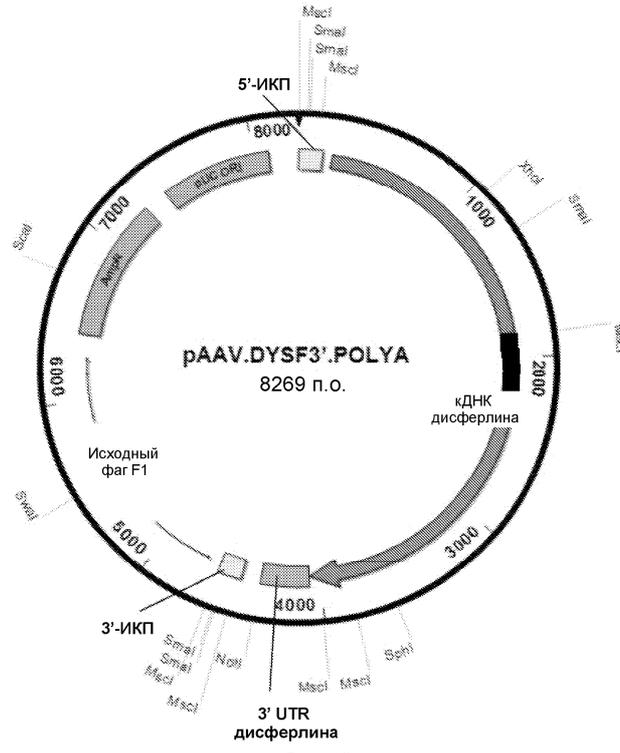
42. Способ получения рекомбинантного полинуклеотида по п.38 или 39, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой эукариотическую клетку.



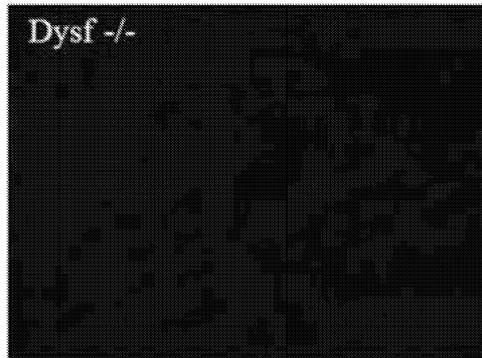
Фиг. 1



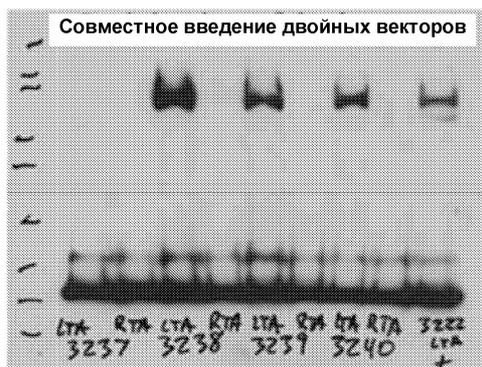
Фиг. 2



Фиг. 4А



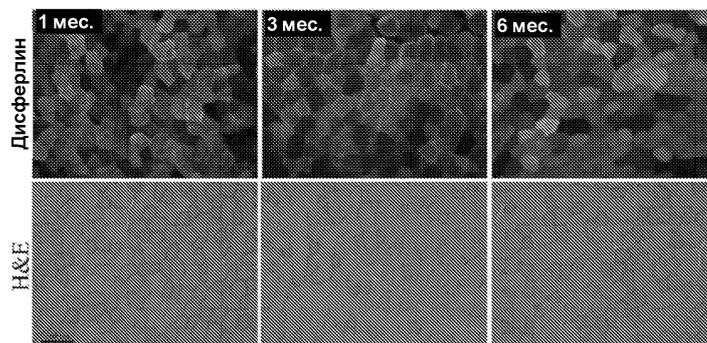
Фиг. 4В



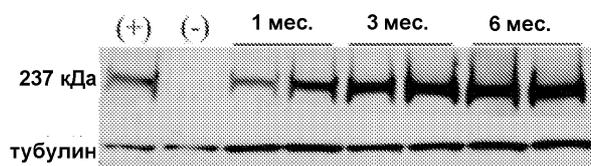
Фиг. 4С



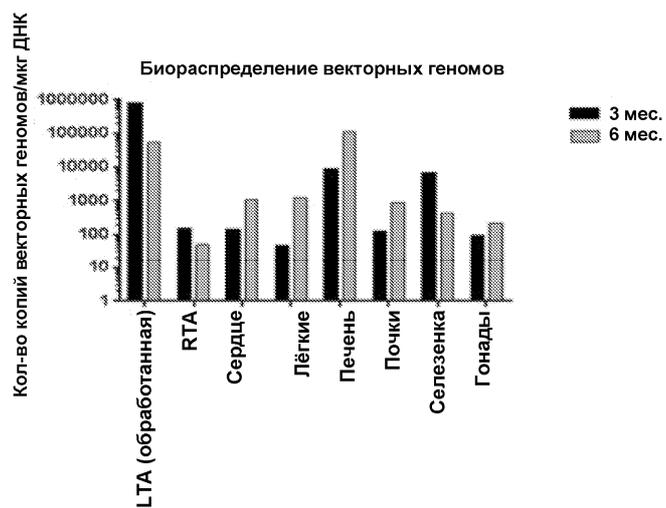
Фиг. 4D



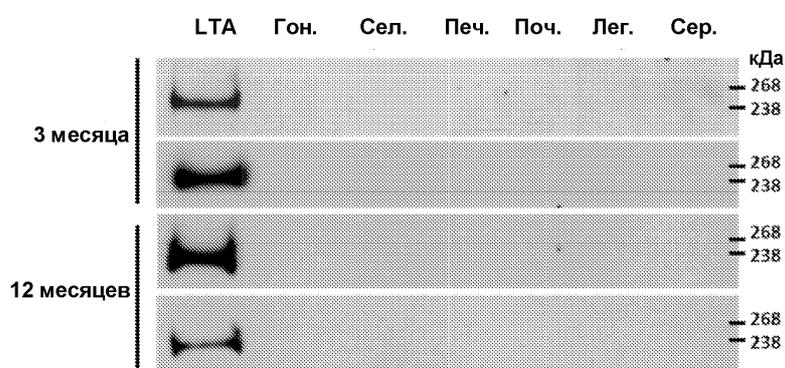
Фиг. 5А



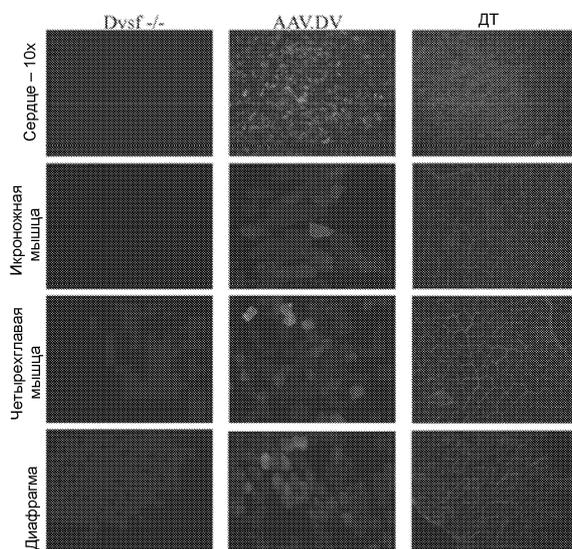
Фиг. 5В



Фиг. 5С

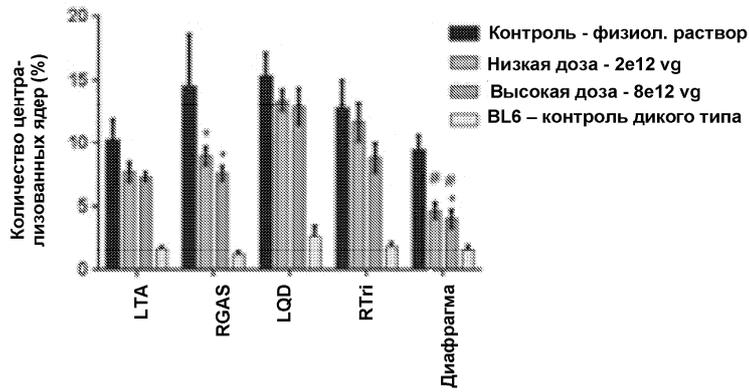


Фиг. 6

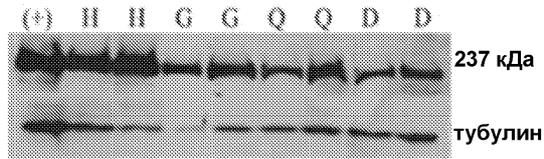


Фиг. 7А

Количество централизованных ядер

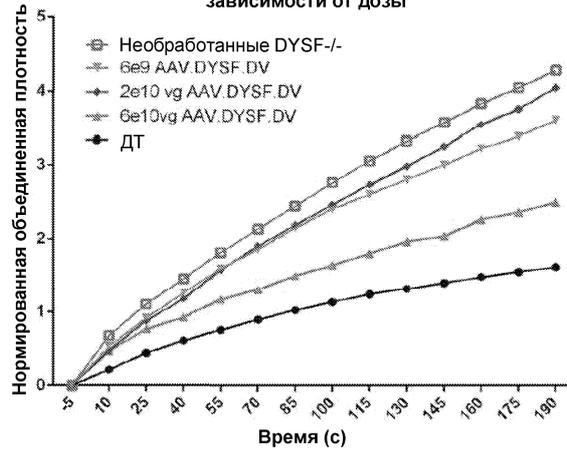


Фиг. 7B

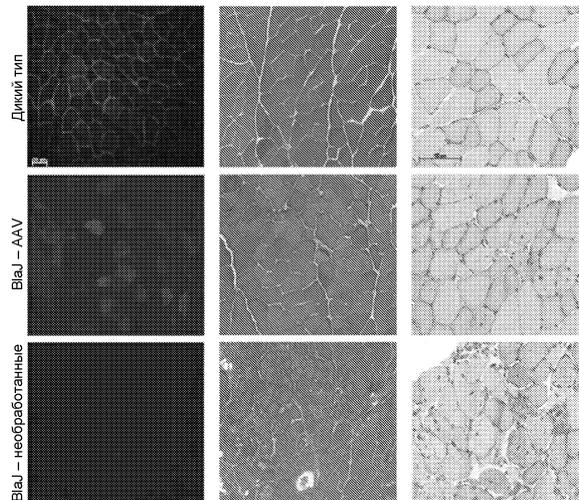


Фиг. 7C

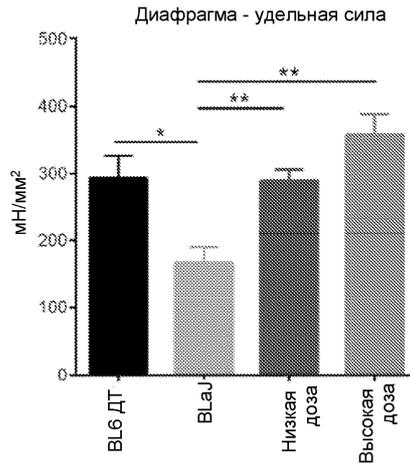
Ответ на AAVrh.74.MHCK7.DYSF.DV в зависимости от дозы



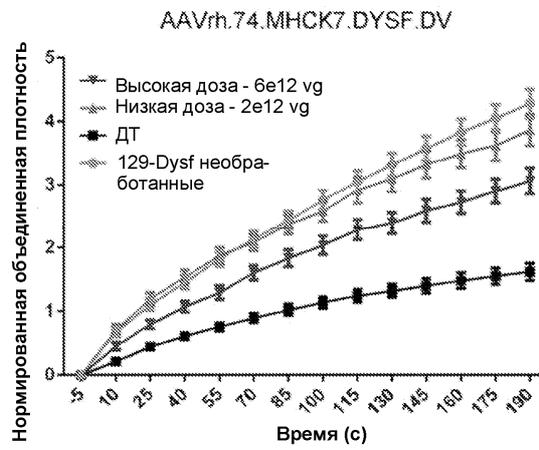
Фиг. 8



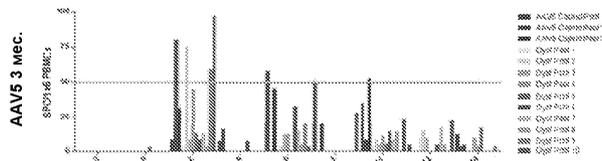
Фиг. 9



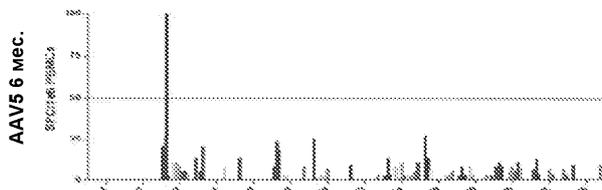
Фиг. 10А



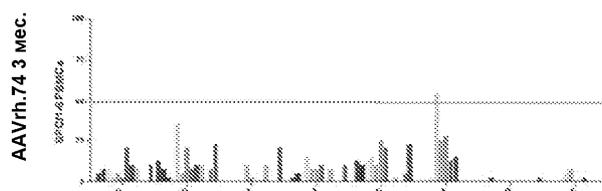
Фиг. 10В



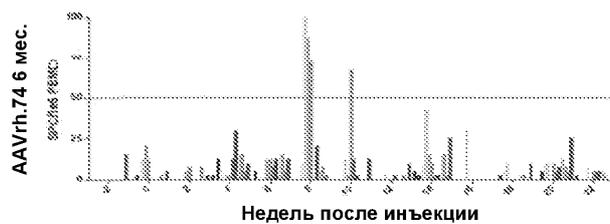
Фиг. 11А



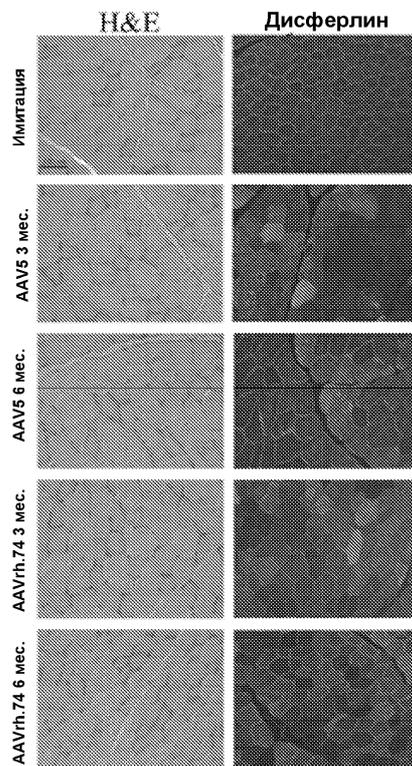
Фиг. 11В



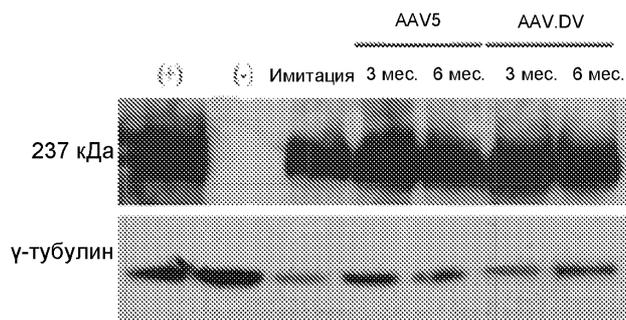
Фиг. 11С



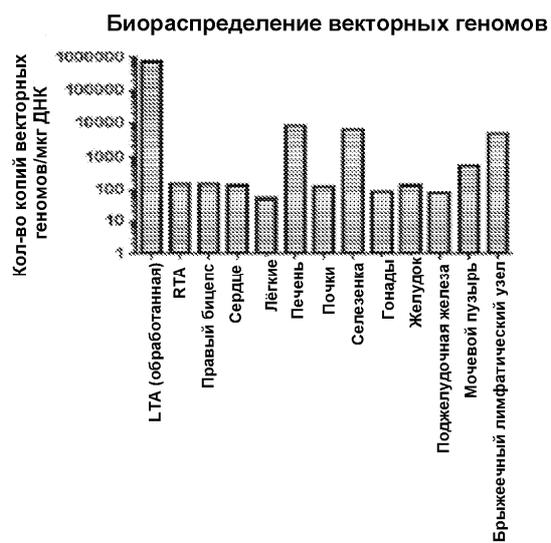
Фиг. 11D



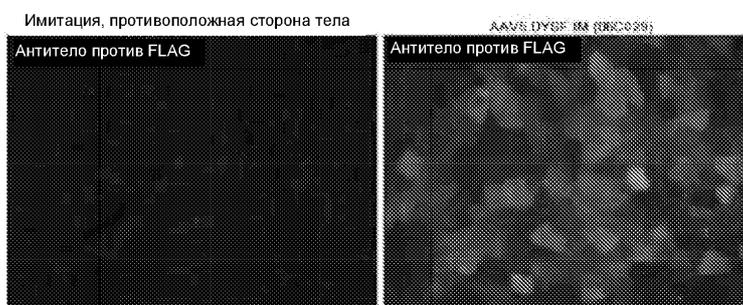
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 12С



Фиг. 13